

Farmacología

Volumen 1

No. 01

Enero - Junio 2022

Encapsulación de la asparaginasa
en partículas pseudovirales como
estrategia para mejorar sus
propiedades farmacológicas

p. 4

Producción de nanopartículas
metálicas mediante el uso de los
hongos: una alternativa contra
microorganismos patógenos

p. 12

Importancia del tamaño
del diámetro de nanopartículas
de óxidos metálicos en respuestas
celulares de adipocitos

p. 18

Nanoantibióticos
en los tiempos del Cólera

p.30

Nanopartículas y
neurodegeneración

p.43

Toxicidad de nanopartículas
de óxido de zinc y óxido cobre en
células del sistema excretor

p.48

El potencial riesgo digestivo de los
nanomateriales

p.60

Nanotecnología y Farmacología



Director

Dr. Germán E. Fajardo Dolci

Editor

Omar F. Carrasco

Consejo Editorial

Dr. Germán E. Fajardo Dolci. Director de la Facultad de Medicina, UNAM. • Dr. Omar F. Carrasco. Editor en Jefe. • Dra. Irene Durante Montiel. Secretaría General. Facultad de Medicina, UNAM • Dra. Guadalupe Sánchez Bríngas. Coordinadora de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina, UNAM • Dra. Margarita Cabrera Bravo. Jefa del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM • Dra. Guadalupe S. García de la Torre. Jefa del Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina, UNAM • Dra. Laura Silvia Hernández Gutiérrez. Jefa del Departamento de Integración de Ciencias Médicas. Facultad de Medicina, UNAM • Dra. Virginia Inclán Rubio. Jefa del Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, UNAM • Dr. Alberto M. Ángeles Castellanos. Jefe del Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina, UNAM • Dr. Rubén Argüero Sánchez. Jefe del Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina, UNAM • Dr. José Benjamín Guerrero López. Jefe del Departamento de Psiquiatría y Salud Mental. Facultad de Medicina, UNAM • Dr. Federico Martínez Montes. Jefe del Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UNAM • Dr. Gustavo A. Olaiz Fernández. Coordinador General del Centro de Investigación en Políticas, Población y Salud. Facultad de Medicina, UNAM

REVISTA FARMACOLOGÍA, Vol 1, No.1 Enero - Junio 2022

REVISTA FARMACOLOGÍA, Vol 1, No.1 Enero - Junio 2022, es una publicación bianual editada por la Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, a través del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria, Col. Copilco, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, Tel. 555623-2167, URL:http://farma.facmed.unam.mx/wp/?page_id=3007 correo electrónico revistafarmacologia@facmed.unam.mx, Editor responsable: Omar Francisco Carrasco Ortega, Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2021-092322411700-102, ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, Responsable de la última actualización de este número, Omar Francisco Carrasco Ortega, Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Circuito s. n., Ciudad Universitaria, col. Copilco, alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, C. P. 04510, Tel. 555623-2167, fecha de última modificación, 29 de junio de 2023.

El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores y no refleja el punto de vista del Editor, de la revista ni de la UNAM. Se autoriza cualquier reproducción parcial o total de los contenidos de la publicación, siempre y cuando sea sin fines de lucro o para usos estrictamente académicos, citando invariablemente la fuente sin alteraciones del contenido y dando los créditos autorales.

Para otro tipo de reproducción comunicarse con Omar Francisco Carrasco Ortega, omar.f.carrasco@facmed.unam.mx Revista Farmacología no cobra aportaciones a sus autores para publicarse.

Contenido

Editorial

Pág. 03

01

Pág. 04

Encapsulación de la asparaginasa en partículas pseudovirales como estrategia para mejorar sus propiedades farmacológicas

Francisca Villanueva-Flores y Alejandro Huerta-Saqueró

02

Pág. 12

Producción de nanopartículas metálicas mediante el uso de los hongos: una alternativa contra microorganismos patógenos

Ernestina Castro-Longoria

03

Pág. 18

Importancia del tamaño del diámetro de nanopartículas de óxidos metálicos en respuestas celulares de adipocitos

Jesús Daniel Vázquez-Guevara y Karla Oyuky Juárez Moreno

04

Pág. 30

Nanoantibióticos en los tiempos del Cólera

Anaid Meza Villezcas y Alejandro Huerta Saqueró

05

Pág. 43

Nanopartículas y neurodegeneración

Lorena Velázquez Alvarez y José de Jesús Rivera Sánchez

06

Pág. 48

Toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y óxido cobre en células del sistema excretor

Elizabeth Mavil-Guerrero y Karla Oyuky Juárez Moreno

07

Pág. 60

El potencial riesgo digestivo de los nanomateriales

Salma López Rodríguez y Karla Oyuky Juárez Moreno

Editorial

El infinito interés por el conocimiento es una cualidad innata del ser humano, a través de la historia hemos prestado especial atención al estudio de sustancias que pueden ser útiles para aliviar la expresión clínica de las enfermedades.

En México, este interés es ancestral, las propiedades farmacológicas de plantas medicinales utilizadas en tiempos prehispánicos y descritas en el "*Libellus de medicinalibus indorum herbis*" siguen creando líneas de investigación aún en nuestros días.

El estudio de la Farmacología en nuestra máxima casa de estudios tiene su origen a principios de 1900 de la mano de los doctores Ignacio Chávez, Ramón Pérez-Cirera y Francisco Fernández del Castillo en la Escuela Nacional de Medicina, antecesora de nuestra actual Facultad de Medicina.

Destacados académicos han forjado al Departamento de Farmacología, el Dr. Efraín Pardo Codina, mentor de farmacólogos excepcionales como Horacio Vidrio López, Enrique Hong, Rodolfo Rodríguez Carranza, Efraín Campos y José Antonio Rojas Ramírez. El Dr. Juan José Mandoki Weitzner mentor de los doctores Juan Molina, Alejandro Jiménez, Marco Velasco. Profesoras e investigadoras destacadas como las doctoras Consuelo Izazola, Cristina Lemini, Dolores Ramírez y Yolanda Marín. Múltiples generaciones han sido formadas en las aulas de nuestra Facultad de la mano de nuestros profesores.

Esta revista es el espacio natural para mostrar los avances en Farmacología, así como para dar reconocimiento a quienes lo han hecho posible.

Este número habla de adelantos interesantes en nuestra materia, la Nanotecnología y la Farmacología tratando de encontrar lo que hemos buscado desde el principio, la salud.

Omar F. Carrasco

Editor

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.0> Ciudad de México

Encapsulación de la asparaginasa en partículas pseudovirales como estrategia para mejorar sus propiedades farmacológicas

Francisca Villanueva-Flores^{1,2*} y Alejandro Huerta-Saquero^{1*}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.1> Ciudad de México

Resumen

La encapsulación de fármacos en nanoacarreadores es una prometedora técnica para mejorar la farmacocinética y farmacodinamia de enzimas con fines terapéuticos. Entre los diversos acarreadores se destacan el uso de partículas pseudovirales (VLPs) por su capacidad intrínseca de autoensamblaje, biodegradabilidad, biocompatibilidad, fácil modificación y escalabilidad. Se presentan los resultados que hemos obtenido en la encapsulación de la asparaginasa (ASNasa), una enzima ampliamente utilizada en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (LLA), en VLPs del bacteriófago P22 y del Virus del Mosaico del Bromo (BMV). Con esta tecnología se espera sea posible disminuir

las reacciones alérgicas asociadas al uso de la ASNasa, mejorar su estabilidad y prolongar su tiempo de vida media y en última instancia, ofrecer una formulación novedosa que prometa un mejor pronóstico a los pacientes con LLA.

Palabras clave:

Partículas pseudovirales, Asparaginasa, Leucemia Linfocítica Aguda, Bacteriófago P22, Virus del Mosaico del Bromo.

¹ Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada. 22860. Ensenada, BC. México.

² Dirección actual: Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210.

* Autores de correspondencia: E-mail: francisca.villanueva@ibt.unam.mx ORCID 0000-0001-6092-4211, saquero@ens.cnyn.unam.mx ORCID 0000-0002-0156-6773

Introducción

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una proliferación maligna que se produce cuando los glóbulos blancos primitivos de origen linfoide se reproducen en la médula ósea, la sangre y los sitios extramedulares de manera descontrolada sin convertirse en linfocitos B y T maduros. La LLA es el principal cáncer infantil en pacientes menores de 14 años. En 2020 se diagnosticaron 6,955 casos nuevos de leucemia en México y se le considera uno de los 10 cánceres con mayor incidencia y mortalidad (1).

El tratamiento convencional comprende tres fases: 1) fase de inducción a la remisión (IR), 2) fase de consolidación y 3) fase de mantenimiento. La fase IR se define como aquella donde existe una presencia de menos del 5% de blastos en médula ósea, y donde se busca la restauración de la hematopoyesis normal mediante una quimioterapia combinada. En los esquemas infantiles, la asparaginasa (ASNasa) es un fármaco fundamental durante la fase IR. La administración por 26 a 30 semanas de ASNasa mejora la tasa de remisión en más del 90% (2). Sin embargo, en México se tiene una de las frecuencias de mortalidad durante la IR más elevadas del mundo e incluso si se compara con otros países en vías de desarrollo, probablemente debido al abandono del tratamiento con ASNasa asociado a los severos efectos secundarios y la falta de alternativas en el mercado mexicano (3).

La ASNasa (EC 3.5.1.1) es una enzima homotetramérica que cataliza la hidrólisis de asparagina (Asn) en aspartato (Asp) y amonio. El mecanismo de acción consiste en reducir la concentración de Asn disponible para las células, donde las células leucémicas son especialmente sensibles

a esta disminución en la concentración dados los bajos niveles de expresión de la asparagina sintetasa, lo que conduce a su muerte por apoptosis (4).

Entre los principales inconvenientes del uso de la ASNasa se encuentran las reacciones alérgicas asociadas a los 7-8 sitios de reconocimiento en la superficie de la enzima. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ocurrir en el 30% a 75% de los pacientes y más del 70% desarrollan anticuerpos al sitio activo de la enzima, lo que conduce a la inactivación silenciosa del fármaco. Otros inconvenientes del uso de la ASNasa son los cortos tiempos de vida media en sangre, su rápida eliminación por el sistema reticuloendotelial, así como los efectos secundarios relacionados a la acumulación de amonio y la actividad de glutaminasa (5).

Para superar estas limitaciones se han propuesto nuevas formulaciones de ASNasa con propiedades mejoradas (eficacia, seguridad, tolerabilidad, estabilidad o dosificación) comparadas con el fármaco original. Estas formulaciones reciben el nombre de "biobetters". Hoy en día los biobetters son un excelente mercado en constante crecimiento, ya que son preparaciones patentables con un considerable menor tiempo y costo de desarrollo comparado con el biofármaco de referencia. El biofármaco de referencia de la ASNasa es aquel derivado de *E. coli* y comercializado como Elspar® desde 1978. Posteriormente, solo dos biobetters de ASNasa han sido lanzados al mercado. El primero una versión funcionalizada con polietilenglicol (PEG), Oncaspar®, aprobada en 1994 que ha resultado muy exitosa por tener una efectividad comparable al biofármaco de referencia y menor inmunogenicidad. Sin embargo, se

ha reportado la formación de anticuerpos antiPEG que conducen a la inactivación silenciosa. El segundo, una ASNasa de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®) en 2011, que también exhibe una menor inmunogenicidad, aunque éste no se vende en México, y su costo es muy elevado (6).

Una estrategia que recientemente ha cobrado atención para mejorar las propiedades de diversos biofármacos basados en enzimas, ha sido la nano- y micro- encapsulación, ya que la cápsula protege a la molécula cargo de la acción de proteasas del medio, incrementa el tiempo de vida media *in vivo* y en algunos casos, reduce su inmunogenicidad (7).

Se han utilizado diversas nano- y micro- cápsulas, cada una con ventajas y limitantes. La cápsula ideal deberá ser biocompatible, escalable, no inmunogénica, estable, de bajo costo, además debe permitir la dinámica enzimática y permitir la difusión del sustrato a través de la membrana de la cápsula. Entre las nano- y micro- cápsulas que se han estudiado destacan los liposomas (8); biopolímeros (9); polimerosomas (10); nanopartículas magnéticas (11); vesículas poliónicas (12); eritrocitos (13); nanoesferas huecas (14); y más recientemente partículas pseudovirales (VLPs) (15).

Las VLPs son estructuras de multiproteínas que mimetizan la arquitectura de los virus, pero al carecer de material genético éstas no pueden replicarse dentro de las células. A diferencia de otras nanopartículas, las VLPs pueden ser tanto química como genéticamente modificadas para desplegar antígenos en su superficie y ser usadas como vacunas. Asimismo, también pueden ser cargadas con fármacos, material genético o enzimas (16). A continuación, se presentarán los avances que hemos conseguido en nuestro grupo de trabajo con

el primer encapsulamiento reportado de la ASNasa en VLPs. Además, se discutirán las propiedades cinéticas, estabilidad y actividad antineoplásica de esta novedosa formulación de nanorreactores con actividad de ASNasa.

Resultados

Nuestro grupo de trabajo recientemente ha reportado la primera encapsulación de ASNasa en VLPs. La encapsulación genéticamente dirigida, se llevó a cabo mediante una doble transformación de *E. coli* (BL21 DE3/*pLysS*) con un plásmido que contiene la secuencia codificante para la ASNasa fusionada a la proteína de andamiaje (sp) (ASNasa-sp) y otro plásmido que contiene la secuencia de la proteína de capa del bacteriófago P22 (CP). Mediante una sobreexpresión diferencial de la ASNasa-sp seguida por la CP, se llevó a cabo el autoensamblaje *in vivo* de los nanorreactores ASNasa-P22 (**Fig. 1a**). Una micrografía electrónica de los nanorreactores ASNasa-P22 se muestra en la **Fig. 1b**. Se caracterizaron los parámetros cinéticos de la enzima encapsulada y se observó que el valor de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) fue 15 veces mayor respecto a la enzima libre. Esta diferencia indica que la afinidad por el sustrato de la enzima encapsulada disminuye probablemente debido a las limitaciones en la difusión del sustrato a través de las VLPs. Es importante destacar que la ASNasa encapsulada fue estable, mantuvo el 80% de su actividad hasta por 24 h a 37° C, independientemente de la presencia de 20% de suero sanguíneo humano (**Fig. 1c**). Además, se demostró que los nanorreactores ASNasa-P22 fueron tóxicos para las líneas celulares leucémicas MOLT-4 y Reh de manera directamente

proporcional a la concentración usada (**Fig. 1d**). Por lo anterior se demostró por primera vez que es posible encapsular ASNasa en VLPs, manteniendo su actividad antineoplásica y estabilidad en óptimas condiciones (15).

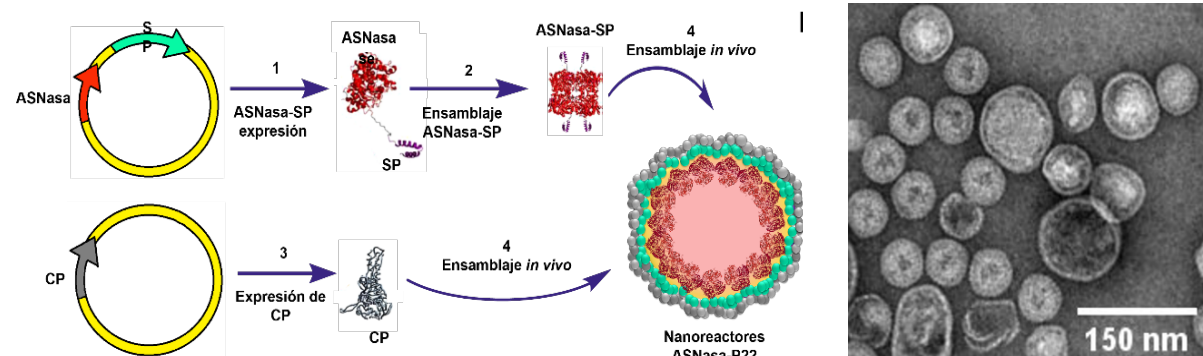


Fig. 1a

Fig. 1b

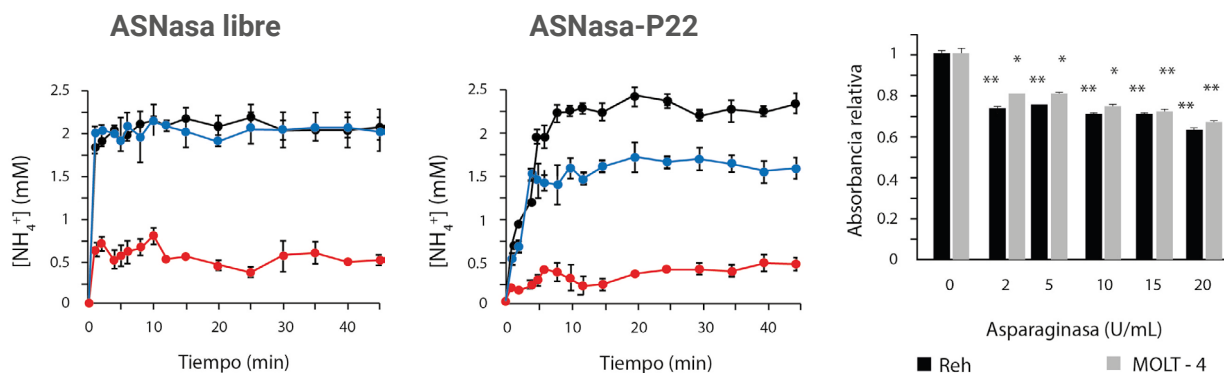


Fig. 1c

Fig. 1d

Fig. 1. Producción y caracterización de los nanobiorreactores ASNasa-P22. **a)** Esquema de la encapsulación genéticamente dirigida de la ASNasa en VLPs del bacteriófago P22. **b)** Micrografía electrónica de transmisión de los nanobiorreactores ASNasa-P22. **c)** Análisis de la estabilidad de ASNasa-P22 incubada a 37° C en presencia de 20% v/v de suero sanguíneo humano. Negro, 0 h; azul, 24 h; y rojo, 48 h. **d)** Análisis de la citotoxicidad de ASNasa-P22 hacia las líneas celulares humanas de leucemia linfocítica aguda MOLT-4 y Reh (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar. Las significaciones estadísticas se calcularon mediante un método bidireccional de análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey. (*) p<0.05, (**) p<0.01. Modificado de (Díaz-Barriga C., et al., 2021).

No obstante, este sistema posee un inconveniente que es la alta inmunogenicidad asociada a las VLPs del bacteriófago P22. Para disminuir la respuesta inmune hacia las VLPs, éstas han sido funcionalizadas en su superficie con moléculas, siendo una de las más eficaces el PEG. Sin embargo, se ha observado que pacientes a los que se

les ha administrado ASNasa funcionalizada con PEG, 13% presentaron alergias y 6-8% desarrollaron anticuerpos antiPEG lo que conduce a una inactivación silenciosa y abatimiento del efecto del biofármaco (17).

Un tipo de VLPs que resulta promisorio como una nano cápsula no inmunogénica

hacia mamíferos, son aquellas basadas en virus de plantas. Un ejemplo de ello son las VLPs derivadas del BMV bajo la hipótesis de que estos pasarán desapercibidos para el sistema inmune (datos no publicados). Recientemente, se ha demostrado que VLPs basadas en BMV no activan macrófagos *in vitro*, lo cual sugiere que las VLPs de BMV podrían ser menos inmunogénicas y aplicarse potencialmente como nanoacarreadores no inmunogénicos que abatan la inmunogenicidad intrínseca de la ASNasa (18).

En nuestro grupo de trabajo estamos explorando esta hipótesis y hemos logrado la encapsulación de la ASNasa también en BMV. El virus BMV pertenece al género de los bromovirus que infecta las plantas de cebada (*Hordeum vulgare*). BMV tiene un diámetro exterior de 28 nm y peso molecular de 4.6×10^3 kDa. Está constituido por una cápside icosaédrica formada por 180 proteínas idénticas que forman 12 pentámeros y 20 hexámeros (19).

En el laboratorio, el virus BMV se obtuvo y purificó según lo reportado (18). BMV posee la capacidad de autoensamblarse dependiendo de las condiciones de pH y fuerza iónica como se muestra en el diagrama de fases de la **Fig. 2a**. A baja fuerza iónica las proteínas del BMV se autoensamblan. A elevadas fuerzas iónicas y pH menores a 6.5 el virus se dilata y libera su material genético. A pH mayor de 6.5 y elevada fuerza iónica la cápside se desensambla por completo en monómeros y oligómeros.

Esta propiedad de autoensamblarse electrostáticamente regulado puede aprovecharse para el encapsulamiento de cargos de interés en el interior de las cápsides virales como la ASNasa. El procedimiento para el desensamble de virus BMV y su posterior reensamble en VLPs cargadas con ASNasa se muestra en la **Fig. 2b**. A la ASNasa encapsulada en VLPs de BMV les hemos denominado nanobiorreactores ASNasa-BMV y se muestran en la **Fig. 2c**.

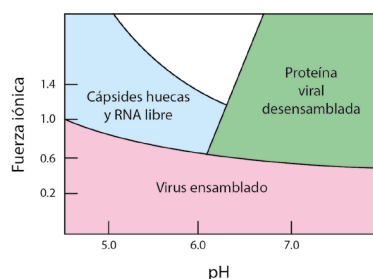


Fig. 2a

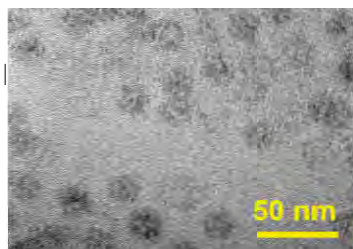


Fig. 2c

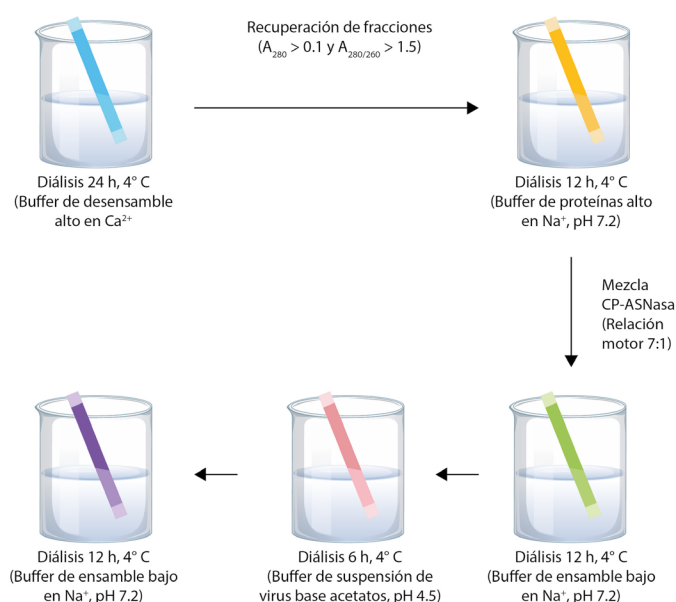


Fig. 2b

Fig. 2. Proceso de encapsulación de la ASNasa en VLPs del BMV. a) Diagrama de fases para el ensamblaje y desensamble de BMV. (Modificado de 20). b) Encapsulación de ASNasa en VLPs de BMV. c) Micrografía electrónica de transmisión de los nanobiorreactores ASNasa-BMV. (Resultados no publicados).

Se caracterizaron las propiedades cinéticas de los nanobiorreactores ASNasa-BMV encontrándose que la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) es 1.7 veces mayor y la velocidad máxima (V_{max}) 0.46 veces menor en el caso de la ASNasa encapsulada con respecto a la enzima libre. Esta diferencia podría indicar que la enzima encapsulada tiene una menor afinidad por el sustrato probablemente debido a que la cápside viral provoca una limitación en la difusión de la Asn, lo cual reduce la velocidad de la reacción (datos no mostrados).

Posteriormente se evaluó la citotoxicidad de los nanobiorreactores ASNasa-BMV hacia las líneas celulares leucémicas de linfoblastos humanos T (MOLT-4) (sensible a ASNasa) y células de linfoblastos humanos (Reh) (tolerantes a ASNasa) y se comparó su efecto con la enzima libre comercial. De acuerdo con nuestros resultados, los nanobiorreactores ASNasa-BMV y la ASNasa libre tuvieron una toxicidad comparable en ambas líneas celulares, siendo ligeramente mayor en la línea sensible que en la tolerante, como se esperaba. A las 24 h post tratamiento, ambas líneas expuestas a ASNasa libre o encapsulada disminuyeron su viabilidad 10%, mientras que a las 132 h MOLT-4 disminuyó 60% su viabilidad inicial y Reh 50% (datos no publicados).

Los resultados obtenidos en cultivos celulares abren la puerta para explorar la respuesta inmune hacia la ASNasa encapsulada en VLPs de BMV comparada con la enzima libre. Para ello estamos actualmente evaluando los niveles de anticuerpos tipo IgM (respuesta inmediata) e IgG (respuesta tardía) en ratones retados con nuestras formulaciones. Estos experimentos se están realizando en colaboración con la Dra. Laura A. Palomares, investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo los criterios del comité de bioética de dicho instituto según lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999.

Conclusiones

Las formulaciones disponibles actualmente de ASNasa en el mercado generan frecuentemente reacciones alérgicas severas en los pacientes, lo que propicia el abandono del tratamiento e impide alcanzar la remisión de la LLA; por otro lado, no se venden en México y/o los costos pueden ser muy elevados. La falta de formulaciones alternativas clínica y económicamente viables en el mercado mexicano es un reto para la salud pública. De ahí la necesidad de ser autosuficientes en la producción de fármacos mexicanos que sean efectivos y accesibles para nuestra población. La nano- y micro- encapsulación de enzimas recientemente ha cobrado gran relevancia al conferir resistencia a proteólisis e incrementar el tiempo de vida media de las enzimas cargo en suero sanguíneo. Nuestro grupo de trabajo es pionero en la encapsulación de la ASNasa en VLPs del bacteriófago P22 y BMV. Estas novedosas formulaciones se encuentran actualmente en ensayos preclínicos con ratones para determinar de manera rigurosa su inmunogenicidad y bioseguridad. Esperamos que nuestros resultados sirvan de base para futuros ensayos clínicos, y en última instancia fructifiquen en una tecnología mexicana para el beneficio social.

Financiamiento

PAPIIT-DGAPA UNAM (IN210618). Villanueva-Flores F, recibió una beca postdoctoral DGAPA durante su estancia postdoctoral.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Alpar HO, Lewis DA. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 1985; 34(2):257-61. doi: 10.1016/00062952(85)90133-9
2. Avramis VI, Tiwari PN. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(3):241–254.
3. Bancroft JB, Hiebert E, Bracker CE. The effects of various polyanions on shell formation of some spherical viruses. *Virology.* 1969; 39(4):924-30. doi: 10.1016/0042-6822(69)90029-4
4. Broome J. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature.* 1961; 191:1114–1115. doi: 10.1038/1911114a
5. Bueno CZ, Apolinário AC, Duro-Castano A, et al. L-Asparaginase Encapsulation into Asymmetric Permeable Polymersomes. *ACS Macro Lett.* 2020; 9(10):1471–1477. doi: 10.1021/acsmacrolett.0c00619
6. Chauhan K, Hernandez-Meza JM, Rodríguez-Hernández AG, et al. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16(1):doi: 0345-2 10.1186/s12951-01817.
7. Crespo-Solis E, Espinosa-Bautista K, Alvarado-Ibarra M, et al. Survival analysis of adult patients with ALL in Mexico City: first report from the Acute Leukemia Workgroup (ALWG) (GTLA). *Cancer medicine.* 2018; 7(6):2423–2433. doi: 10.1002/cam4.1513
8. Cruz MEM, Gaspar MM, Lopes F, et al. Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* 1993; 96(1-3):67-77. doi: 10.1016/0378-5173(93)90213-Y 10
9. Díaz-Barriga C, Villanueva-Flores F, Quester K, et al. Asparaginase-Phage P22 Nanoreactors: Toward a Biobetter Development for Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Pharmaceutics.* 2021; 13(5):604. doi: 10.3390/pharmaceutics13050604
10. Tong WH, Pieters R, Tissing WJ, van der Sluis IM. Desensitization protocol should not be used in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase. *Hematologica.* 2014 Jul; doi: 10.3324/haematol.2013.099663.
11. Gaspar MM, Blanco D, Cruz MEM, et al. Formulation of l-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J. Control. Release.* 1998; 52(1-2):53-62. doi: 10.1016/S0168-3659(97)00196-X
12. GLOBOCAN. Cancer in Mexico Factsheet 2020. Citado el 22 de septiembre del 2021. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
13. Ha W, Meng XW, Li Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation. *Soft Mat.* 2010; 6:14051408. doi: 10.1039/B925747K
14. Heo YA, Syed YY, Keam SJ. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs.* 2019; 79(7):767777. doi: 10.1007/s40265-019-01120-1

15. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int.* 2018; 60(1):4-12. doi: 10.1111/ped.13457
16. Lin HK, van der Schoot P, Zandi R. Impact of charge variation on the encapsulation of nanoparticles by virus coat proteins. *Phys Biol.* 2012; 9(6):066004. doi: 10.1088/1478-3975/9/6/066004
17. Mu X, Qiao J, Qi L, et al. Poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone)-functionalized magnetic nanoparticles as carriers for enzyme immobilization and its application. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(23):21346-54. doi: 10.1021/am5063025
18. Nuñez-Rivera A, Fournier PGJ, Arellano DL, et al. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020; 11:372-382. doi:10.3762/bjnano.11.28
19. Sueyoshi D, Anraku Y, Komatsu T, et al. Enzyme-Loaded Polyion Complex Vesicles as in Vivo Nanoreactors Working Sustainably under the Blood Circulation: Characterization and Functional Evaluation. *Biomacromolecules.* 2017;18(4):1189-1196. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01870
20. Ulu A, Ates B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. *Bioconj Chem.* 2017; 28(6):1598-1610. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00217

Producción de nanopartículas metálicas mediante el uso de los hongos: una alternativa contra microorganismos patógenos

Ernestina Castro-Longoria¹

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.2> Ciudad de México

Resumen

Las nanopartículas metálicas (NPs) como las de plata, oro, cobre y otros metales han demostrado ser efectivas contra microorganismos que presentan multirresistencia a los antibióticos convencionales. Es por ello que actualmente se investiga el uso de materiales biológicos como agentes reductores para la producción de NPs, como una alternativa eco-amigable. Diversos materiales biológicos como bacterias, hongos, plantas, algas, etc., han sido utilizados para sintetizar NPs metálicas. No obstante, los hongos son microorganismos que presentan mayor ventaja sobre otros sistemas biológicos ya que poseen una alta tasa de crecimiento, requieren de nutrientes simples y son de fácil manejo en el laboratorio. Hasta el momento hemos llevado a cabo con éxito la producción de NPs de diversos metales utilizando

especies de hongos no patógenos. En particular las NPs de plata y cobre poseen excelentes propiedades antimicrobianas y una de las principales ventajas es que presentan baja toxicidad en líneas celulares de mamíferos. En esta nota se resume el trabajo realizado hasta el momento y se espera que en un corto plazo se lleven a cabo los ensayos de laboratorio *in vivo*, para demostrar su eficacia y así poder presentarlos como una alternativa para los casos donde las infecciones microbianas no respondan a los antibióticos convencionales.

Palabras clave:

Nanopartículas, biosíntesis, antimicrobianos.

¹ Investigador Titular D. Departamento de Microbiología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, México.

*Autor de correspondencia. E-mail: ecastro@cicese.mx

Introducción

Desde tiempos antiguos se conocen las propiedades antimicrobianas de la plata, y en las últimas décadas el uso de plata nanométrica y otros nanometales se han presentado como una alternativa para el manejo de la resistencia microbiana a los antibióticos convencionales.

Las nanopartículas (NPs) metálicas pueden producirse mediante métodos físicos y químicos, los cuales involucran una gran cantidad de energía y el uso de algunos químicos potencialmente tóxicos. Es por ello que una gran variedad de agentes biológicos se han propuesto para producir NPs (Quester et al., 2013). Dentro de los materiales biológicos que se han utilizado, los hongos han sido identificados como una excelente alternativa, eco-amigable, para la producción de NPs de diversos metales (Castro-Longoria, 2016). Los hongos son microorganismos degradadores de materia orgánica, por lo tanto tienen el potencial de secretar una gran cantidad de enzimas y metabolitos secundarios. Tanto los componentes intracelulares como los compuestos secretados al medio, pueden utilizarse para la formación y estabilización de las NPs.

Para llevar a cabo la biosíntesis de NPs metálicas se han utilizado con éxito diferentes protocolos, como el uso de la biomasa fúngica, el filtrado libre de células, el extracto de hongos y el sobrenadante de cultivos líquidos. El uso de extractos y sobrenadantes resulta ventajoso ya que no se tiene que resolver el problema de la extracción de las NPs de la biomasa del hongo (Castro-Longoria, 2016).

La biosíntesis de NPs mediante el uso de hongos representa una alternativa económica, eco-amigable y biocompatible que potencia la aplicación de las NPs obtenidas en biomedicina, ya que diversos estudios han reportado que las NPs de algunos metales poseen excelente actividad antimicrobiana contra bacterias hongos y virus, incluso contra microorganismos multirresistentes (Castro-Longoria et al., 2017). Además, algunas especies de hongos secretan moléculas con actividad antimicrobiana y se ha demostrado que las NPs obtenidas son aún más efectivas para inhibir microorganismos patógenos. Un aspecto fundamental para sugerir su uso en la clínica, es realizar estudios de citotoxicidad para comprobar que las NPs obtenidas no posean alta toxicidad en células de mamíferos, así como realizar los ensayos de laboratorio *in vivo*.

Nuestro grupo de investigación busca obtener NPs biocompatibles que puedan ser utilizadas como microbicidas. Resultados recientes utilizando especies de hongos no patógenos para la producción de NPs de plata han demostrado una alta efectividad para la inhibición de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, a concentraciones menores o iguales a 10 µg/ml. Cabe señalar que las NPs obtenidas conservan sus propiedades antibacterianas aún después de un año de estar almacenadas a temperatura ambiente, lo cual es importante para un uso exitoso. Además, los ensayos de citotoxicidad en fibroblastos mostraron baja citotoxicidad, por lo que podrían tener uso potencial en la clínica. Queda por realizar la evaluación en modelos *in vivo* para demostrar su efectividad y determinar su efecto a nivel sistémico.

Biosíntesis de NPs metálicas mediante el uso de los hongos

La biosíntesis de NPs metálicas utilizando hongos fue reportada por primera vez en el 2001. A partir de entonces, una cantidad creciente de especies de hongos se han utilizado y reportado como una alternativa más limpia para la producción de NPs (Castro-Longoria, 2016). La lista de especies de hongos reportada para la producción de NPs va en aumento y algunos estudios han incluido el uso potencial de las NPs obtenidas. Tal es el caso de las NPs de plata, cobre, oro y zinc, que se han propuesto para ser utilizadas como agentes antimicrobianos. En el caso de las NPs de oro, estas también podrían tener uso potencial para tratamientos contra el cáncer. Incluso, algunas formas y tamaños de NPs de oro biosintetizadas con el extracto del hongo *Neurospora crassa* (Figura 1A) se han propuesto para uso potencial en la detección de moléculas mediante espectroscopía Raman reforzada por efectos de superficie (SERS) (Quester et al., 2013).

Como se mencionó previamente, el uso de hongos no patógenos es una excelente alternativa para la síntesis de NPs, sobre todo si se busca una aplicación médica. En nuestro grupo de trabajo se han utilizado

mayormente hongos considerados seguros para el humano. En los primeros trabajos de investigación se utilizó la biomasa del hongo *N. crassa* para la producción de NPs de plata, oro, bimetalicas de oro y plata (Castro-Longoria et al., 2011) y platino (Castro-Longoria et al., 2012). Esta especie de hongo es utilizada como organismo modelo para diversos estudios de Biología celular y molecular y es considerada no patógena para plantas, animales y humanos. En estudios subsecuentes se han utilizado los extractos y/o sobrenadantes de cultivos líquidos (Quester et al., 2013, 2016).

Actualmente se están utilizando los hongos *Lentinus* y *Ganoderma* para la biosíntesis de NPs de plata y cobre (Figura 1B-C). Estas especies de hongos son comestibles y se han utilizado tradicionalmente en países asiáticos ya que se les atribuyen propiedades medicinales. También se está trabajando con especies del hongo *Trichoderma*, estos hongos son utilizados como bioremediadores en cultivos agrícolas y en general se consideran seguros. Sin embargo, como medida precautoria los extractos y sobrenadantes de cultivos líquidos utilizados para la síntesis, son ultracentrifugados para eliminar la biomasa. Posteriormente son filtrados con filtros de 0.22 μm de tamaño de poro para eliminar todo resto de biomasa que pudiera contener el líquido en donde se cultiva el hongo.

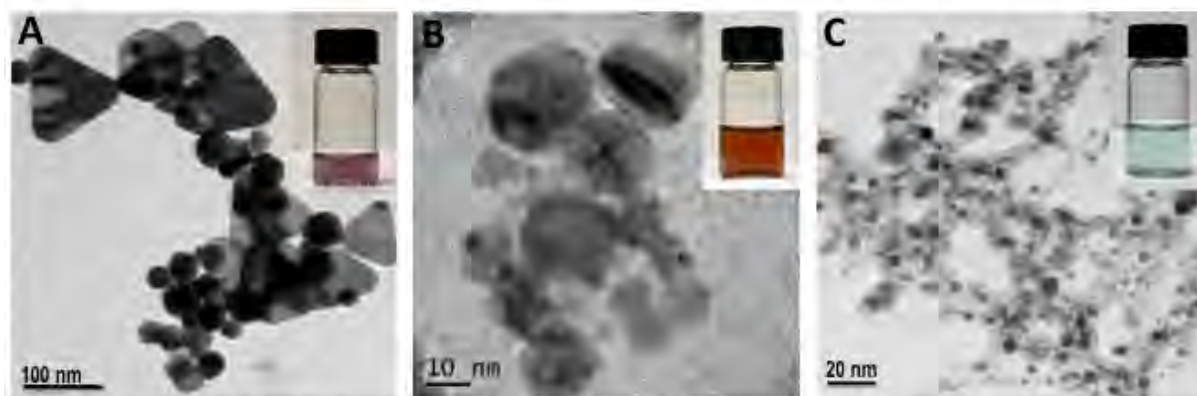


Figura 1. Micrografías de nanopartículas metálicas sintetizadas mediante extractos de hongos y analizadas bajo microscopía electrónica de transmisión. **(A)** nanopartículas de oro, **(B)** plata y **(C)** cobre. En los recuadros se muestran las suspensiones de cada tipo de nanopartícula.

Aplicación de nanopartículas metálicas contra microorganismos patógenos

Las NPs metálicas tienen un gran potencial como agentes antimicrobianos. En particular, las de plata han sido evaluadas para la inhibición de hongos y bacterias y se han reportado excelentes resultados. En el mercado se pueden encontrar productos impregnados de plata coloidal y con NPs de plata, incluidos Acticoat®, Aquacel® Ag, Contreet®, Actisorb® Silver 220, Urgotul SSD® y Avance® entre otros (Dowsett, 2004). Estos productos se utilizan para tratar infecciones en heridas quirúrgicas, quemaduras y heridas crónicas como úlceras en las piernas (Lansdown, 2004), sin embargo hasta donde tengo conocimiento, la aplicación directa de soluciones de plata todavía no se realiza. Lo que si es claro es que la cantidad de plata en tamaños nanométricos es mucho menor que la plata coloidal, la cual incluso se vende para consumo directo. Sin embargo hacen falta estudios para determinar si la aplicación tópica es segura. Aunque el uso en pacientes solo sería recomendable para aquellos que presenten infecciones cutáneas que no

respondan a los antibióticos convencionales. El mecanismo de acción de las NPs de plata contra los microorganismos incluye la generación de especies reactivas de oxígeno, daño en pared y membrana celular y daño en el ADN. En *Candida albicans* se determinó que las NPs de plata se adhieren a la pared celular liberando iones que al internalizarse forman pequeñas NPs, las cuales terminan destruyendo el material intracelular causando la muerte del hongo (Vázquez-Muñoz, et al., 2014). En otro estudio se evaluó la capacidad antimicrobiana de un irrigante dental modificado con NPs de plata contra *C. albicans* y *Staphylococcus aureus* y se encontró que fue capaz de inhibir el crecimiento tanto de células planctónicas como biopelículas (Martínez-Andrade et al., 2018). Las NPs de plata se observaron cubriendo la superficie de pseudo-hifas de *C. Albicans* (Figura 2A) así como la forma levaduriforme (Figura 2 B). En el caso de *S. aureus*, las células también se encontraron con NPs adheridas en gran parte de la superficie (Figura 2C-D). Los resultados obtenidos demuestran que las NPs metálicas tienen un alto potencial para su uso en la clínica.

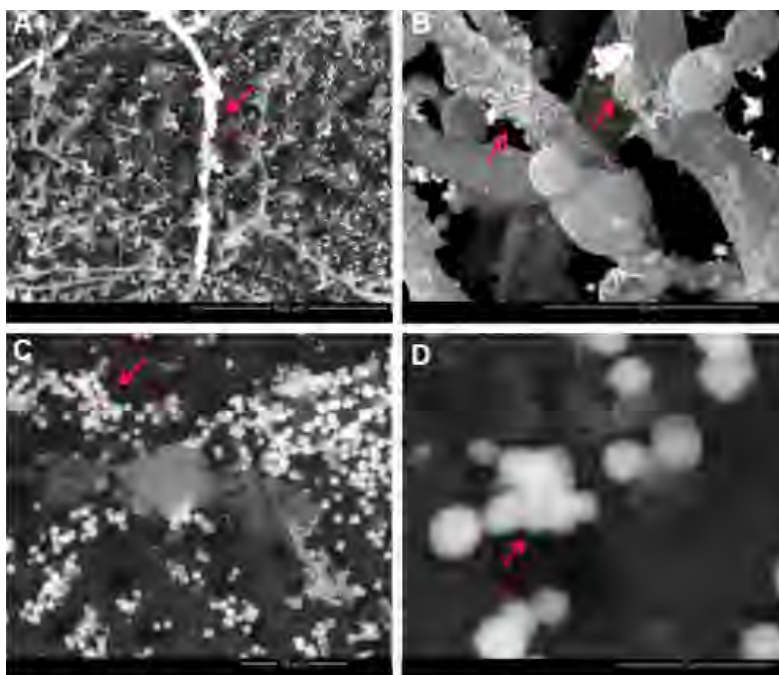


Figura 2. Micrograffías de microscopía electrónica de barrido de microorganismos expuestos a nanopartículas de plata. (A-B) biopelícula de *Candida albicans*, (C-D) biopelícula de *Staphylococcus aureus*. En (B) y (D) se muestra una amplificación en la que se observa a la mayoría de las células cubiertas por nanopartículas. Las flechas indican algunas de las células completamente cubiertas por nanopartículas de plata.

Mediante el desarrollo de métodos eco-amigables para la producción de NPs metálicas se ha logrado la síntesis de partículas de tamaños pequeños, con un rango de tamaños de 1-60 nm (Figura 1B-C). Numerosos artículos científicos han reportado que este rango de tamaño es óptimo para la inhibición de bacterias patógenas. Se ha reportado que las NPs de plata de tamaños iguales o menores a 10 nm son muy eficientes para la inhibición de patógenos porque cubren una mayor superficie del microorganismo, además que liberan una mayor cantidad de iones (Ag^+), los cuales son microbicidas incluso a bajas concentraciones. Esto fue corroborado con NPs de plata obtenidas mediante el hongo *N. crassa*. Se evaluaron las NPs para determinar su capacidad antifúngica contra tres especies del hongo patógeno *Candida*. Se obtuvieron mejores resultados con NPs de 1-10 nm de diámetro y la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida fue de 20 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, *C. parapsilopsis* y *C. glabrata* (Quester, 2014).

Las NPs de plata obtenidas mediante el uso de los hongos *Ganoderma* y *Lentinus* también son de tamaño pequeño, con un rango de 1-20

nm y mostraron excelente inhibición contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue menor o igual a 10 $\mu\text{g/mL}$ para estas bacterias. Los ensayos de citotoxicidad con fibroblastos mostraron que a las concentraciones necesarias para la inhibición de las bacterias la toxicidad fue baja. Adicionalmente, las NPs se evaluaron después de más de un año de haber sido sintetizadas y almacenadas a temperatura ambiente y se observó que conservan sus propiedades antimicrobianas. Estos resultados demuestran que las NPs obtenidas son estables y no pierden efectividad con el paso del tiempo. Sin embargo, como se mencionó previamente es necesaria su evaluación en modelos *in vivo* para poder proponerse como una alternativa en casos de infecciones cutáneas en donde los patógenos no respondan ante los antibióticos convencionales.

Agradecimientos

Gracias al Dr. Alfredo Vilchis Nestor por el apoyo para análisis de muestras de HRTEM, al M.C. Juan Manuel Martínez Andrade por los análisis de SEM y al LINAN-IPICYT.

Referencias

1. Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M.. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83: 42-48.
2. Castro-Longoria E, Moreno-Velázquez SD, Vilchis-Nestor AR, Arenas-Berumen E, Avalos-Borja M. Production of platinum nanoparticles and nanoaggregates using *Neurospora crassa*. *J Microbiol Biotechnol*. 2012 Jul;22(7):1000-4. doi: 10.4014/jmb.1110.10085.
3. Castro-Longoria, Ernestina. Fungal biosynthesis of nanoparticles, a cleaner alternative. En: *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology*. Springer. 2016; p. 323-351.
4. Castro-Longoria, E, GariboRuiz D, Martínez-Castro S. Myconanotechnology to treat infectious diseases: A perspective. *Fungal Nanotechnology*. Springer. 2017; p. 235-261.
5. Dowsett C. The use of silver based dressings in wound care. *Nurs Stand*. 2004; 19(7):56–60.
6. Lansdown AB. A review of the use of silver in wound care: facts and fallacies. *Br J Nurs* 13(6 Suppl).2004;6–17
7. Martinez-Andrade JM, Avalos-Borja M, Vilchis-Nestor AR, Sanchez-Vargas LO, Castro-Longoria E. Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment-A novel modification. *PLoS One*. 2018 Jan 18;13(1):e0190866. doi: 10.1371/journal.pone.0190866.
8. Quester K, Avalos-Borja M, Vilchis-Nestor AR, Camacho-López MA, Castro-Longoria E. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e77486. doi: 10.1371/journal.pone.0077486.
9. Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013 Nov-Dec;54-55:1-27. doi: 10.1016/j.micron.2013.07.003.
10. Quester K. The use of *Neurospora crassa* soluble proteins as bioreducing agent for the production of gold and silver nanostructures. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 2014; 166 pp.
11. Quester K, Avalos-Borja M, Castro Longoria E. 2016. Controllable synthesis of silver nanoparticles using fungal extract. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 7: 118-125. doi. org/10.4236/jbmb.2016.72013
12. Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLOS ONE*. 2014; 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0108876.

Importancia del tamaño del diámetro de nanopartículas de óxidos metálicos en respuestas celulares de adipocitos

Jesús Daniel Vázquez-Guevara^{1,2} y Karla Oyuky Juárez Moreno^{1,3}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.3> Ciudad de México

Resumen

La nanotecnología ofrece nuevos desafíos y enfoques para la creación, aplicación y evaluación de los nanomateriales tomando ventaja de las propiedades únicas de las estructuras en la nanoescala (1 a 100 nm). Es por ello, que surge la necesidad de optimizar la dimensión, morfología y química superficial de las nanopartículas (NPs), permitiendo que sus características se adapten a las diferentes aplicaciones biomédicas. Por lo anterior, revisamos los efectos del tamaño de uno de los tipos de nanomateriales más utilizados en la industria y la biomedicina, y su importancia comercial: las nanopartículas de óxidos metálicos (NPs-OM). En este trabajo se presenta una revisión sistemática sobre la comparación de los efectos toxicológicos de los diámetros de las NPs-OM en

diferentes modelos celulares expuestos a concentraciones de NPs-OM y periodos variables. Los resultados sugieren que existe bioacumulación de las NPs-OM en el tejido adiposo, así como citotoxicidad y alteraciones en la capacidad de diferenciación de preadipocitos (3T3-L1) a adipocitos maduros, también se reportan cambios en los mecanismos moleculares asociados al metabolismo de lípidos y las principales funciones celulares asociadas a los adipocitos.

Palabras clave:

Nanopartículas de óxidos metálicos, adipocitos, preadipocitos, 3T3-L1, nanotoxicología.

¹ Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Ensenada, BC., México.

² Posgrado en Nanociencias, CICESE.

³ Cátedras CONACYT Centro de Nanociencias y Nanotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Ensenada, BC., México.

*Autor de correspondencia: E-mail: kjuarez@fata.unam.mx ORCID: 0000-0002-6171-8601

Introducción

Las aplicaciones de los nanomateriales (NMs), dependen de sus propiedades fisicoquímicas y sus actividades biológicas, sin embargo, éstas no siempre son bien identificadas, por lo que se requiere de una amplia evaluación toxicológica en modelos *in vitro* e *in vivo* para brindar evidencias que soporten la seguridad de su uso. Esto permitirá realizar una valoración de los riesgos derivados de las exposiciones que surjan durante su fabricación, uso, comercialización y desecho.

Las NPs metálicas y las que contienen óxidos metálicos, son las que más se utilizan en diversos procesos industriales y se encuentran en productos de uso personal como los cosméticos y los alimentos. El uso de productos que contienen este tipo de NPs-OM, hace que se puedan internalizar y bioacumular en distintos órganos como en tejido adiposo, interfiriendo con el metabolismo celular debido a su tamaño, composición química, morfología, propiedades fisicoquímicas, y alta reactividad catalítica en la nanointerfaz.

Además de otros tipos de tejidos, las NPs-OM pueden bioacumularse en el tejido adiposo,

un tejido conjuntivo especializado en donde predominan las células conectivas llamadas adipocitos que almacenan energía en forma de triacilglicéridos (TAG) y pre-adipocitos, células de las etapas tempranas, que contienen marcadores como lipoproteínas y lipasas y aún no acumulan TAG.

Y aunque existen reportes previos de la bioacumulación de las NPs-OM en otros tipos de tejidos, pocas investigaciones reportan los efectos de la bioacumulación de este tipo de nanomateriales y el papel del tamaño de las NPs-OM. Por lo tanto, en esta revisión se compararán las respuestas celulares y moleculares de pre-adipocitos expuestos por diferentes tiempos a NPs-OM de diferente tamaño y composición. Es de particular interés conocer los efectos que las NPs tienen en la citotoxicidad y la capacidad de diferenciación de los preadipocitos así como determinar cuál es el efecto en los mecanismos moleculares asociados al metabolismo de lípidos y las principales funciones celulares asociadas a los adipocitos que han sido expuestos de forma aguda, subcrónica y crónica a las NPs-OM (Figura 1).

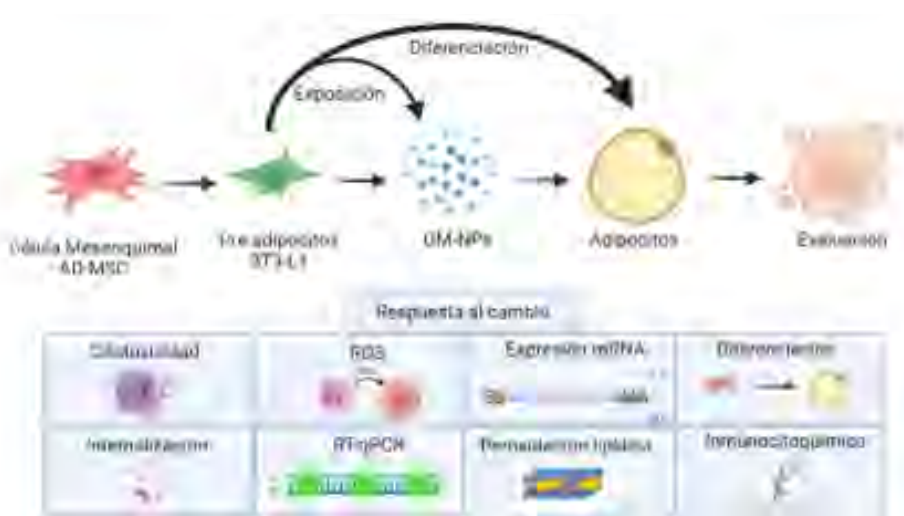
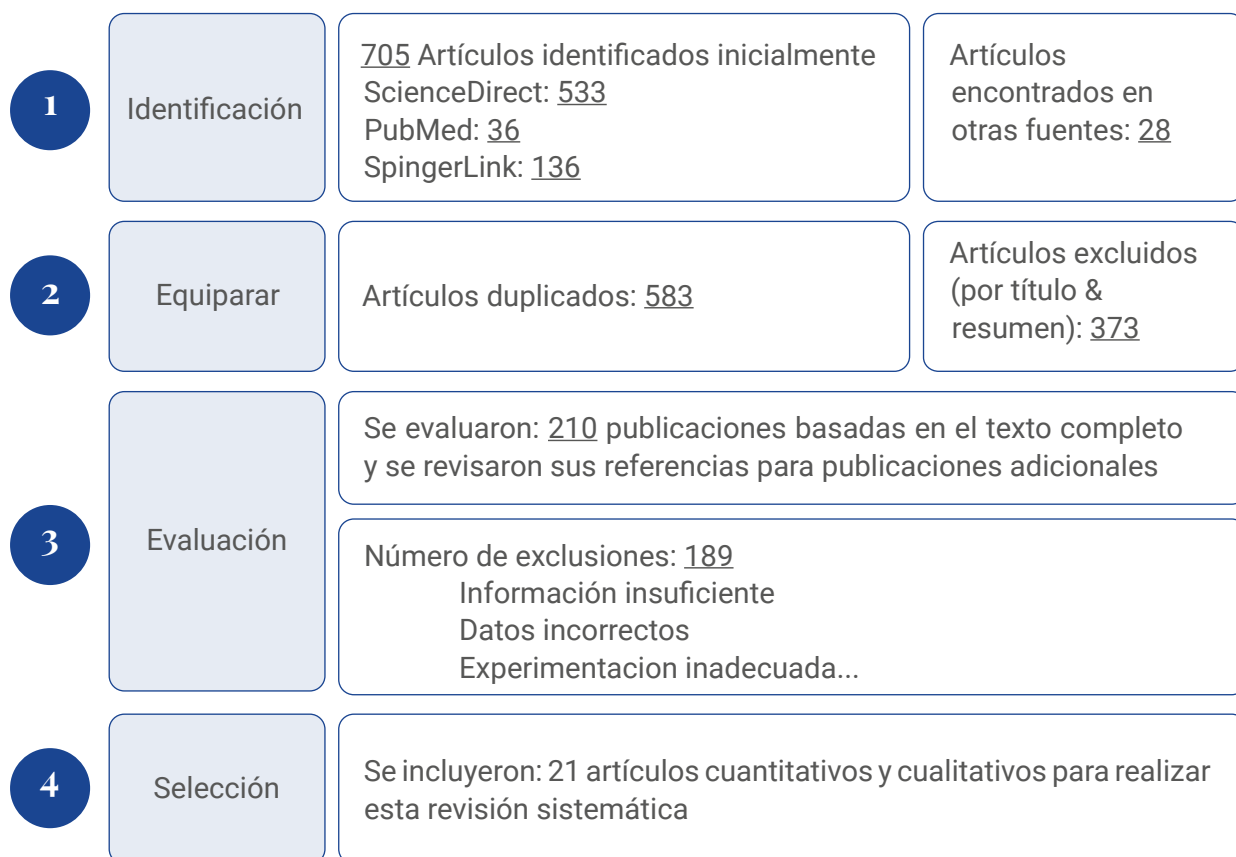


Figura 1. Evaluación de las respuestas celulares y moleculares de los preadipocitos 3T3-L1 expuestos a NPs-OM. Figura generada en Biorender.com

Metodología

Para la elaboración de esta revisión sistemática se siguió la metodología descrita en la Figura 2.



Palabras clave: oxide nanoparticles, 3T3-L1

Revisión: agosto 2021

Figura 2. Metodología general de búsqueda en literatura especializada.

Resultados

Los resultados de la búsqueda bibliográfica sobre los efectos de las NPs-OM en preadipocitos y adipocitos se presentan a continuación, los datos están ordenados con base a los efectos asociados al tamaño de las NPs-OM.

Respuestas celulares de los adipocitos expuestos a NPs-OM menores de 20 nm

Kobyliak *et al* (1) han investigado las propiedades antiinflamatorias de nanopartículas de dióxido de cerio (CeO_2) a concentraciones de 2.9 mL/kg y con tamaños aproximados a 5 nm durante 10 días en modelos de tejido hígado graso no alcohólico (NAFLD) de ratas asociado con la obesidad. Se reportaron efectos antiobesidad del CeO_2 , así como un cambio una reducción del contenido de citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-12Bp40) en el suero de rata y el restablecimiento de los niveles fisiológicos normales de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TGF-b). En comparación, Rocca *et al* (2) utilizó las NPs de CeO_2 *in vitro* e *in vivo* como una nueva formulación farmacéutica contra la obesidad. Se reportó que la administración intraperitoneal a concentraciones de 0.5 mg/kg de las CeO_2 (5-80 nm) durante 10 días, interferían con la vía adipogénica al reducir la transcripción del ARNm de genes implicados en la adipogénesis, y dificultando la acumulación de triglicéridos. La administración intraperitoneal de las NPs no tuvo efectos tóxicos, pero provocó una reducción significativa del aumento de peso y una disminución de los niveles plasmáticos de insulina, leptina, glucosa y triglicéridos en comparación con el grupo de control.

Biswas *et al* (3) fabricaron nanohíbridos (NH) de óxido de zinc (ZnO) y polifenol de 8 nm de

tamaño, las cuales exhibieron propiedades antioxidantes al ejercer una excelente actividad de eliminación de radicales libres y niveles bajos en la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) en adipocitos 3T3-L1 a concentraciones entre 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Además, el estudio demostró que el nanohíbrido tenía una actividad citoprotectora sobre el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , lo que indica una posible actividad terapéutica potencial del nanohíbrido sintetizado de ZnO-Polifenol.

Por otro lado, Ali *et al* (4) evaluó el efecto antidiabético a 30 días de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_2O_3) con un tamaño de 11.2 nm y concentraciones de 55 mg/kg en ratas con diabetes tipo 2, y comparó su efecto con tratamientos farmacológicos convencionales como la metformina. Interesantemente, se encontró que las NPs de Fe_2O_3 tenían actividades antiglicémica debido a su efecto sobre el contenido del coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma hepático. Además, se midieron niveles significativamente más altos de adiponectina y una disminución significativa de la proteína de unión al retinol 4, en comparación con las ratas diabéticas no tratadas. Por último, los resultados demostraron que las NPs de Fe_2O_3 inducían dislipidemia de una manera dependiente de la dosis y en un grado similar a la metformina o incluso mejor.

Marinozzi *et al* (5) han demostrado que las Fe_2O_3 NPs con un tamaño aproximado de 12.6 nm son absorbidas de manera eficiente y segura por los adipocitos. Con el objetivo de modular el contenido de lípidos, los adipocitos fueron expuestos a tratamientos con concentraciones de

10, 20, 50, y 100 $\mu\text{g/mL}$ de Fe_2O_3 NPs. Los resultados han mostrado una peroxidación lipídica significativa que persistió durante al menos 24 h en ausencia de muerte celular, daño o anaplasia (no diferenciación celular). Curiosamente, la expresión de la transcripción de la lipasa de triglicéridos adiposos (ATGL), un gen clave involucrado en la lipólisis canónica, no se moduló por la exposición a las NPs de Fe_2O_3 , lo que sugiere que éstas NPs tienen una participación en un mecanismo novedoso y alternativo en la lipólisis efectiva observada. En cambio, Zahera *et al* (6) sintetizaron NPs de óxido de cadmio (CdO) con un tamaño de 17 ± 1 nm mediante un método sol-gel, los resultados demostraron que estas NPs son agentes anti glicantes muy eficaces en particular contra los productos finales de la glucosilación avanzada al transcurrir 48 h. No se reportó citotoxicidad significativa para la línea celular 3T3-L1 a concentraciones de 100.0 $\mu\text{g/mL}$.

Efectos en los adipocitos ocasionados por la exposición a NPs-OM de tamaños de ≤ 20 nm a ≤ 50 nm

Muthuraman *et al* & Rocca *et al* (7,8); reportaron investigaciones independientes utilizando NPs de ZnO con el mismo tamaño de partícula: 20-50 nm y estudiando los efectos ocasionados en las células a las 48 h de exposición. Demostrando el efecto sobre la actividad y la expresión de enzimas antioxidantes en adipocitos murinos. Muthuraman reportó que la morfología de las células 3T3-L1 se alteró significativamente, pues las NPs de ZnO eran altamente citotóxicas en concentraciones comprendidas entre 10 - 30 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, Rocca evaluó las NPs de ZnO a concentraciones de 10 a 80 $\mu\text{g/mL}$ e indujeron un aumento en las ROS, la peroxidación de lípidos y formación de malondialdehído (MDA), generando reducción al glutatión (GSH) en los adipocitos

3T3-L1. Además, la actividad de la enzima antioxidante y la cantidad del transcrito también se regularon positivamente en las células 3T3-L1. En conclusión, los presentes estudios demostraron que las NPs de ZnO de tamaño comprendido entre 20–50 nm alteraron significativamente el estrés oxidativo y la actividad de la enzima antioxidante en los adipocitos de manera dosis-dependiente.

Atia *et al* (9) han demostrado el tratamiento de las células mesenquimales (MSC) derivadas de tejido adiposo (AD-MSC) contra la toxicidad grave en las células del hipocampo del cerebro causada por la exposición por 20 días a nanopartículas de óxido de aluminio (NPs de Al_2O_3) con un tamaño de 20 y a una concentración de 6 mg/kg. La administración de NPs de Al_2O_3 aumentaron los niveles de proteína de p53, caspasa-3 escindida, CYP2E1 y beta-amiloide ($\text{A}\beta$); por el contrario, el trasplante de AD-MSC reguló a la baja los niveles de estas proteínas. Además, las células del hipocampo tratadas con AD-MSC fueron protegidas de la toxicidad inducida por NPs de Al_2O_3 . Los resultados de histología revelaron que las AD-MSC aliviaron el daño severo en las células del hipocampo inducido por las NPs. En un estudio reportado por El-Gharbawy (10), han reportado NPs de ZnO de 20 nm conjugadas con estreptozotocina para restaurar la función y estructura de las células beta en un modelo de rata con diabetes tipo 2, las NPs fueron administradas por 10 días en concentraciones de 1, 3 y 10 mg/kg/día. Y se compararon los efectos de los tratamientos con o sin NPs de ZnO contra los efectos del fármaco Vildagliptin, utilizado en el tratamiento contra la diabetes *mellitus* tipo 2. El inhibidor (Vildagliptin) y las NPs de ZnO solos o en combinación disminuyeron significativamente la expresión de microRNA-103 y microRNA-143 en comparación con el grupo de diabéticos, lo

que indica efectos antidiabéticos. Las NPs de ZnO por sí solas dieron como resultado efectos antidiabéticos significativos, mientras que la adición de Vildagliptin resultó en un efecto sinérgico en la terapia de la diabetes.

López-Pascual *et al* (11) , han medido la actividad mitocondrial de NPs de CeO₂ con un tamaño de ≤ 25.3 nm en concentraciones de 10, 20, 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h de incubación. Describieron una disminución discreta en la actividad metabólica de los adipocitos, por lo tanto, este tipo de NPs se consideraron no citotóxicas, debido a que la actividad metabólica fue superior al 80%, en comparación con el control de crecimiento celular. Liu *et al* (12) han evaluado los efectos de las NPs de Fe₂O₃@Ru (164 nm, 10 μM) y NPs de Fe₂O₃@Se (130 nm, 10 μM), en adipocitos 3T3-L1 y mioblastos C2C12 durante 72 h. Detectaron que los niveles intracelulares de ROS medidos con el colorante fluorescente diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) no variaban, demostrando así que las RuNPs, Fe₂O₃@Ru y Fe₂O₃@Se no inducen un estrés oxidativo grave en las células después de 72 h de haber sido expuestas a las NPs.

Rather *et al* (13) han fabricado una malla de policaprolactona (PCL) funcionalizada con una nanofibra de gelatina (PGNPNF) y con NPs de CeO de tamaño ~ 42 nm mediante electrohilado, en el estudio evaluaron su potencial antioxidante. Se descubrió que la cristalinidad reducida del conjugado favorecía la rápida degradación de las nanofibras y la liberación de las NPs de CeO a concentraciones de 5 mM y 30 mM. La malla indujo una actividad similar de la enzima superóxido dismutasa (SOD), debido a que las NPs de CeO incorporadas, mejoran la proliferación de los adipocitos 3T3-L1 en un $\sim 48\%$, según lo confirmado por el ensayo de azul alamar y las micrografías SEM de células cultivadas.

Se sabe que las nanopartículas de óxido de magnesio (MgO) desempeñan un papel importante en la reducción de la producción de lípidos y glucosa sérica, por lo tanto, se proponen como un posible tratamiento para la diabetes. Es por ello, que Tan *et al* (14) reportaron la síntesis de un sistema de entrega de partículas multifuncional direccionado por aptámeros (DPAP por sus siglas en inglés), que alberga NPs de MgO de un tamaño cercano a los 50 nm en concentraciones entre los 2,500 y 3,500 $\mu\text{g/mL}$ y sintetizadas a través de métodos químicos para dirigir a las células 3T3-L1. La investigación mostró que los sistemas de partículas DPAP mejoraron la captación celular *in vitro*, así como la capacidad de inversión de la resistencia a la insulina de las células 3T3-L1.

La aplicación de un método de liberación celular controlada magnéticamente tiene un enorme potencial para mejorar la capacidad de retención celular en un tejido específico. Para evaluar la eficacia terapéutica de la focalización magnética celular, Wang *et al* (15) han evaluado NPs de Fe₂O₃ en concentraciones de 12.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y con tamaños comprendidos entre 40-60 nm. Los resultados revelaron que el direccionamiento magnético mejoró la tasa de retención de adipocitos trasplantados, facilitando la restauración de su estructura y función del tejido conectivo de acuerdo con los resultados del examen histológico y las pruebas urodinámicas.

Efectos en los adipocitos expuestos a NPs-OM con tamaños ≥ 50 nm

Continuando con la línea de las NPs superparamagnéticas (SPION), Jasmin *et al* (16) reportaron experimentos diseñados para investigar las propiedades biológicas, incluida la proliferación, viabilidad y capacidad de diferenciación de células mesenquimales (MSC) marcadas con

SPION y ferumóxido de tamaño 80-150 nm y concentraciones de 25 µg/mL. Estas NPs inducen la diferenciación celular a 24 h de exposición en adipocitos, osteocitos y condrocitos. Lee *et al* (17) reporta investigaciones utilizando NPs de Fe₂O₃ de tipo SION pero recubiertas por ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Estas NPs les confieren desplazamiento a sitios específicos utilizando simultáneamente la capacidad de localización y el magnetismo de las células madre. La exposición a las nanopartículas a una concentración de 40 µg / mL con tamaños promedio de 100 nm durante más de 96 h, no afectó la supervivencia o diferenciación celular, sin embargo, se identificó la vía potencial de internalización celular de las SPION mediante una endocitosis mediada por clatrina. Para finalizar, no se observaron efectos nocivos significativos en las células madre, lo que indica que las MSC pueden actuar como acarreadores de nanopartículas de manera eficaz.

Ramalingam *et al* (18) en su estudio relacionado con la proliferación de adipocitos 3T3-L1 en presencia de nanopartículas zero valentes (ZVZ-NPs) con un tamaño entre 85-95 nm, las células se expusieron durante 2, 5 y 7 días a concentraciones de ZVZ-NPs de 0 a 1000 µg/mL. Los resultados mostraron que el aumento de la concentración de ZVZ-NPs no provocó el crecimiento celular, por lo que exhibieron una baja toxicidad en las células 3T3-L1. Indicaron que las ZVZ-NPs no alteran el crecimiento y la diferenciación de células adipocitos.

Por el contrario, Chandrasekaram *et al* (19) han reportado los efectos de la exposición de células cancerígenas de mioblastoma

C2C12 cocultivado y en células sanas 3T3-L1 durante 36 h a NPs de ZnO (<100 nm). Se determinaron efectos citotóxicos de las NPs de ZnO para las células normales en concentraciones de 64 y 128 mg/L. Por lo tanto, se seleccionaron concentraciones de 0,8, 16 y 32 mg/L como aquellas que no inducían citotoxicidad y podrían ser utilizadas en futuras investigaciones. Hackenberg *et al* (20) han aportado en su investigación efectos citotóxicos de NPs de ZnO y TiO₂ con tamaños mayores a 100 nm (aglomerados) en MSC expuestas durante 3 semanas a concentraciones de 64 mg/L. Los resultados obtenidos fueron citotoxicidad de ZnO-NPs a 625 nm, mientras que no se observó citotoxicidad por TiO₂-NPs. La capacidad de diferenciación de las MSC generó linaje osteogénico y adiposo. la exposición a largo plazo reveló la persistencia de ambas NPs en el citoplasma y la capacidad de formar esferoides no se vio afectada. El análisis de citometría de flujo reveló una clara alteración de los marcadores de superficie celular CD 90 y CD 73. Sin embargo, la migración restringida podría influir críticamente en la capacidad de cicatrización de heridas. Pandurangan *et al* (21) han reportado un aumento en la expresión de mRNA causado por la exposición de NPs de ZnO en adipocitos durante 36 h a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 mg/L. Se reportaron alteraciones de entre un 42.5 y 40% en la proteína supresora de temores (p53). Por el contrario, la expresión de Bcl-2 se redujo en un 28.5%, mientras que la expresión de la caspasa-3 se incrementó en un 51.6%. Adicionalmente el contenido de malondialdehído incrementó en un 48% en los adipocitos debido al proceso de peroxidación lipídica generada por las ROS.

Conclusiones y discusión:

De forma general, los efectos que causa la exposición de los adipocitos a las diferentes NPs-OM se pueden resumir en la Tabla 1. Por ejemplo, se destacan los efectos ocasionados por NPs con tamaños menores a 20 nm a una importante reducción de la transcripción de ARNm de los genes de proteínas involucradas en el proceso de diferenciación celular, por ejemplo, la inhibición de la proteína retinol 4, la adiponectina y la leptina. Además, las NPs-OM de tamaños pequeños, inducen una disminución en la acumulación de triglicéridos, peroxidación lipídica y baja citotoxicidad significativa.

Aunque, la baja o nula toxicidad de las OM-NPs puede relacionarse al uso de concentraciones bajas de este tipo de nanomateriales, y a tiempos de incubación de las NPs con las células que van desde las 24 y 48 horas hasta los 10 a 30 días. El mecanismo de internalización de las NPs depende de las vías endocíticas. De este modo es sabido que las NPs con diámetros menores internalizan por endocitosis simple.

Para las NPs-OM de tamaños entre los ≤ 20 nm a ≤ 50 , se ha reportado alteraciones en las funciones enzimáticas antioxidantes, cambios en la expresión de mRNA, aumento

de ROS, peroxidación lipídica, resistencia a insulina y reducción de la producción de lípidos y glucosa sérica para el tratamiento de la diabetes. Los tamaños entre los 20 a los 50 nm no indican una citotoxicidad significativa quizá nuevamente se atribuya al uso de concentraciones bajas de NPs-OM durante 24 horas a 20 días. Se ha reportado que este tamaño de NPs ingresan a las células mediante endocitosis por caveolas.

Por último, los tamaños de NPs ≥ 50 nm tienen efectos claros en la viabilidad y proliferación celular, además de un notable papel en el proceso de diferenciación celular a partir de las AD-MSC. Se ha detectado un cambio significativo en la expresión de ARNm de las proteínas que inducen la muerte celular, peroxidación lipídica y generación de ROS. Así mismo, se reportan concentraciones inhibitorias a las cuales los adipocitos sufren una alta muerte celular en una forma dependiente de la concentración de las NPs utilizadas. Se ha determinado que los tamaños de NPs-OM superiores a los 50 nm son capaces de internalizarse a las células por endocitosis mediada por caveolas para las NPs-OM con tamaños promedio de 60 nm y que para el caso de las NPs-OM de 120 nm el proceso de internalización celular es por endocitosis mediada por clatrina.

NANOPARTÍCULAS	TAMAÑO (NM)	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (D)	MODELO CELULAR	RESPUESTA CELULAR	REF.
CdO Al ₂ O ₃	17 ± 1	100.0 µg/mL	2	3T3-L1	Citotoxicidad (↓), Antiglicantes (↑)	[6]
	20	6 mg/kg	20	AD-MSC	P53(↑), caspasa-3 escindida (↑), CYP2E1 (↑), beta-amiloide (Aβ) (↑)	[9]
CeO ₂	50	2,500 – 3,500 µg/m	1	3T3-L1	Captación celular (↑), Resistencia a la insulina (↑)	[14]
	5	2.9 mL/kg	10	Tejido NAFLD (rata wistar)	IL-1b (↑), IL-12Bp40(↑), IL-4 (↑), IL-10 (↑), TGF-b (↓)	[1]
CeO ₂	5-80	0.5 mg/ kg	10	Tejido NAFLD (rata wistar)	Adipogénesis (↓), Acumulación lipídica (↓) Peso corporal (↓) Niveles plasmáticos (↓)	[2]
CeO ₂	≤ 25.3	10, 20, 50-100 µg/mL	1	3T3-L1	Citotoxicidad (↓)	[11]
CeO ₂	~ 42	5 mM y 30 mM	14	3T3-L1	SOD (↑), Viabilidad celular (↑)	[13]
Fe ₂ O ₃	11.2	55 mg/kg	30	Ratas (Diabetes Tipo 2)	Coactivador 1-α (↓), Adiponectina (↑) Lípidos (dosis dependiente)	[4]
Fe ₂ O ₃	12.6	10, 20, 50, 100	1	3T3-L1	Peroxidación Lipídica (↑), Lipasa (ATGL) (↓)	[5]
Fe ₂ O ₃	40-60	12.5–50 µg/mL	1	AD-MSC	Retención celular (↑)	[15]
Fe ₂ O ₃	80-150	25 µg/mL	1	AD-MSC	Diferenciación (↑), Viabilidad celular (↑)	[16]
PLGA-Fe ₂ O ₃	100	40 µg / mL	4	AD-MSC	Desplazamiento (dosis dependiente) Internalización (↑)	[17]

NANOPARTÍCULAS	TAMAÑO (NM)	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (D)	MODELO CELULAR	RESPUESTA CELULAR	REF.
ZNO	8	0 - 100	1	3T3-L1	Antioxidante (↑), ROS (↓) Citotoxicidad (↓)	[3]
ZNO	20-50	10 - 30 µg/mL	2	3T3-L1	Citotoxicidad (dosis dependiente), ROS µg/mL (↑) Peroxidación lipídica (↑), Glutatión (GSH) (↓), Antioxidantes (↑)	[7]
ZNO	20-50	10 - 80 µg/mL.	2	3T3-L1	Expresión mRNA (↑), ROS (↑), Peroxidación lipídica (↑), Enzimas antioxidantes (↑)	[8]
ZNO	20-50	0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 mg/L	1.5	3T3-L1	P53 (↑), bcl-2 (↓), caspasa-3 (↑), Peroxidación lipídica (↑), ROS (↑)	[21]
ZNO	20	1, 3 y 10 mg/kg/día	10	Ratas (Diabetes Tipo 2)	microARN-103(↓), microARN-143 (↓)	[10]
ZVZ-NPS	85-95	0 a 1000 µg /mL	2,5 y 7	3T3-L1	Citotoxicidad (↓)	[18]
ZNO	<100	0,8, 16 y 32 mg/L	3	3T3-L1	Citotoxicidad (↑),	[13]
ZNO	100	0 a 64 mg/L	21	3T3-L1	Citotoxicidad (↑),	[20]

Tabla 1. Interacción de diferentes oxido metal nanopartículas con adipocitos

Referencias

1. Kobylak N, Virchenko O, Falalyeyeva T, Kondro M, Beregova T, Bodnar P, et al. Cerium dioxide nanoparticles possess anti-inflammatory properties in the conditions of the obesity-associated NAFLD in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017 1; 90:608–14.
2. Rocca A, Mattoli V, Mazzolai B, Ciofani G. Cerium oxide nanoparticles inhibit adipogenesis in rat mesenchymal stem cells: Potential therapeutic implications. *Pharmaceutical Research*. 2014; 31(11):2952–62.
3. Biswas P, Adhikari A, Mondal S, Das M, Sankar Bhattacharya S, Pal D, et al. Synthesis and spectroscopic characterization of a zinc oxide-polyphenol nanohybrid from natural resources for enhanced antioxidant activity with less cytotoxicity. In: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd; 2020. p. 3481–6.
4. Ali LMA, Shaker SA, Pinol R, Millan A, Hanafy MY, Helmy MH, et al. Effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on glucose homeostasis on type 2 diabetes experimental model. *Life Sciences*. 2020 15;245.
5. Marinozzi MR, Pandolfi L, Malatesta M, Colombo M, Collico V, Lievens PMJ, et al. Innovative approach to safely induce controlled lipolysis by superparamagnetic iron oxide nanoparticles-mediated hyperthermic treatment. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2017 1; 93:62–73.
6. Zahera M, Khan SA, Khan IA, Sharma RK, Sinha N, Al-Shwaiman HA, et al. Cadmium oxide nanoparticles: An attractive candidate for novel therapeutic approaches. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020 20;585.
7. Rocca A, Moscato S, Ronca F, Nitti S, Mattoli V, Giorgi M, et al. Pilot in vivo investigation of cerium oxide nanoparticles as a novel anti-obesity pharmaceutical formulation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2015 1; 11(7):1725–34.
8. Muthuraman P, Ramkumar K, Kim DH. Analysis of Dose-Dependent Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Adipocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014 20; 174(8):2851–63.
9. Atia MM, Alghriany AAI. Adipose-derived mesenchymal stem cells rescue rat hippocampal cells from aluminum oxide nanoparticle-induced apoptosis via regulation of P53, A β , SOX2, OCT4, and CYP2E1. *Toxicology Reports*. 2021 1; 8:1156–68.
10. El-Gharbawy RM, Emara AM, Abu-Risha SES. Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016 1; 84:810–20.
11. Lopez-Pascual A, Urrutia-Sarratea A, Lorente-Cebrián S, Martínez JA, González-Muniesa P. Cerium oxide nanoparticles regulate insulin sensitivity and oxidative markers in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
12. Liu Y, Liu Y, Zheng C, Huang N, Chen X, Zhu X, et al. Ru nanoparticles coated with γ -Fe₂O₃ promoting and monitoring the differentiation of human mesenchymal stem cells via MRI tracking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018 1;170:701–11.

13. Rather HA, Thakore R, Singh R, Jhala D, Singh S, Vasita R. Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-Gelatin electrospun fibers for wound healing application. *Bioactive Materials*. 2018 1;3(2):201–11.
14. Tan KX, Jeevanandam J, Pan S, Yon LS, Danquah MK. Aptamer-navigated copolymeric drug carrier system for in vitro delivery of MgO nanoparticles as insulin resistance reversal drug candidate in Type 2 diabetes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020 1;57.
15. Wang Y, Zhou S, Yang R, Rahman M, Sequeira RC, Cao N, et al. Magnetic targeting of super-paramagnetic iron oxide nanoparticle labeled myogenic-induced adipose-derived stem cells in a rat model of stress urinary incontinence. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2020 1;30.
16. Jasmin, Torres ALM, Nunes HMP, Passipieri JA, Jelicks LA, Gasparetto EL, et al. Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011 9;9.
17. Lee SH, Park DJ, Yun WS, Park JE, Choi JS, Key J, et al. Endocytic trafficking of polymeric clustered superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mesenchymal stem cells. *Journal of Controlled Release*. 2020 10;326:408–18.
18. Ramalingam V, Hwang I. Zero valent zinc regulates adipocyte differentiation through calpain family protein and peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mouse 3T3-L1 cells. *Process Biochemistry*. 2021 1;101:285–93.
19. Chandrasekaran M, Pandurangan M. In Vitro Selective Anti-Proliferative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Against Co-Cultured C2C12 Myoblastoma Cancer and 3T3-L1 Normal Cells. *Biological Trace Element Research*. 2016 1;172(1):148–54.
20. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Froelich K, Hagen R, Kleinsasser N. Functional responses of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to metal oxide nanoparticles in vitro. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013; 9(1):86–95.
21. Pandurangan M, Veerappan M, Kim DH. Cytotoxicity of Zinc Oxide Nanoparticles on Antioxidant Enzyme Activities and mRNA Expression in the Cocultured C2C12 and 3T3-L1 Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015 1;175(3):1270–80.

Nanoantibióticos en los tiempos del Cólera

Anaid Meza Villezcas¹ y Alejandro Huerta Saquero²

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.4> Ciudad de México

Resumen

El patógeno humano *Vibrio cholerae*, agente etiológico del cólera, es constantemente monitoreado debido a su virulencia, persistencia y antecedentes pandémicos. *V. cholerae* continúa siendo un organismo de importancia clínica debido a su rápida adaptación y reciente adquisición de resistencia a agentes antimicrobianos. En busca de un tratamiento alternativo, los nanoantibióticos se han reportado como efectivos agentes antimicrobianos en una gran variedad de bacterias. El objetivo de esta revisión es describir los mecanismos de defensa y estrategias de sobrevivencia que *V. cholerae* utiliza para resistir el efecto de los nanoantibióticos, así como presentar los reportes mas significativos en su uso y control de *V. cholerae*. Se reporta que *V. cholerae* emplea diversas estrategias de sobrevivencia y tiene la capacidad de adquirir elementos genéticos móviles extracromosómicos, lo cual la hace altamente persistente en los ecosistemas, así como un patógeno hiperinfectioso y multiresistente. Diversos nanoantibióticos

con actividad antimicrobiana han sido probados en el genero *Vibrio*. Para *V. cholerae* se reporta susceptibilidad a nanopartículas de Plata (AgNP), de óxido de Zinc (ZnONP), y de óxido de Cobre (CuONP), provocando alteraciones como estrés oxidativo, daño en integridad de membrana e incremento de la permeabilidad, daño en proteínas y DNA, cambios en la expresión de porinas y en genes relacionados a la formación de biopelículas, entre otras. Parece posible la aplicación de nanoantibióticos para en el tratamiento y control del cólera, sin embargo, es necesario conocer los mecanismos de resistencia y sobrevivencia de *V. cholerae* ante los nanoantibióticos, así determinar el grado de citotoxicidad *in vivo* para su posible aplicación biomédica.

Palabras clave:

Vibrio cholerae, nanoantibiótico, elementos genéticos móviles extracromosómicos, antimicrobiano, resistencia, biomédica.

¹ Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, departamento de Microbiología.

² Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, departamento de Bionanotecnología.

*Autor de correspondencia: E-mail: saquero@ens.cnyn.unam.mx ORCID 0000-0002-0156-6773

Introducción

El cólera, causado por la bacteria toxigénica *Vibrio cholerae*, es una enfermedad diarreica aguda que rápidamente puede progresar a choque hipovolémico, acidosis y ser fatal en pocas horas de no ser tratado (1,2). La bacteria se transmite vía fecal-oral, ya sea por transmisión de persona a persona o bien, a través de fluidos que se incorporan al ambiente contaminando cuerpos de agua y alimentos (3,4). El cólera ha sido una enfermedad recurrente desde su primera pandemia en 1817 (5). Nos encontramos en la 7ma pandemia desde 1961, y solo en el año 2019, 16 países reportaron mas de 450 000 casos y 900 muertes. La actual pandemia llegó a América en 1991, y a la fecha el país mas afectado a sido Haití, el cual de 2010 a 2020 suma un total de 820 461 casos y 9792 muertes (2). La mortalidad y la morbilidad del cólera son mucho menores ahora que en pandemias pasadas (6). Debido al tratamiento oportuno de la enfermedad, el cual consiste en rehidratación y tratamiento antibiótico (tetraciclinas, fluroquinolonas y azitromicina), la mortalidad pasó del 50% a ser de menos del 5% en la actualidad (6). Sin embargo, *V. cholerae* continúa siendo un organismo de importancia clínica debido a su rápida adaptación a condiciones ambientales adversas, así como a resistir el efecto de agentes antimicrobianos (7). En años recientes los tratamientos no han sido totalmente efectivos y se han asociado los brotes de las décadas pasadas a la aparición de *V. cholerae* multiresistente a antibióticos (MRA) (7). Ante este inevitable escenario, la nanotecnología ha trabajado arduamente en la búsqueda de alternativas para el control de microorganismos multiresistentes. En este artículo de revisión se describen (i) los mecanismos de defensa y estrategias de sobrevivencia de *V. cholerae*, (ii) los reportes mas significativos en el uso y aplicación de nanoantibióticos (nAbts) para el control de

Vibrio cholerae, con el objetivo de plantear un panorama real sobre la posibilidad de emplear a los nanoantibióticos en el tratamiento del cólera.

V. cholerae: mecanismos de defensa y estrategias de sobrevivencia

Vibrio cholerae es una bacteria Gram-negativa, aeróbica facultativa con morfología de coma (1), patógena de humanos. *V. cholerae* se encuentra en dos ambientes, (i) hábitat acuático (costas y estuarios) asociada a fitoplancton, zooplancton, crustáceos, bivalvos y sedimentos; y (ii) en el hospedero humano, disperso en el intestino causando la enfermedad del cólera (8,9). Diversos factores físicos, químicos y biológicos pueden llegar a generar estrés en los diferentes ambientes a los que se enfrenta *V. cholerae*. En el tracto gastrointestinal humano, *V. cholerae* está expuesto a pH ácido, ácidos biliares, osmolaridad elevada, limitación de hierro, péptidos antimicrobianos y periodos intermitentes de falta de nutrientes. Por otro lado, en los ambientes acuáticos, *V. cholerae* se enfrenta a la limitación de nutrientes, cambios extremos de temperatura, estrés oxidativo y depredación por bacteriófagos y protozoarios (8,9). Debido a esto, *V. cholerae* ha desarrollado la capacidad de emplear diversas estrategias de sobrevivencia como: (i) la activación de mecanismos de respuesta a estrés, (ii) expresión de movilidad flagelar y quimiotaxis, (iii) la adherencia o (iv) separación de superficies, y (v) el desarrollo de comunidades sésiles multicelulares. Esto se resume en la capacidad de cambiar entre una forma de vida móvil (planctónica - PL) a sésil (biopelícula - BP) en respuesta a cambios ambientales

(10). Ambas formas de vida tienen la capacidad de desarrollar mutaciones cromosómicas que pueden llegar a generar resistencia a antimicrobianos. Esto debido principalmente a la adquisición de elementos genéticos móviles extracromosómicos (EGM), mediante la transformación, la conjugación, la transducción y la fusión de vesículas de membrana externa que median la transferencia horizontal de genes, siendo esta la principal vía de aparición súbita de patógenos multiresistentes (7,11).

El análisis de la secuencia del genoma completo de cepas de *V. cholerae* clínicas y ambientales reveló que el genoma de la mayoría de los aislados recientes alberga elementos conjugativos integradores (ECI), plásmidos, superintegrones, elementos transponibles y secuencias de inserción, que son los principales portadores de los rasgos genéticos que codifican para resistencia a antimicrobianos. Diferentes genes de resistencia a los antimicrobianos identificados en *V. cholerae* pueden contribuir a la resistencia a antibióticos al facilitar uno de los siguientes tres mecanismos; (i) reducción de la permeabilidad o salida activa de los antibióticos, (ii) alteración de las dianas de los antibióticos mediante la introducción de modificaciones postranscripcionales o traduccionales y, (iii) hidrólisis o modificación química de los antibióticos (7). Ante esta problemática, el reto de generar nuevos tratamientos para el control de *V. cholerae* abre un amplio panorama de desarrollo en el área de nanotecnología con la propuesta de nAbts, los cuales presentan resultados prometedores que se describen en la siguiente sección.

Nanoantibióticos vs *V. Cholerae*

Los nanoantibióticos (nAbts) son nanomateriales metálicos (NM) antimicrobianos (12), conjugaciones de antibióticos y nanopartículas (nanobioconjugados) (13), o moléculas de antibióticos sintetizadas artificialmente en un rango de tamaño menor o igual a 100nm en al menos una de sus dimensiones (13,14).

Actualmente el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas se está enfocando en contrarrestar el rápido desarrollo de resistencia a antimicrobianos entre bacterias patógenas (7,12–15). Sin embargo, la adquisición de resistencia a antibióticos es un proceso evolutivo natural en donde diversos factores ambientales, densidad de la comunidad microbiana, uso indiscriminado de antibióticos, así como el mal manejo de residuos, pueden influir en su frecuencia de aparición (16); aunado a que no se han descubierto nuevos antibióticos en los últimos 35 años (13).

Los elementos químicos inorgánicos, en especial los metálicos, tienen propiedades antimicrobianas relevantes y presentan ventajas sobre sus equivalente orgánicos (antibióticos) (17,18). Los nAbts del tipo nanomateriales metálicos son sintetizados principalmente de plata, cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plomo (13–15,19). En los últimos años se ha hecho el esfuerzo en describir los mecanismos de acción de los NM. Estos se basan fundamentalmente en causar cambios morfológicos y estructurales, así como provocar alteraciones en el metabolismo o bien interacciones adversas con moléculas clave en el funcionamiento celular. Elucidar los mecanismos de acción de los nanomateriales antimicrobianos es complicado debido a que depende de diversos factores, que van desde las características de los nanomateriales, composición,

concentración, modificaciones superficiales, propiedades intrínsecas y/o tamaño; hasta el sistema biológico en el que se evalúa, como las especies bacterianas y su forma de vida (plantónica o biopelícula), medios de cultivo, condiciones de crecimiento, abundancia, y tiempo de cultivo (20–22). Por ejemplo, se ha descrito que la toxicidad de CuONP depende de diversos factores abióticos como la temperatura, la aeración y el pH (23). Se evaluó el efecto de CuONP en la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; la bacteria Gram-negativa mostró ser más susceptible que las Gram-positivas (24). También se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de las AgNP es mayor que el de las CuNP en *E. coli* y *S. aureus*, y las CuNP presentan mayor toxicidad que las ZnNP en *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* (21). Se ha descrito que la nanotoxicidad está generalmente asociada a la inducción de estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (25,26). Algunos de los nanomateriales que han presentado este mecanismo son las ZnONP, AgNP, CuNP, NP superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) entre otras (27–30). Se reporta que la producción de ROS interfiere con la formación de biopelícula

de *E. coli* y *S. aureus*. Por otra parte, se sabe que las NP son capaces de unirse por interacciones electrostáticas a la membrana bacteriana, causando alteraciones y daños en la integridad de la membrana, así como incrementando su permeabilidad (20,31). El estado de oxidación cero y el iónico de algunos metales producen radicales hidroxilo que causan daño en proteínas esenciales y en DNA. De manera particular se ha descrito que las ZnONP causan daño en la maquinaria de síntesis de proteínas, las NONP causan la modificación en proteínas esenciales y que los iones de Ag se unen al sulfuro, oxígeno y nitrógeno de moléculas biológicas esenciales e inhiben el crecimiento bacteriano (22,26).

La evaluación de nanomateriales antimicrobianos ha sido bien documentada para el género *Vibrio* (**Tabla 1**). *V. cholerae*, y otras especies del género como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* han mostrado ser susceptibles al efecto de diversos nanomateriales, como las nanopartículas de plata, óxido de cobre, óxido de zinc, boro, dióxido de titanio y nanocompuestos de zeolitas dopadas con Ag⁰ / Ag⁺, de ZEO-AgNP, ZEO-CuNP y ZEO-ZnNP (31,32,41–43,33–40).

ESPECIE	NANOANTIBIÓTICO	FORMA DE VIDA	MIC	MBC	REF.
	ZEO-AgNP	PL-BP	ND	4–8 µg/ml	Meza-Villezcas et al., 2019)
	ZEO-CuNP	PL-BP	ND	NP	Meza-Villezcas et al., 2019)
	ZEO-AgNP	PL-BP	ND	NP	Meza-Villezcas et al., 2019)
<i>V. cholerae</i>	AgNP	PL	16 µg/ml		(Keshari et al., 2020)
	Quitosano MgO	PL	1.5 mg/ml	2 mg/m	(Karthikeyan et al., 2021)

ESPECIE	NANOANTIBIÓTICO	FORMA DE VIDA	MIC	MBC	REF.
<i>V. cholerae</i>	ZnO-NP	PL	0.312mM		(Manzoor et al., 2016)
	AgNP	PL	2.5 mg/ml	5 mg/ml	(Sanchooli et al., 2018)
	ZnO-NP	PL-BP	SP(*)	ND	(Salem et al., 2015)
	ZnO -NP	PL-BP	SP(*)	ND	(Sarwar et al., 2016)
	Ag-NP	PL-BP	SP(*)	ND	(Salem et al., 2015)
	Ag-NP	PL-BP	SP(*)	ND	(Sarwar et al., 2016)
	GAL-Ag-NP	PL	SP(*)	SP(*)	(Gahlawat et al., 2016)
	AgNP	PL	10	ND	(Krishnaraj et al., 2010)
	silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	PL	50	ND	(Krishnani et al., 2012)
<i>V. parahae-molyticus</i>	AgNP en una Matriz biopolimérica de quitosano	PL	9	ND	(Davoodbasha et al., 2016)
	Silver/poly nanocomposito (Ag/PLA-NC)	PL	32	ND	(Shameli et al., 2015)
	Silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	PL	50	ND	(Krishnani et al., 2012)
<i>V. harveyi</i>	AgNP	PL	5	20	(Baskaralingam et al., 2012)
	silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	PL	40	ND	(Krishnani et al., 2012)
<i>V. alginolyticus</i>	AgNP	PL	ND	20	Davoodbasha et al., 2016)
<i>V. vulnificus</i>	AgNP en una Matrix biopolimerica de quitosano	PL	< 9	ND	Davoodbasha et al., 2016)

ESPECIE	NANOANTIBIÓTICO	FORMA DE VIDA	MIC	MBC	REF.
<i>V. cholerae</i>	CuO-NP	PL	2000	ND	(Rossetto et al., 2014)
	Dendrimeros de CuO en polietilenimina y poliamidoamina	BP	100	ND	(Mortimer et al., 2008)
	CuO-NP	BF	200	ND	(Heinlaan et al., 2008)
	Dendrimeros de ZnO en polietilenimina y poliamidoamina	BF	4	ND	(Mortimer et al., 2008)
	ZnO-NP	BF	100	ND	(Heinlaan et al., 2008)
	TiO ₂ -NP	BF	NP	ND	(Heinlaan et al., 2008)
	TiO ₂ -NP	BF	NP	ND	(Strigul et al., 2009)
	B-NP	BF	1200	ND	(Strigul et al., 2009)
	Al- NP	BF	NP	ND	(Strigul et al., 2009)

Abreviaciones: PL, células planctónicas; BF, biopelícula; MIC, concentración mínima inhibitoria; MBC, concentración mínima bactericida; NP, nanopartículas; SP, si presenta actividad antimicrobiana; (*), determinado en NP/ml; ND, no determinado; NP, no presenta actividad antimicrobiana.

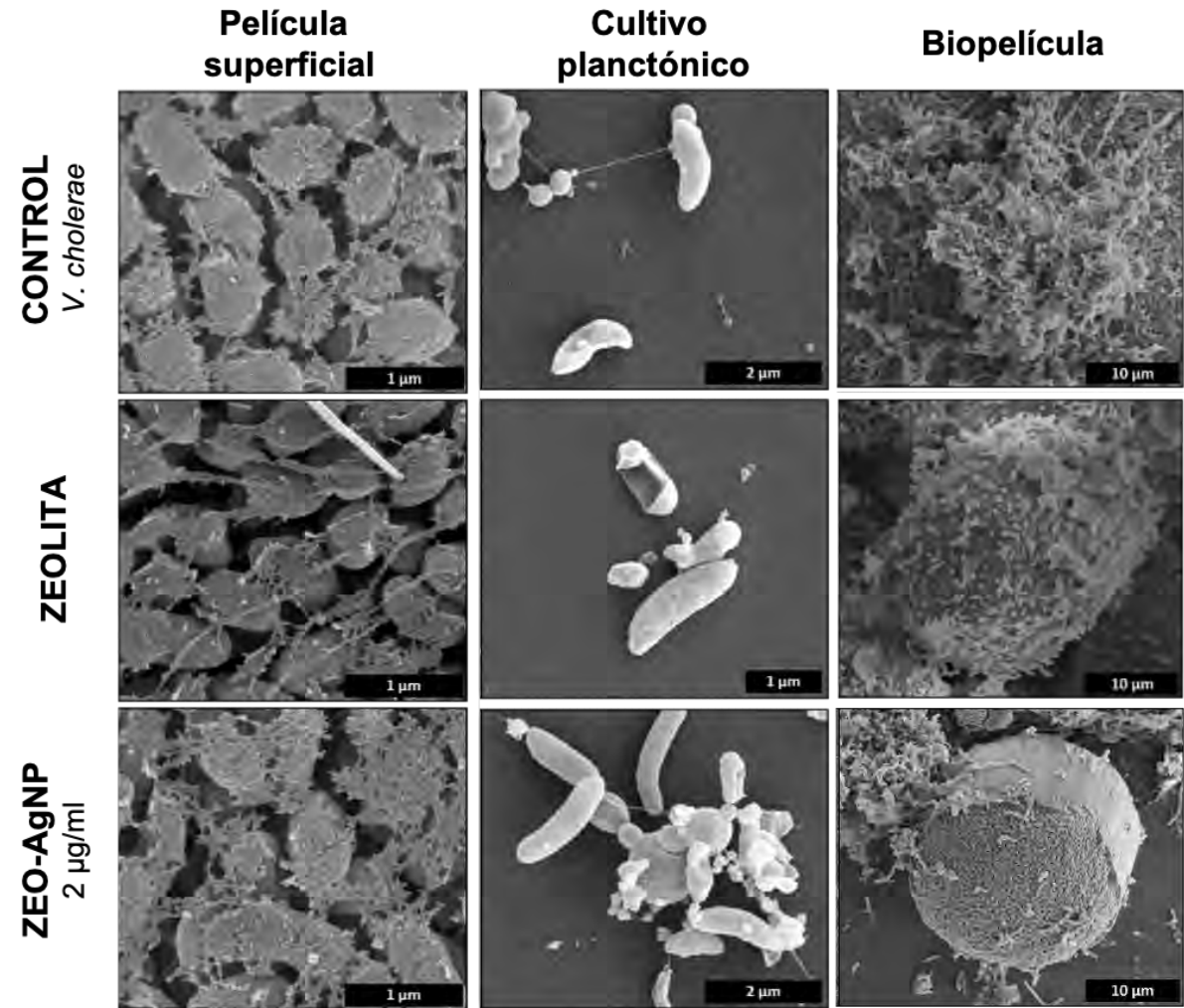
Tabla 1. Reportes de la evaluación de nanoantibióticos en el género *Vibrio*.

Se ha reportado que ZnONP y Ag-NP presentan efecto antibacteriano en *V. cholerae*; dicho efecto es dependiente de (i) la forma de vida (planctónica o biopelícula) (ii) concentración del nanocompuesto y (iii) biotipo (31,39,42). Se evaluaron ZnONP y AgNP en cultivos PL y BP de *V. cholerae*, se reporta que el efecto antibacteriano

es superior para ZnONP que para AgNP en cultivos planctónicos. Sin embargo, las AgNP inhiben la formación de las biopelículas y ZnONP incrementa la abundancia relativa de la biopelícula (31). En un análisis comparativo entre la forma de vida planctónica y 2 biopelículas, la película superficial (formada entre la interfase agua

y medio de cultivo) y la biopelícula adherida al sustrato (formada en el fondo del pozo de cultivo) se reporta la aplicación de ZEO-AgNP, ZEO-CuNP y ZEO-ZnNP, en donde solo ZEO-AgNP evitó la formación de la película superficial a 4 µg/ml y eliminó las células planctónicas y la formación de la biopelícula del sustrato a 8 µg/ml (43). ZEO-CuNP y ZEO-ZnNP no presentaron actividad antimicrobiana, sin embargo, el número de células se vio reducido significativamente respecto a los controles a concentraciones de 420 µg/ml. A concentraciones subletales, se puede observar por microscopia

electrónica de barrido malformaciones en las células planctónicas en cada tratamiento; mientras que las células de las biopelículas no muestran malformaciones aparentes y logran crecer adheridas a las Zeolitas igual que en el control sin metales (**Figura 1**). Se reportan cambios en la expresión relativa de genes asociados a la formación de la biopelícula, con diferencias significativas entre tratamientos y la abundancia relativa de proteínas de membrana externa, lo que sugiere una co-regulación entre factores de virulencia y asociación de la biopelícula (43).



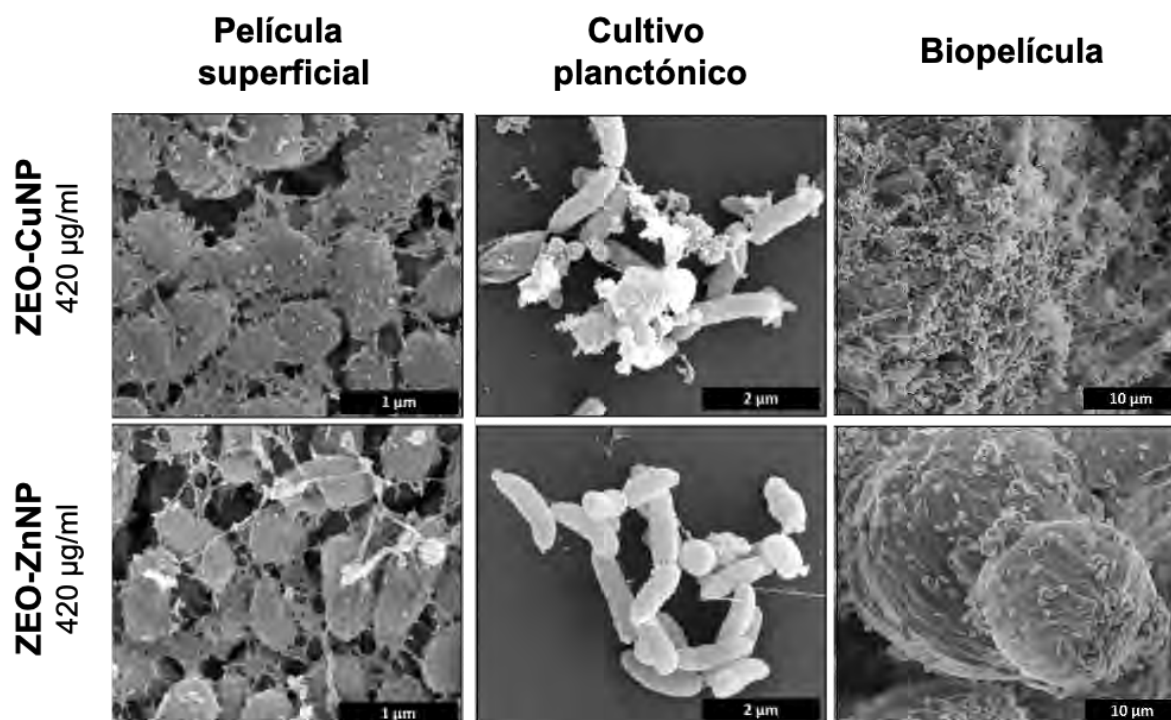


Figura 1: Análisis ultraestructural por microscopia electrónica de barrido de la película superficial, células planctónicas y biopelícula de *Vibrio cholerae* tratada con zeolitas dopadas con Ag, Cu y Zn. Figura modificada de Meza-Villezcás et al. 2019.

La susceptibilidad de *V. cholerae* ante nanomateriales depende de la concentración y es diferente entre especies. Keshari (2018) determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) de AgNP de 20 nm en *Citrobacter* (16 µg/ml), *Salmonella typhi* (16 µg/ml), *Enterococcus faecalis* (4 µg/ml), *E. coli* (8 µg/ml), *Pseudomonas vulgaris* (8 µg/ml), y *Vibrio cholerae* (16 µg/mg), reportando que *V. cholerae* es de las bacterias que requiere mayor concentración de AgNP para inhibir su crecimiento (44). Karthikeyan (2021) evaluó NP de óxido de magnesio en *V. cholerae* y *E. coli*, reporta que *V. cholerae* es menos susceptible que *E. coli* con una CMI de 1.5 mg/ml, CMI de 1.2 mg/ml respectivamente (45). Manzoor y colaboradores (2016) reportan la actividad antimicrobiana de ZnO-NP de 20 nm en *Campylobacter jejuni* (CMI = 0.156 mM), *Escherichia coli* enteropatógena (CMI = 0.156 mM), *Vibrio cholerae* (CMI = 0.312 mM) y *Staphylococcus aureus* (CMI = 0.625

mM), siendo de igual manera, *V. cholerae* menos susceptible al tratamiento que *E. coli* y *C. jejuni* pero más sensible al tratamiento que *S. aureus* (46). Sanchooli (2018) reporta el efecto antimicrobiano de AgNP en donde con una CMI = 2.5 mg/ml y una CMB = 5 mg/ml *V. cholerae* es menos susceptible al efecto que *Yersinia ruckeri* and *Listeria monocytogenes* (47).

El efecto de ZnONP es dependiente del biotipo, y se ha reportado que el biotipo El Tor es más susceptible que el biotipo clásico en ambas formas de vida de *V. cholerae* (31,39). También se ha reportado que las ZnONP y AgNP alteran la forma y tamaño de las células, y que las ZnONP provocan un incremento en la fluidez de la membrana celular, un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y que causan daño en el DNA (31,42).

Otro efecto observado es el reportado por Sarwar (2017) quien observó que las NP de ZnO forman un complejo con la toxina del cólera (CT), que parece interrumpir la estructura secundaria de la CT y bloquear su interacción con el receptor de la proteína GM1 en la membrana plasmática en las células intestinales (HT-29) y, por lo tanto, reducir la captación de CT en las células. En el rango de 2,5 a 10 µg/ml, las ZnONP no mostraron citotoxicidad en las células renales (HEK293) y HT-29; y se concluye que las ZnONP previenen el primer paso en la translocación de la toxina del cólera hacia las células epiteliales intestinales sin ejercer efectos tóxicos medibles sobre las células HEK293 y HT-29 (48).

Conclusiones

La aplicación de nAtbs en el tratamiento del cólera es posible. Sin embargo, aún son muchas las incógnitas que quedan por resolver respecto a mecanismos de resistencia y sobrevivencia, así como citotoxicidad en los modelos animales. El análisis de la literatura nos enseña que falta establecer y formalizar protocolos de evaluación de nAtbs en donde los tratamientos sean normalizados a concentraciones establecidas y condiciones de cultivo predeterminadas, para lograr un análisis comparativo entre los reportes. También, análisis de citotoxicidad en modelos animales para sembrar las bases para su aplicación en humanos. Los nanoantibióticos son ya una opción en tratamientos y descontaminación de agua, pero el camino a su aplicación biomédica aún está en desarrollo.

Método

Realizamos una revisión sistemática de la literatura publicada para evaluar la aplicación de nanoantibióticos en *Vibrio cholerae*. Inicialmente se realizó una búsqueda en PubMed con los términos "cholera" O "*Vibrio cholerae*" que arrojó 35 666 y 12 931 publicaciones respectivamente; se aplicó el filtro a publicaciones del tipo revisión y libros en los últimos 5 años y la búsqueda se redujo a 349 y 148 publicaciones. Una segunda búsqueda se realizó con los términos "nanoantibiotics" o "nano antibiotics" con 137 y 3277 resultados respectivamente; se aplicó el filtro de publicaciones del tipo revisión en los últimos 5 años y la búsqueda se redujo a 27 y 210 publicaciones. Se realizó la búsqueda de "*Vibrio cholerae*" y "nano antibiotics" y resultaron 5 artículos, seleccionados 4 para esta revisión. Se buscó también como "*Vibrio cholerae*" y "antimicrobial nanomaterials" con 33 resultados en la búsqueda, se seleccionaron 5 artículos. También se seleccionaron artículos de los sugeridos como recomendados en *Science-direct* tras descargar los artículos. En total se seleccionaron 48 artículos de los cuales se realizó un análisis y se extrajo la información aquí reportada.

Referencias

1. Fanous M, King KC. Cholera. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021-.Vol. 3. p. 10. [Actualizado el 4 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470232/>
2. World Health Organization. International Coordination Group on Vaccine Provision for Yellow Fever: Report of the Annual Meeting. 2019.
3. Deen J, Mengel MA, Clemens JD. Epidemiology of cholera, Vaccine [Internet]. 2020; Volume 38: Pages A31-A40. Disponible en: doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.078.
4. Lonappan S, Golecha R, Balakrish Nair G. Contrasts, contradictions and control of cholera. Vaccine [Internet]. 2020;38:A4-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.022>
5. Wolfe M, Kaur M, Yates T, *et al.* A systematic review and meta-analysis of the association between water, sanitation, and hygiene exposures and cholera in case control studies. Am J Trop Med Hyg. 2018;99(2):534-45.
6. Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, *et al.* Cholera. Lancet [Internet]. 2017;390(10101):1539-1549. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617305597>
7. Das B, Verma J, Kumar P, *et al.* Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. Vaccine [Internet]. 2020;38:A83-92. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.031>
8. Almagro-Moreno S, Pruss K, Taylor RK, Harris J, LaRocque R, Qadri F, *et al.* Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. Bliska JB, editor. PLOS Pathog. 2015;11(5):e1004787.
9. Teschler J, Zamorano-Sánchez D, Uta-da AS, Warner CJA, Wong GCL, Lington RG, *et al.* Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2015;13(5):255-68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3433>
10. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. [Internet]. Baker S, editor. PLoS Negl Trop Dis 2016;10(2):e0004330. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
11. Bag S, Ghosh TS, Banerjee S, Mehta O, Verma J, Dayal M, *et al.* Molecular Insights into Antimicrobial Resistance Traits of Commensal Human Gut Microbiota. Microb Ecol. 2019;77(2):546-57.
12. Cheeseman S, Christofferson AJ, Kariuki R, Cozzolino D, Daeneke T, Crawford RJ, *et al.* Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. Adv Sci. 2020;7(10).
13. Prasad P, Gupta S. Nanobioconjugates: Weapons against Antibacterial Resistance. ACS Appl Bio Mater. 2020;3(12):8271-85.
14. Mamun MM, Sorinolu AJ, Munir M, Veje-rano EP. Nanoantibiotics: Functions and Properties at the Nanoscale to Combat Antibiotic Resistance. Front Chem. 2021;1-23.
15. Muzammil S, Hayat S, Fakhar-eAlam M, Aslam B, Siddique MH, Nisar MA, *et al.* Nanoantibiotics: Future nanotechnologies to combat antibiotic resistance. Front Biosci - Elit. 2018;10(2):352-74.
16. Sheard DE, O'Brien-Simpson NM, Wade JD, Separovic F. Combating bacterial resistance by combination of antibiotics with antimicrobial peptides. Pure Appl Chem. 2019;91(2):199-209.

17. Dong B, Belkhair S, Zaarour M, Fisher L, Verran J, Tosheva L, et al. Silver confined within zeolite EMT nanoparticles: preparation and antibacterial properties. *Nanoscale* [Internet]. 2014;6:10859–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C4NR03169E>
18. Campoccia D, Montanaro L, Renata C. Biomaterials A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(34):8533–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
19. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76–83. Disponible en: doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
20. Vazquez-Muñoz R, Meza-Villezcás A, Fournier PGJ, Soria-Castro E, Juárez-Moreno K, Gallego-Hernández AL, et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224904. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0224904.
21. Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IR de, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2012;30(10):499–511. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
22. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ, . Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(6):371–84. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3028>
23. Pramanik A, Laha D, Bhattacharya D, Pramanik P, Karmakar P. A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012;96:50–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.021>
24. Baek YW, An YJ. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb2O3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci Total Environ* [Internet]. 2011;409(8):1603–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>
25. Norman RS, Stone JW, Gole A, Murphy CJ, Sabo-attwood TL, Liu SQ, et al. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(6):371–84. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3028>
26. Jamil B, Bokhari H, Imran M. Mechanism of Action: How Nano-Antimicrobials Act? *Curr Drug Targets*. 2017;18(3):363–73.
27. Subbiahdoss G, Sharifi S, Grijsma DW, Laurent S, Van Der Mei HC, Mahmoudi M, et al. Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Acta Biomater* [Internet]. 2012;8(6):2047–55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.002>
28. Feris K, Otto C, Tinker J, Wingett D, Punnoose A, Thurber A, et al. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir*. 2010;26(6):4429–36.

29. Khan AU. Medicine at nanoscale: A new horizon. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2997–8.
30. Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Shanker R, Dhawan A. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere* [Internet]. 2011;83(8):1124
31. Sarwar S, Chakraborti S, Bera S, Sheikh IA, Hoque KM, Chakrabarti P. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae* : Variation in response depends on biotype. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(6):1499– 509. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.02.006>
32. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, *et al.* Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* [Internet]. 2008;71(7):1308–16. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507014919>
33. Mortimer M, Kasemets K, Heinlaan M, Kurvet I, Kahru A. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2008 Aug;22(5):1412–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233308000490>
34. Strigul N, Vaccari L, Galdun C, Wazne M, Liu X, Christodoulatos C, *et al.* Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination* [Internet]. 82. 2009 Available Nov;248(1–3):771from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.01.013>
35. Vaseeharan B, Ramasamy P, Chen JC. Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Lett Appl Microbiol*. 2010 Apr;50(4):352-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02799.x.
36. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Mar 1;76(1):50-6. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.008.
37. Krishnani KK, Zhang Y, Xiong L, Yan Y, Boopathy R, Mulchandani A. Bactericidal and ammonia removal activity of silver ion-exchanged zeolite. *Bioresour Technol*. 2012 Aug;117:86-91. doi: 10.1016/j.biortech.2012.04.044.
38. Rossetto AL, Melegari SP, Ouriques LC, Matias WG. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Sci Total Environ*. 2014 Aug 15;490:807-14. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.056. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24907615.
39. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratz G, Prassl R, Goessler W, Reidl J, Schild S. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2015 Jan;305(1):85-95. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25466205; PMCID: PMC4300426.

40. Shameli, K., Ahmad, M.B., Al-Mulla, E.A.J. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles on talc composites. *Res Chem Intermed* 2015; 41, 251–263 Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1188-y>
41. Davoodbasha M, Kim SC, Lee SY, Kim JW. The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Sep 1;605:49-58. doi: 10.1016/j.abb.2016.01.013.
42. Gahlawat G, Shikha S, Chaddha BS, Chaudhuri SR, Mayilraj S, Choudhury AR. Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents against cholera. *Microb Cell Fact.* 2016 Feb 1;15:25. doi: 10.1186/s12934-016-0422-x.
43. Meza-Villezcás A, Gallego-Hernández AL, Yildiz FH, Jaime-Acuña OE, Raymond-Herrera O, Huerta-Saquero A. Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholerae* lifestyles: Pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. *PLoS One.* 2019 Jun 12;14(6):e0217869. doi: 10.1371/journal.pone.0217869.
44. Keshari AK, Srivastava R, Singh P, Yadav VB, Nath G. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *J Ayurveda Integr Med.* 2020 Jan-Mar;11(1):37-44. doi: 10.1016/j.jaim.2017.11.003.
45. Karthikeyan C, Sisubalan N, Sridevi M, Varaprasad K, Ghouse Basha MH, Shucai W, Sadiku R. Biocidal chitosan-magnesium oxide nanoparticles via a green precipitation process. *J Hazard Mater.* 2021 Jun 5;411:124884. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124884.
46. Manzoor U, Siddique S, Ahmed R, Nooren Z, Bokhari H, Ahmad I. Antibacterial, structural and optical characterization of mechano-chemically prepared ZnO nanoparticles. *PLoS One.* 2016; 11(5):112.
47. Sanchooli N, Saeidi S, Barani HK, Sanchooli E. In vitro antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized using verbena officinalis leaf extract on *Yersinia ruckeri*, *Vibrio cholera* and *Listeria monocytogenes*. *Iran J Microbiol.* 2018; 10(6):400–8.
48. Sarwar S, Ali A, Pal M, Chakrabarti P. Zinc oxide nanoparticles provide anti-cholera activity by disrupting the interaction of cholera toxin with the human GM1 receptor. *J Biol Chem.* 2017 Nov 3;292(44):18303-18311. doi: 10.1074/jbc.M117.793240

Nanopartículas y neurodegeneración

Lorena Velázquez Álvarez¹, José de Jesús Rivera Sánchez²

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277

<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.5> Ciudad de México

Las enfermedades neurodegenerativas son en la actualidad las patologías mas discapacitantes que afectan a la población mundial; posicionándose en años recientes entre las primeras cinco causas de muerte, sólo después de las enfermedades cardiacas, el cáncer y el infarto cerebral. Al menos un siglo ha transcurrido desde el descubrimiento de las enfermedades neurodegenerativas, y aún se necesita mucha investigación para tener pruebas diagnósticas y tratamientos efectivos. En el informe de carga global de enfermedades, se estima que los trastornos neurológicos neurodegenerativos causaron alrededor de 250 millones de años de vida perdidos por discapacidad, lo que representa el 10.2% de años de vida perdidos por discapacidad mundiales, y 9 millones (16.8%) de las muertes globales lo cual lo convierte en un problema de salud publica mundial (1).

El termino neurodegeneración desde el punto de vista etimologico se compone del prefijo “neuro” que ha sido designado a células nerviosas, es decir, neuronas, y “degeneración”, que se refiere en el caso de tejidos y órganos, a un proceso de perdida de estructura y/o función; así pues, en el sentido estricto de la palabra, neurodegeneración corresponde a cualquier condición patológica que afecte principalmente a las neuronas y lleve a su desaparición. Las enfermedades cuyas base fisiopatológica

incluye a la neurodegeneración representan un grupo clínicamente muy heterogéneo, con expresiones patológicas que afectan subconjuntos específicos de neuronas en sistemas anatómicos y funcionales específicos, predominantemente a aquellas encargadas de funciones motoras y cognitivas, cuyo origen permanece aún desconocido y progresan de manera incesante y/o implacable.

Hasta ahora la mayor parte de la atención se ha centrado sólo en unas cuantas de ellas: la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, La enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, también se consideran parte de este grupo, para las cuales es la edad el principal factor de riesgo, resultado de la transición demográfica y epidemiología que se ha dado a lo largo de éstas ultimas décadas, y para las cuales las terapias curativas se han visto obstaculizada por las limitaciones de nuestro conocimiento de las causas y los mecanismos implicados (2, 3).

La mayoría de estas enfermedades se deben a la confluencia de cambios relacionados con el envejecimiento, factores ambientales y genéticos, aún en estudio (4); así pues, podemos decir que la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y los trastornos metabólicos contribuyen de manera directa en el mal plegamiento, agre-

¹ Médico adscrito al servicio de Neurología.

² Jefe de servicio de Geriatria Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

*Autor de correspondencia: E-mail: saquero@ens.cnyn.unam.mx ORCID

0000-0002-0156-6773

gación de proteínas y muerte celular por apoptosis, considerada la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (5).

Es bien sabido que el cerebro es altamente sensible a toxinas en el torrente sanguíneo, y es precisamente por ello que para su adecuada función requiere un microambiente especializado (6), en parte dado por la barrera hematoencefálica, que es una barrera vascular, pero, sus características se definen por la interacción estrecha y multifuncional entre células endoteliales, astrocitos, pericitos, microglía y neuronas, conocida comúnmente como unidad neurovascular, que impide el movimiento de moléculas entre las células y por tanto su paso al sistema nervioso central (7,8).

Adicionalmente a dicha barrera, la bomba de glicoproteína P (P-gp) presente en las células endoteliales, participa en la protección del sistema nervioso expulsando de manera activa moléculas, consideradas citotóxicas, unidireccionalmente a través de la membrana apical y en el espacio luminal, eliminando de este modo moléculas extrañas que pasaron por alto la barrera hematoencefálica (8-9).

La característica común entre las enfermedades neurodegenerativas, y de gran importancia en la cadena de eventos a partir de los cuales resultan, son los cambios a nivel de la barrera hematoencefálica (sugiriéndose incluso la existencia de patrones de afectación en cada una de ellas)(10,11), que se traducen en cambios morfológicos y en su permeabilidad, la cual se ve aumentada, y que puede promover procesos inflamatorios, permitiendo la infiltración de células inmunológicas y mediadores inmunes, que podrían por se contribuir y/o acelerar neurodegeneración (12,13), sin embargo a pesar de dichos cambios en la permeabilidad, existe una limitación importante para el suministro eficiente de fármacos al sistema nervioso central, ya que la mayoría de

la terapéutica convencional actual es de alto peso molecular (anticuerpos, péptidos y proteínas >500 Da) incapaces de cruzar por si mismos la barrera hematoencefálica; y hasta el momento ninguno de ellos frena la progresión de dichas patologías, por lo que entre las estrategias mas prometedoras, actualmente postuladas se encuentra: el trasplante de células madre, a menudo directamente en el cerebro, aun en vías de investigación, y el uso de nanopartículas poliméricas o lipofílicas (con un tamaño menor a 100 nm) (15), las cuales permitirían la administración de fármacos cargados, y macromoléculas, mediante la absorción, atrapamiento o unión covalente a las mismas, y posterior recubrimiento con tensioactivos (estos incluyen, pero no son limitados, a la apolipoproteína E, B-100, A-I, transferrina, anticuerpos antitransferrina, insulina y anticuerpos antiinsulina, entre otros), permitiendo así su endocitosis y posteriormente su tránsito a través de la célula convirtiéndolas en un caballito de troya a través de la barrera hematoencefálica (16).

Lo anteriormente comentado se conoce como nanoteranóstico, y es definido por Zhang et al (2018), como: la inyección del nano-agente a través de diferentes partículas del fármaco, que después de alcanzar el área objetivo del cuerpo, en este caso el cerebro, pierde su capa, lo cual resulta en la liberación de los agentes activos (17); esto ayuda a apuntar específicamente hacia las moléculas o neuronas que están causando el trastorno, y es precisamente su selectividad la que según Tripathy et al (2018) lo que ha hecho que sea el centro de atención en la terapéutica actual (18), permitiendo así mismo la provisión de opciones terapéuticas y medicamentos personalizados a decir de Assaraf et al (2014) (19).

Esta área del conocimiento de presenta de manera prometedora y variada en sus posibles herramientas terapéuticas y

otras como posibles agentes deletéreos, algunas de las nanopartículas estudiadas (carbón, cobalto, aluminio, silica y ceria, entre otras) participan en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, causando alteraciones en el plegamiento de las proteínas, las cuales tienden a agregarse teniendo un efecto tóxico a nivel neuronal que va a llevar a la apoptosis de dicha célula, mediante mecanismos poco entendidos aun; otras tienen posibles usos terapéuticos y/o diagnósticos, y serán en las que se centrará el presente escrito.

El factor de crecimiento nervioso es uno de los más esenciales para el crecimiento neuronal, imprescindible en la reparación que intenta llevarse a cabo en las patologías neurodegenerativas, sin embargo su aplicación es limitada debido a su lenta difusión y corta vida media, la principal limitación es que no puede transportarse fácilmente a través de la barrera hematoencefálica por lo que se propuso su recubrimiento con oro con lo cual permite su paso a través de proteínas, heptámeros y péptidos liberándose en sitios específicos (20).

En el caso de la enfermedad de Parkinson, cuya patogenia esta relacionada con la acumulación de alfa sinucleína, y de forma concomitante con la agregación de beta amiloide, existe evidencia actual que plantea que los puntos cuánticos de grafeno interactúan de manera directa con la alfa sinucleína, inhibiendo la formación de fibrillas y reduciendo la formación de cuerpos de Lewy (21). In vitro mostró capacidad de prevenir la muerte neuronal y por ultimo y no menos importante previno la transmisión de neurona a neurona de la alfa sinucleína patológica.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer los puntos cuánticos de grafeno inhiben la agregación del péptido Beta amiloide, mediada por la ruptura de las laminas Beta.

Las cualidades previamente mencionadas para los puntos cuánticos de grafeno, en la enfermedad de Alzheimer, también son atribuidas a los dendrímeros (estructuras tridimensionales de construcción arborescente), particularmente para las de las generaciones 3 a 5, postulando incluso la capacidad de romper las fibrillas preexistentes.

Las nanopartículas de Oro han sido extensamente utilizadas en biomedicina gracias a su biocompatibilidad e inercia química, y aunque se le han atribuido efectos tóxicos es importante mencionar que estos se encuentran en función de su tamaño, carga y recubrimiento, en tanto partículas entre 36 y 18 nm aumentan la formación de fibrillas de beta amiloide, las < 6 nm con un recubrimiento de ácido acrílico, son capaces de disminuir e incluso inhibir este proceso (22).

Las nanopartículas de plata también tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica e inducir la respuesta inflamatoria y la expresión de genes ligados a enfermedades neurodegenerativas, sin embargo esa respuesta inmunológica parece mejorar la habilidad de la microglía dependiente de la habilidad de esta ultima. Para absorberlas, reduciendo así mismo la formación de especies reactivas de oxígeno, y aunque faltan estudios al respecto no debe demeritarse sus características benéficas (23).

Las nanopartículas de óxidos de hierro (Fe_3O_4) y óxido de Zinc (ZnO) han sido desarrollados como herramientas para la obtención de imágenes y como terapias para reducir el estrés oxidativo en el cerebro, en el caso del primero, la aplicación previa de un campo magnético externo facilita su paso a través de la barrera hematoencefálica particularmente el óxido de hierro superparamagnético (50-150 nm) (24).

Conclusiones

El incremento en el número de personas afectados por padecimientos neurodegenerativos constituye un importante problema de salud con gran impacto socioeconómico a nivel mundial, resultado del envejecimiento poblacional, de la limitada comprensión de su patología y de la falta de terapias eficaces para su tratamiento; aún a pesar de existir moléculas prometedoras su llegada a nivel cerebral se ve limitada, de tal manera que encontrar la forma de entrar a un sitio tan privilegiado como ese se ha vuelto la meta en esta incansable carrera terapéutica, de la cual la nanotecnología se presenta como una opción viable, ofreciendo nuevas posibilidades que permitirán su arribo dada su biodegradabilidad inherente, biocompatibilidad y fácil eliminación.

Se requiere aún más investigación al respecto, sin embargo con certeza podemos afirmar que el desarrollo de la nanotecnología representa el avance más significativo de las últimas décadas en la farmacología debido a sus implicaciones en la mejora de los perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos o como actores directos de la terapéutica de una amplísima variedad de patologías entre las que se encuentran las enfermedades del sistema nervioso central y con este desarrollo nuevas esperanzas para muchas enfermedades que amenazan la vida activa e independiente de nuestra especie.

Bibliografía

1. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology* . 2017; 16(11): 877-897.
2. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(1): 3-10.
3. Cano A, Sánchez-López E, Ettcheto M, López-Machado A, Espina M, Souto EB, *et al.* Current advances in the development of novel polymeric nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Nanomedicine*. 2020.
4. Tan EK, Srivastava AK, Arnold WD, Singh MP, Zhang Y. Neurodegeneration: Etiologies and New Therapies. *BioMed Research International*. 2015; 1-2.
5. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*. 2016; 539(7628): 180-186.
6. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 2010; 37(1): 13-25.
7. Wolff A, Antfolk M, Brodin B, Tenje M. In Vitro Blood-Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 104(9): 2727-2746.
8. Tam VH, Sosa C, Liu R, Yao N, Priestley RD. Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 515(1-2): 331-342.

9. Azad TD, Pan J, Connolly ID, Remington A, Wilson CM, Grant GA. Therapeutic strategies to improve drug delivery across the bloodbrain barrier. *Neurosurgical Focus*. 2015; 38(3): E9.
10. Furtado D, Björnmalm M, Ayton S, Bush AI, Kempe K, Caruso F. Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Advanced Materials*. 2018; 1801362.
11. Yang C, Hawkins KE, Dore S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2018.
12. Pezeshgi H, Janmaleki M, Novin M, Saliba J, El-hajj F. In vitro models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. *J. Control. Rel*. 2018; 273: 108–130.
13. Zenaro E, Piacentino G, Constantin G. Neurobiology of disease the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*. 2017; 107: 41–56.
14. Palmer A. The role of the blood brain barrier in neurodegenerative disorders and their treatment. *J. Alzheimers Dis*. 2011; 24(4): 643–656.
15. Mukherjee S, Madamsetty VS, Bhattacharya D, Roy Chowdhury S, Paul MK, Mukherjee A. Recent Advancements of Nanomedicine in Neurodegenerative Disorders Theranostics. *Advanced Functional Materials*. 2020; 2003054.
16. Giovanni T, Duskey JT, Jörg K. Nanoparticles as carriers for drug delivery of macromolecules across the blood-brain barrier, *Expert Opinion on Drug Deliver*. 2019.
17. Zhang P, Zhang L, Qin Z, Hua S, Guo Z, Chu C, et al. Genetically engineered liposome-like nanovesicles as active targeted transport platform. *Adv. Mater*. 2018; 30:1705350.
18. Tripathy N, Ahmad R, Khang G. *Inorganic Nanotheranostics: Strategy development and applications, Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications*. Amsterdam. Elsevier. 2018; 377–419.
19. Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resist. Updat*. 2014; 17: 89–95.
20. Yuan M, Wang Y, Qin YX. Promoting neuroregeneration by applying dynamic magnetic fields to a novel nanomedicine: superparamagnetic iron oxide (SPIO)-gold nanoparticles bounded with nerve growth factor (NGF). *Nanomedicine*. 2018; 14: 1337–1347.
21. Kim WS, Kågedal K, Halliday GM. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimers Res. Ther*. 2014; 6:73.
22. Vio V, Jose Marchant M, Araya E, Kogan MJ. Metal nanoparticles for the treatment and diagnosis of neurodegenerative brain diseases. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(13):1916–1926.
23. Vissers C, Ming G, Song H. Nanoparticle technology and stem cell therapy team up against neurodegenerative disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019.
24. Kong SD, et al. Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood-brain barrier, *J. Control. Release* 2012; 164 (1): 49–57.

Toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y óxido cobre en células del sistema excretor

Elizabeth Mavil-Guerrero^{1,2} y Karla Oyuky Juárez Moreno^{1,3}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.6> Ciudad de México

Resumen

Esta revisión resume la literatura sobre la toxicidad en células epiteliales de mamíferos de las nanopartículas (NPs) de óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO) publicada entre 2013 y parte del 2021. Los efectos nanotoxicológicos de las NPs ZnO y NPs CuO en las células dependen de la composición química de la nanopartícula, de su tamaño, y también, de la estructura y función de las células. El aumento del uso de las NPs ZnO y NPs CuO en la industria farmacéutica, cosmética, ambiental y alimentaria, lo que promueve que los seres humanos y otros organismos se encuentren ante una exposición a las NPs indeseada o incidental silenciosa. Las NPs pueden llegar al sistema circulatorio por vía inhalatoria o por ingestión para posteriormente

ser excretadas por el hígado y riñón. La exposición aguda de las células epiteliales de hígado y riñón a las NPs produce estrés oxidante, daño mitocondrial, alteraciones en el ciclo celular y respuestas inflamatorias que conducen a las células a una muerte apoptótica.

Palabras clave:

Sistema excretor, nanotoxicología, nanopartículas

1 Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California 22860, México.

2 Posgrado en Nanociencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California 22860, México.

3 CONACYT Cátedras, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California 22860, México.

*Autor de correspondencia: E-mail: kjuarez@fata.unam.mx ORCID: 0000-0002-6171-8601

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del diseño, creación y manipulación a nivel nanométrico de materiales que tienen por lo menos una de sus dimensiones dentro de la escala 1-100 nm (1). Estos nanomateriales pueden ser partículas, fibras o tubos y su origen puede ser natural, incidental o manufacturado. Se pueden encontrar en forma de partículas individuales, agregados o aglomerados (2). Los materiales a nanoescala tienen diferentes propiedades fisicoquímicas con base en su tamaño, forma, composición, química superficial y mayor área superficial de contacto, comparadas con la forma en el tamaño micro y macroscópico. Estas propiedades hacen que los nanomateriales sean interesantes para diferentes aplicaciones industriales y ambientales, pero al mismo tiempo, surge la preocupación de la exposición de los organismos vivos a estos nanomateriales con capacidad de reaccionar químicamente en los procesos biológicos (3). Es por ello, que la bionanotecnología y la nanotoxicología, estudian las aplicaciones y los efectos que los nanomateriales tienen en humanos, animales, bacterias, plantas, hongos u otros organismos vivos (1).

Recientemente, el estudio y la aplicación de los nanomateriales tiene relevancia en el área de la salud humana y animal, para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, de imagen y diagnóstico contra enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer (4). Uno de los más utilizados son las nanopartículas metálicas, como las de plata (Ag) y oro (Au); también, de óxidos metálicos como el óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO₂) (5,6).

Las nanopartículas de ZnO y CuO pueden ingresar de manera natural al organismo por diferentes vías: oral, dérmica, inhalatoria o bien administradas por vía intravenosa, entre otras, con las que tienen

la capacidad de llegar a ser absorbidas por el sistema circulatorio y distribuirse por todo el organismo, para finalmente ser metabolizadas en el hígado y excretadas a través del riñón e hígado (Figura 2) en forma de fluidos como la orina y las heces fecales (7,8). Esto implica, que el hígado y el riñón realicen un trabajo arduo para excretar a las nanopartículas y con esto evitar su acumulación.



Figura 2. Principales vías de exposición a las nanopartículas y su transporte hacia el hígado y riñón. Creada por las autoras en biorender.com.

La exposición de los organismos a las NPs de ZnO y CuO ha provocado efectos no deseados en el hígado y riñón que van desde la acumulación o lesión hasta la muerte de células epiteliales que los componen, con exposiciones cortas de 24 horas evaluadas *in vitro* y de meses estudiadas en modelos animales para la experimentación (7,9). Algunos de los efectos nanotoxicológicos generados en células por evaluación *in vitro* son: reducción en la viabilidad celular, daños en la membrana celular, generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) e inflamación. Por otro lado, en modelos animales se han descrito efectos como la activación del sistema inmunitario

por medio de inflamación y de procesos alérgicos. También se ha reportado genotoxicidad por daños cromosómicos y en el ácido desoxirribonucleico (ADN), mutagenotoxicidad, efectos carcinógenos y estrés oxidativo, principalmente. Estas complicaciones pueden ser ocasionadas por la internalización de las nanopartículas, los iones liberados o únicamente por la interacción indirecta de las células con las nanopartículas (7,8,10).

Es importante mencionar, que la legislación sanitaria sobre los nanomateriales en México es escasa. No existe una norma oficial mexicana (NOM) para la fabricación de productos y materias primas de nanomateriales y mucho menos para su uso en la industria farmacéutica, alimentaria, ambiental y cosmética. Esta desregulación sanitaria permea el diseño y la fabricación heterogénea de estos nanomateriales, lote a lote, y no garantiza la calidad de los productos en los lotes subsecuentes.

Por lo anterior, en este trabajo se resumen los efectos nanotoxicológicos reportados por la exposición aguda a nanopartículas de ZnO y CuO en células epiteliales de hígado y riñón al estar expuestas a diferentes concentraciones de estas nanopartículas.

Métodos

Se realizó una búsqueda automatizada en la base de datos internacional PubMed (nih.gov) y en la revista de la Gaceta UNAM, empleando las palabras clave: *NPs ZnO, NPs CuO, células epiteliales de riñón e hígado* para artículos originales y de revisión. Los criterios para la selección de los artículos fueron la fecha de publicación con un máximo de antigüedad de 8 años y su impacto en la nanotoxicología. Para la sección de efectos nanotoxicológicos ocasionados por nanopartículas de óxido

de cobre, se decidió incluir artículos originales en otras células que componen al ser humano, ya que se encontraron escasos estudios en células de hígado y riñón.

Uso de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre por las diferentes industrias

Industria Ambiental

En cuanto al uso ambiental se resalta la formulación de biocidas y pesticidas con la finalidad de detener el crecimiento de ciertos organismos que causan enfermedades en cultivos, áreas forestales o acuáticas. Esto implica la exposición a estas nanopartículas por bacterias, hongos, crustáceos, algas, peces, entre otros, que son hospederos naturales y necesarios para el equilibrio de la vida.

Asimismo, Bondarenko et al. (5), estudiaron los efectos tóxicos de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, determinaron que las NPsZnO y NPsCuO con tamaños de 20-150 nm son las más tóxicas a concentraciones de 2-3 mg/L de agua, en crustáceos, algas, peces, levaduras, y de 100 mg/L para bacterias, nematodos y protozoos. También, concluyeron que las algas son el organismo más afectado, siendo relevante por ser el alimento de diversos peces.

Industria Biomédica

Las aplicaciones de las nanopartículas de ZnO y CuO en el área biomédica, es debido a que su tamaño nanométrico facilita su internalización en las células. Se utilizan en la administración concomitante con fármacos y para diagnóstico mediante estudios de bioimagen. También, se les atribuyen a las NPs ZnO efectos anticancerígenos, antidiabéticos, antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios. En una revisión realizada por Mishra et al. (11) y Jiang et al. (12) re-

sumen que las NPs ZnO tienen efectos anticancerígenos en órganos como el pulmón, ovarios, cérvix, estómago, en cáncer de células humanas epidermales y en la leucemia promielocítica aguda. De acuerdo con Tang (13) las NPs ZnO obtenidas por síntesis verde mostraron una reducción significativa del colesterol en un modelo de ratas diabéticas administrando a una dosis de 1–10 mg/kg por 56 días. Estos resultados sugieren que las NPs ZnO se podrían utilizar como terapia farmacológica en la diabetes *mellitus*. Además, Jiang et al. (12) mencionan el efecto antidiabético de estas nanopartículas con tamaños de 10 a 95 nm, las cuales reducen la cantidad de glucosa en sangre y colesterol.

Por otro lado, las nanopartículas de CuO han sido estudiadas por sus propiedades anticancerígenas; por ejemplo, Rodhe et al. (14) demostraron el efecto tóxico de las NPs CuO con un tamaño de 15 a 100 nm en células de leucemia. Concluyeron que estas NPs inducen un daño en el ADN de las células, la sobreproducción de ROS como los superóxidos, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y otro tipo de radicales libres oxidantes que pueden dañar moléculas como lípidos, proteínas y alterar el sistema antioxidante que es regulado por la enzima superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa y también por el glutatión; finalmente ocasionan la muerte de la célula. Otra investigación relevante sobre las aplicaciones biológicas de las NPs CuO es la descrita por el grupo de Li *et al.* (15), quienes proponen un método altamente sensible y selectivo para la detección del virus de la gripe H1N1 que se basa en el marcaje de anticuerpos policlonales utilizando NPs CuO para detectar y unirse a los antígenos del virus H1N1. Y de forma más reciente en México, investigadores de la UNAM, han desarrollado un cubrebocas (SakCu) de nanocapas entre 30-40 nm de espesor

compuestas por una mezcla de plata y cobre que tiene efectividad para inactivar al SARS-CoV-2 e inhibir la proliferación de bacterias (16), este cubrebocas recientemente desarrollado estará a la venta para su uso, sin que se haya realizado una evaluación de los efectos secundarios a largo plazo causados por la posible liberación de las nanopartículas y sus efectos en células del sistema respiratorio e inmunológico.

Industria Cosmética

La industria cosmética emplea diferentes tipos de nanopartículas de óxidos metálicos y especialmente NPs ZnO y NPs CuO para la fabricación de cremas, protectores solares, maquillajes, cremas depilatorias, entre otros productos de belleza, que están en contacto directo con el órgano más grande del ser humano, la piel.

Dykes (17), realizó un estudio con la finalidad de probar el efecto de NPs CuO sobre la piel de mujeres, quienes utilizaron fundas de almohada y ropa de cama que contenían NPs CuO y el resultado fue que revelaron un aspecto mejorado en la piel del rostro, además de un aumento de la elasticidad en la piel del pie utilizando calcetines impregnados con NPs CuO. Además, las NPs ZnO están presentes en productos de belleza como polvo de maquillaje, corrector de ojeras e imperfecciones faciales, protector solar, bálsamo para imperfecciones, sombra de ojos, crema de protección solar, entre otros, en concentraciones que van de los 0.5-17 g/100g de producto, por lo que se requiere más investigación sobre los efectos tóxicos de este tipo de NPs en concentraciones superiores a los 17g/100 g de producto debido a la toxicidad sinérgica que podría resultar con el uso de más de un cosmético a la vez (18).

Industria Alimentaria

La industria alimentaria ha implementado el uso de las nanopartículas de óxidos metálicos y especialmente las de ZnO y CuO en la composición de envases primarios y secundarios para alimentos o bebidas, o bien, como excipientes dentro de la formulación de estos, lo que favorece el contacto con el producto alimenticio que es ingerido por el consumidor (5,19). También emplea a estas NPs como aditivos en los alimentos, por sus propiedades antimicrobianas reportadas en distintos estudios que demuestran la capacidad de las NPs ZnO con tamaño entre 30-100 nm para inducir la muerte por sobreproducción de ROS, principalmente en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (12,20).

Excreción de las nanopartículas por el hígado y el riñón

El proceso farmacocinético al que son sometidas las nanopartículas al igual que los fármacos se divide en liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción, también llamado sistema LADME. Los órganos principales encargados de la excreción de los nanomateriales una vez que son metabolizados y biotransformados en moléculas o subproductos de menor tamaño son el hígado y el riñón. El hígado está conformado en un 60-80% por células epiteliales especializadas, llamadas hepatocitos, es capaz de excretar NPs con un radio hidrodinámico entre 50-200 nm por medio de las heces; mientras que el riñón está integrado por un 90% de células epiteliales y se encarga de la excreción de NPs con tamaño entre 6-15 nm es mediante la orina (21).

Diferentes estudios han demostrado que la excreción de la NPs por el hígado y el riñón tienen efectos tóxicos que afectan a las células de estos órganos, tales como espacios intersticiales, vacuolas, degradación y necrosis de las células epiteliales, procesos inflamatorios, daño al ADN y mitocondrias, sobreproducción de ROS, entre otras (7,9,22).

Además del tamaño, otro aspecto a considerar sobre la excreción de las NPs es su estabilidad para permanecer en fluidos como la sangre, ya que, si tienden a aglomerarse o agregarse, generan cambios en sus propiedades fisicoquímicas que juegan un papel perjudicial en la cinética de excreción, situación que es común cuando las NPs se administran por vía intravenosa. Además, debido a su química superficial, algunas NPs tienen la capacidad de formar una corona proteica, que es una estructura en la superficie de la NP que se construye al interactuar con las proteínas que se encuentran en el medio. Esto puede afectar los diversos parámetros fisicoquímicos de una NP, incrementando su tamaño y, por lo tanto, ocasionando que no pueda ser excretada por el hígado o el riñón y originando su acumulación (23).

Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de óxido zinc y las nanopartículas de óxido de cobre en células del sistema excretor

En los apartados anteriores se mencionó que las NPs ZnO y NPs CuO tienen diferentes efectos tóxicos en las células lo que ocasiona una reducción de su viabilidad que culmina con la muerte de la célula (Figura 2). En este apartado, se presentan los efectos nanotoxicológicos descubiertos hasta ahora en células que constituyen el hígado y el riñón, para lo cual se muestran las tablas 1 y 2 que resumen los efectos tóxicos estudiados.



Figura 2. Resumen gráfico que representa la toxicidad y aplicaciones que tienen las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre en células epiteliales de hígado y riñón. Creada por las autoras en biorender.com.

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón embrionarias HEK 293	25–40 nm	3, 24 y 48 h	5, 25, 50 y 75 µg /mL	Muerte apoptótica por incremento de ROS y pérdida del potencial de la membrana mitocondrial	(24)
HEK293	36 nm	0- 5 h	0.1, 1, 10, y 100 µg/mL	Daño al ADN por incremento de micronúcleos	(25)
Células epiteliales de riñón NRK-52E	10-50 nm	24 h	12.5–50.0 µg/mL	Reducción de la viabilidad celular por daño al ADN	(26)

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFFECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón MDCK	100 nm	24 h	12-737 μ M	Muerte celular por genotoxicidad y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes	(27)
HepG2 y HK-2	100 nm	24 h	256 μ g/mL	Reducción de la viabilidad por daño al ciclo celular	(28)
Línea celular hepatocito C3A	130 nm	24 h	0.5–256 mg/mL	Citotoxicidad en las células con aumento claro de la producción de IL-8	(29)

Tabla 1. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.

Las investigaciones resumidas en la *Tabla 1*, demuestran que los diferentes efectos tóxicos ocasionados por las NPs ZnO desencadenan la muerte de las células, pero no proponen un mecanismo biológico/molecular detallado que permita conocer con exactitud mayor lo que las NPs causan en las células. Sin embargo, Zhang et al. (30), proponen un mecanismo de muerte inducida por alteración en las enzimas del sistema antioxidante generado por disminución de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) para el péptido glutatión y la enzima glutatión peroxidasa, ambas moléculas importantes del sistema antioxidante celular, además del aumento en el malondialdehído. Los autores demuestran que existe un daño en el

potencial de la mitocondria por acumulación de hierro en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) después de ser expuestas por 24 h a concentraciones de 10 y 15 μ g/ μ L de NPs ZnO con un tamaño de 30 ± 10 nm.

Para esto Zhang *et al.* (30), proponen un mecanismo de muerte celular por ferroptosis, que se induce por la acumulación de hierro y es dependiente de la peroxidación de lípidos. Aunque el trabajo descrito por Zhang *et al.* (30) se llevó a cabo en células HUVEC, es una investigación muy completa, que da pauta para realizar investigaciones similares, pero en células del sistema excretor con tamaños de NPs diferentes.

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFEECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón embrionarias HEK 293	<50 nm	48 h	3 mg/mL y 300 mg/mL	Daño a la membrana celular y estrés oxidante	(31)
Linfocitos	<100	2, 4 y 6 h	0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.8mM	Muerte celular por peroxidación de lípidos, daño a la mitocondria y a los lisosomas	(25)
Células de Kupffer y hepatocitos	114.4 y 362.1	5, 6 y 24 h	12.5, 25, 50, y 100 µg/mL	Muerte apoptótica y estrés mitocondrial	(33)
Células de glioma C6 y astrocitos	141±13	30 min y 5 h	10-1000 µM	Reducción de la viabilidad celular y de lactato deshidrogenasa (LDH).	(34)
Células humanas de epitelio alveolar A549	75 nm	24 h	0.32, 1.6, 3.2, 16.1, and 32.1 µg/cm ²	Promoción de la formación de un inflamasoma por aumento de IL-1a y actividad proinflamatoria por IL-6	(35)
Hemocitos y células gliales y alveolares	197 y 210	2, 4 y 24 h	0.05, 0.5, 2.75 and 5 mg/L	Muerte celular por estrés oxidante e inhibición de la Na-K-ATPasa y daño al ADN	(36)
HepG2 y Caco-2	221.53 nm	24 h	2.5, 5, 10,15, 20 y 40 µg/mL	Muerte celular apoptótica por daño al ADN	(37)

Tabla 2. Efectos tóxicos de las NPsCuO reportados en diferentes estudios in vitro en células de mamíferos.

La regulación sanitaria de los nanomateriales en México

El uso de las NPs para distintas aplicaciones aumenta continuamente, sin embargo, la legislación sanitaria en México esta rezagada. No existen normas oficiales mexicanas (NOMs), únicamente normas mexicanas, tales como la NMX-R-10867-SCFI-2014, para la caracterización de nanotubos de carbono de una capa mediante espectroscopia de fotoluminiscencia en el infrarrojo cercano; la norma NMX-R-10929-SCFI-2014, para la caracterización de muestras de nanotubos de carbono de múltiples capas; la NMX-R-27687-SCFI-2014, que plantea una terminología y definiciones para nano-objetos-nanopartícula, nanofibra y nanopláca; la norma NMX-R-80004-1-SCFI-2014 nanotecnologías; el Vocabulario-Parte 1: Conceptos básicos; la norma NMX-R-80004-3-SCFI-2014, Nanotecnologías-Vocabulario-Parte 3: nano-objetos de carbono (38) y por último la NMX-R-12901-1-SCFI-2015 nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados (39). Todas estas normas no son obligatorias sino voluntarias, flexibles y no reglamentarias, por lo que esta desregulación sanitaria conlleva a un flujo incontrolado de la producción y síntesis de NPs para diferentes aplicaciones a las que nos encontramos constantemente expuestos.

Además, los productos o materias primas que contienen NPs no se someten a pruebas de seguridad y eficacia establecidas en una norma oficiales mexicana, como es para el caso de productos ambientales, cosméticos, alimentarios y de insumos para la salud que contienen materias primas microscópicas y macroscópicas. Si bien, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

(COFEPRIS) realiza una evaluación por medio del comité de moléculas nuevas cuando un nanomaterial es propuesto con fines terapéuticos, es fundamental tomar medidas regulatorias obligatorias mediante normas oficiales mexicanas, que garanticen la calidad, seguridad y eficacia para su uso en humanos y animales en lotes subsecuentes de los nanomateriales en todas las áreas de aplicación.

Por lo anterior, es importante implementar Normas Oficiales Mexicanas (NOM), que son de carácter obligatorio y que contienen lineamientos que permiten obtener medidas uniformes y garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los nanomateriales en productos o materias primas. Estas NOMs deben establecerse entre los legisladores, la comunidad académica y la industria privada para señalar pautas por un beneficio común sobre la seguridad de los productos o materias primas (40). La comunidad académica mexicana se ha organizado para impulsar esto, a través de la Red de Nanociencias y Nanotecnología (RNN, CONACYT), la cual promovió la creación del Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica (SINANOTOX), que es un grupo de investigadores provenientes de universidades públicas y privadas que conjuntan su experiencia en la Nanotoxicología para proponer protocolos estandarizados que permitan realizar pruebas toxicológicas de los nanomateriales y comparar sus efectos en diversos modelos biológicos. Los resultados que se obtienen permiten contribuir con evidencia científica a la regulación sanitaria de los nanomateriales y en la gestión de la implementación de las NOMs para garantizar su seguridad (39).

Conclusiones y comentarios

Los NPs de ZnO y CuO afectan las respuestas celulares *in vitro* de varios tipos de células epiteliales de hígado y riñón. La mayoría de los estudios sugieren que los efectos nanotoxicológicos más comunes son estrés oxidante, daño mitocondrial y alteraciones en los estadios del ciclo celular presuntamente causados por los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} que resultan de la disolución de las NPs fuera de la célula, la internalización de las NPs o bien por combinación NP-ion. Los resultados de las evaluaciones toxicológicas *in vitro* indican que la inducción de estrés oxidante es el mecanismo más importante o probable que subyace a la toxicidad y conlleva a la célula a una muerte por apoptosis. Sin embargo, los efectos nanotoxicológicos que inducen la muerte de las células por la exposición a NPs ZnO y CuO durante su excreción por el hígado y el riñón siguen siendo una interrogante, sobre todo por el mecanismo intrínseco y sumamente relevante de las células que componen a estos dos órganos, y principalmente el de las células epiteliales. Ya que, los efectos tóxicos de las nanopartículas dependen de su tamaño y composición química, pero también de su interacción con la estructura y función celular que varía entre cada tejido. Finalmente, la regulación sanitaria en México requiere solicitar pruebas *in vitro* mediante una NOM que garanticen la seguridad en la salud humana y animal con el uso de productos que contengan nanomateriales.

Referencias

1. Chan WCW. Bionanotechnology progress and advances. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(1).
2. Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, Clancy SF, Lafronconi M, West J, et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015 Oct;73(1).
3. Navya PN, Daima HK. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Converg*. 2016;3(1).
4. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(2).
5. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch Toxicol*. 2013;87(7).
6. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO_2 -NP) through various routes of exposure: a review. *Biol Trace Elem Res*. 2016;172(1).
7. Chen A, Feng X, Sun T, Zhang Y, An S, Shao L. Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET Nanobiotechnology*. 2016;10(3).
8. Bugata LSP, Pitta Venkata P, Gundu AR, Mohammed Fazlur R, Reddy UA, Kumar JM, et al. Acute and subacute oral toxicity of copper oxide nanoparticles in female albino Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 2019;39(5).

9. Hassanen EI, Tohamy A, Issa MY, Ibrahim MA, Farroh KY, Hassan AM. Pomegranate juice diminishes the mitochondria-dependent cell death and NF- κ B signaling pathway induced by copper oxide nanoparticles on liver and kidneys of rats. *Int J Nanomedicine*. 2019;14.
10. El Bialy BE, Hamouda RA, Abd Eldaim MA, El Ballal SS, Heikal HS, Khalifa HK, et al. Comparative toxicological effects of biologically and chemically synthesized copper oxide nanoparticles on mice. *Int J Nanomedicine*. 2021;15.
11. Mishra PK, Mishra H, Ekielski A, Talegaonkar S, Vaidya B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2017;22(12).
12. Jiang J, Pi J, Cai J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2018;2018.
13. Tang KS. The current and future perspectives of zinc oxide nanoparticles in the treatment of diabetes mellitus. *Life Sci*. 2019;239.
14. Rodhe Y, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Potáková Z, Möller L. Copper-based nanoparticles induce high toxicity in leukemic HL60 cells. *Toxicol Vitro*. 2015;29(7).
15. Li Y, Hong M, Lin Y, Bin Q, Lin Z, Cai Z, et al. Highly sensitive electrochemical immunoassay for H1N1 influenza virus based on copper-mediated amplification. *Chem Commun*. 2012;48(52).
16. Fernando Guzmán. Hecho en CU: Cubrebocas antimicrobiano. *Gaceta UNAM* [Internet]. 2021;0188:1–6. Disponible en: <https://www.gaceta.unam.mx/hecho-en-cu-cubrebocas-antimicrobiano/>
17. Dykes P. Increase in skin surface elasticity in normal volunteer subjects following the use of copper oxide impregnated socks. *Ski Res Technol* [Internet]. 2015;21(3):272–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/srt.12187>
18. Kim K-B, Kim YW, Lim SK, Roh TH, Bang DY, Choi SM, et al. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *J Toxicol Environ Heal Part B* [Internet]. 2017;20(3):155–82. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2017.1290516>
19. Liu Z, Wang C, Hou J, Wang P, Miao L, Lv B, et al. Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles in five waters. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;25(31).
20. Stankic S, Suman S, Haque F, Vidic J. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *J Nanobiotechnology*. 2016;14(1).
21. Li M, Zou P, Tyner K, Lee S. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles. *AAPS J* [Internet]. 2017;19(1):26–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-016-0010-3>
22. Iavicoli I, Fontana L, Nordberg G. The effects of nanoparticles on the renal system. *Crit Rev Toxicol*. 2016;46(6).
23. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2015;44(23).
24. V.G. R, P.V. M. Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;157.

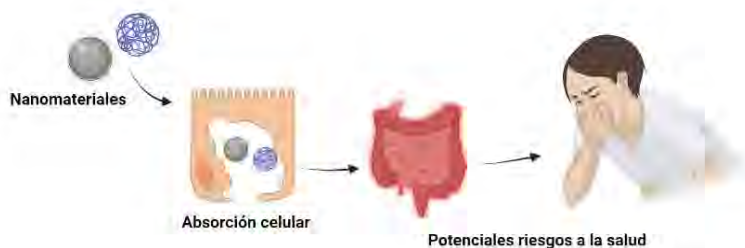
25. Demir E, Creus A, Marcos R. Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2014;77(21).
26. Uzar NK, Abudayyak M, Akcay N, Algun G, Özhan G. Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(4).
27. Kononenko V, Repar N, Marušič N, Drašler B, Romih T, Hočevár S, et al. Comparative in vitro genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl₂ to MDCK kidney cells: Size matters. *Toxicol Vitro*. 2017;40.
28. Thongkam W, Gerloff K, van Berlo D, Albrecht C, Schins RPF. Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. *Mutagenesis*. 2017;32(1).
29. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol*. 2013;14(1).
30. Zhang C, Liu Z, Zhang Y, Ma L, Song E, Song Y. "Iron free" zinc oxide nanoparticles with ion-leaking properties disrupt intracellular ROS and iron homeostasis to induce ferroptosis. *Cell Death Dis*. 2020;11(3).
31. Reddy ARN, Lonkala S. *In vitro* evaluation of copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative stress using human embryonic kidney cells. *Toxicol Ind Health*. 2019;35(2).
32. Assadian E, Zarei MH, Gilani AG, Farshin M, Degampanah H, Pourahmad J. Toxicity of copper oxide (CuO) nanoparticles on human blood lymphocytes. *Biol Trace Elem Res*. 2018;184(2).
33. Wang X, Chang CH, Jiang J, Liu X, Li J, Liu Q, et al. Mechanistic differences in cell death responses to metal-based engineered nanomaterials in Kupffer cells and hepatocytes. *Small*. 2020;16(21).
34. Joshi A, Rastedt W, Faber K, Schultz AG, Bulcke F, Dringen R. Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in C6 glioma cells. *Neurochem Res*. 2016;41(11).
35. Hufnagel M, Neuberger R, Wall J, Link M, Friesen A, Hartwig A. Impact of differentiated macrophage-like cells on the transcriptional toxicity profile of CuO nanoparticles in co-cultured lung epithelial cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
36. Katsumiti A, Thorley AJ, Arostegui I, Reip P, Valsami-Jones E, Tetley TD, et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. *Toxicol Vitro*. 2018;48.
37. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G. Cupric Oxide Nanoparticles Induce Cellular Toxicity in Liver and Intestine Cell Lines. *Adv Pharm Bull*. 2020;10(2).
38. Guillermo Foladori, Edgar Arteaga Figueroa, Edgar Záyago Lau, Richard Applebaum, Eduardo Robles-Belmont, Laura Liliana Villa Vásquez, Rachel Parker VL. La política pública de nanotecnología en México. *Rev Iberoam Ciencia, Tecnol y Soc*. 2017;12(34):51–64.
39. Verenise Sánchez. Los grandes riesgos de las nanopartículas [Internet]. 2018. Available from: <http://www.cienciamx.com/index.php/tecnologia/nanotecnologia/20567-grandes-riesgos-nanoparticulas>
40. Saldívar Tanaka L. Regulación blanda, normas técnicas y armonización regulatoria internacional, para la nanotecnología. *Mundo Nano Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología*. 2019;13(24).

El potencial riesgo digestivo de los nanomateriales

Salma López Rodríguez^{1,2} y Karla Oyuky Juárez Moreno^{1,3}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.7> Ciudad de México

Resumen gráfico



Resumen

Objetivos: Evaluar el riesgo a la salud pública, particularmente respecto a trastornos gastrointestinales, que implica la exposición cotidiana de la población a los nanomateriales como aditivos empleados en la industria alimentaria y/o como contaminantes derivados del uso de materia prima contaminada con nanopartículas originadas por la degradación de residuos plásticos. En esta revisión se recopilan los puntos más relevantes de las investigaciones nanotoxicológicas disponibles acerca del efecto de las nanopartículas de óxido de zinc, un aditivo comúnmente utilizado en la industria alimentaria, y de las nanopartículas de tereftalato de polietileno, uno de los principales componentes de los residuos plásticos. **Métodos:** Extraer las publicaciones más recientes y relevantes acerca de los riesgos por ingestión de ambos tipos de nanomateriales encontrados en alimentos y bebidas, utilizando un

reconocido motor de búsqueda. **Resultados:** En el aparato digestivo, los nanomateriales cambiarán sus propiedades fisicoquímicas y estarán en constante interacción con las células intestinales, las cuáles son capaces de internalizarlos por vías endocíticas. Además, los nanomateriales interactúan con la microbiota, ocasionando un desbalance en la flora intestinal y cambios en la composición de la mucosa. En conjunto, esta serie de eventos desencadenará respuestas celulares de estrés oxidativo. **Conclusiones:** El área de evaluación nanotoxicológica abordada en esta revisión es un enfoque emergente de los efectos tóxicos de la materia en tamaño nanométrico que pone de manifiesto los posibles efectos a corto, mediano y largo plazo de los nanomateriales y cuyo progreso contribuirá a esclarecer cómo prevenir y tratar patologías gastrointestinales asociadas.

¹ Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM.

² Posgrado en Nanociencias del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

³ Cátedra CONACYT en CNyN-UNAM.

*Autor de correspondencia: E-mail: kjuarez@fata.unam.mx ORCID: 0000-0002-6171-8601

Introducción

De acuerdo a la Comisión Europea, un nanomaterial es aquel material de origen natural, incidental o fabricado, que contiene partículas que pueden estar en un estado no unido, como agregados o aglomerados, y en los que al menos el 50% de estas partículas tienen una o más de sus dimensiones externas en un rango de tamaño entre 1 a 100 nm (1).

Las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales, les confieren características exclusivas del tamaño nanométrico, muchas de las cuales están asociadas a una actividad biológica, por ejemplo, antibacteriana o anti-inflamatoria. A pesar de que el tamaño es la principal característica de los nanomateriales, también se distinguen por tener una elevada área superficial y una química superficial altamente reactiva. Otros parámetros fisicoquímicos importantes en los nanomateriales son su forma, proporción de aspecto (la relación entre el ancho y el largo del nanomaterial), la composición química, porosidad, estructura cristalina, estabilidad y carga superficial. Además, debido al arreglo de los elementos que componen a algunos nanomateriales, éstos pueden presentar propiedades muy particulares como la luminiscencia, magnetismo, superconductividad, entre otras.

Los nanomateriales tienen diversas aplicaciones en la industria electrónica, farmacéutica, cosmética, biomédica y alimentaria, ocasionando que la sociedad esté ininterrumpidamente expuesta a la materia en nanoescala. Los productos comerciales pueden contener nanomateriales que se adicionan de forma

intencional, o que se presentan como contaminantes en productos de consumo humano. Esto supone un potencial riesgo a la salud y al medio ambiente puesto que se desconoce con claridad cuáles son los efectos tóxicos de los nanomateriales, mismos que pueden variar según su composición y propiedades fisicoquímicas (2). Por esta razón, surge de forma emergente una rama de las nanociencias, conocida como nanotoxicología, que se encarga de evaluar los potenciales riesgos que los nanomateriales tienen en la salud y el ambiente.

La presencia de los nanomateriales en alimentos empaquetados y bebidas envasadas se ha incrementado en la última década, debido a su uso intencional como aditivos o a su condición secundaria derivada de la contaminación ambiental. Los nanomateriales sintetizados a partir de óxidos metálicos como los de óxido de titanio (TiO_2), óxido de silicio (SiO_2) y óxido de zinc (ZnO), son los más utilizados como aditivos en la industria alimentaria (3).

Los nanomateriales que son producto de la actividad antropogénica y, por lo tanto, su síntesis no es intencional ni controlada, son los nanomateriales incidentales. Uno de los más representativos en la actualidad son los nanoplásticos, que son la principal fuente de contaminación en alimentos y bebidas. Uno de los tipos más comunes de nanoplásticos son las nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) que se generan por la degradación de los desechos plásticos y pueden trasladarse hasta los humanos a causa de su inserción y acumulación en la cadena trófica (4).



Figura 1. Los nanomateriales pueden estar presentes en alimentos y bebidas debido a que se emplean como aditivos en la industria alimentaria para mejorar las propiedades de los productos. Además, pueden presentarse como contaminantes provenientes de la materia prima en contacto con nanoplásticos.

Por lo tanto, es crucial promover las investigaciones relacionadas con la nanotoxicología que ayuden a determinar cuáles son los efectos que los nanomateriales desencadenan en el aparato digestivo; así como esclarecer cuáles son las respuestas celulares y moleculares que se alteran como resultado de esta exposición (5). En esta revisión se recopilieron algunas de las investigaciones más relevantes acerca de los efectos producidos por la presencia de nanopartículas en las células intestinales. Se consideraron dos tipos de nanopartículas: las de óxido de zinc (ZnO NPs) por ser uno de los principales aditivos utilizados en la industria alimentaria, y las nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET NPs) que representan uno de los principales contaminantes en el agua y alimentos.

Metodología

Para identificar y extraer las publicaciones relevantes que fueron incluidas en esta revisión se emplearon las frases “effects ingested pet nanoparticles” “risk of ingestion of pet nanoparticles” “intestinal function zno nanoparticles” “risk of ingestion of zno nanoparticles” en el motor de búsqueda Google Scholar. La búsqueda se centró en artículos científicos en los que se evaluara o recopilara información acerca de los efectos de las ZnO NPs y las PET NPs en modelos intestinales *in vitro* o *in vivo*. Además, se rastrearon publicaciones acerca de los mecanismos de toxicidad y procesos de internalización de ambos tipos de nanopartículas en el mismo motor de búsqueda, en publicaciones reportadas en la sección de referencias de otros artículos y en la colección de los autores de publicaciones al respecto.

Resultados

Los nanomateriales a través del aparato digestivo

Después de ser ingeridos, los nanomateriales comienzan su trayecto por el tracto gastrointestinal, durante este proceso se verán expuestos a ambientes con condiciones particulares dependientes del órgano que atraviesen, por ejemplo, cambios de pH, presencia de enzimas digestivas, peristalsis, microbiota o biomoléculas provenientes de la materia orgánica de los alimentos (Lukas, 2021). Las condiciones de cada órgano pueden alterar las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales promoviendo su aglomeración o disolución en iones e influenciando su absorción (Lukas, 2021). Los nanomateriales permanecen casi inalterados en la saliva, sin embargo, el ambiente ácido del estómago promueve su aglomeración y ligera liberación de iones. Por el contrario, en el intestino, los nanomateriales que pueden estar aglomerados, se desintegran dejando nuevamente el nanomaterial prístino o sus iones, libres para formar complejos con otros compuestos biológicos, siendo por lo tanto, el epitelio intestinal el área mayoritariamente expuesta a la absorción de los nanomateriales (Lukas, 2021; Peters et al., 2012; Sieg et al., 2017)

A lo largo del trayecto por el tracto gastrointestinal, los nanomateriales pueden transformarse en iones y viceversa, presentándose una formación *de novo* a partir de los iones libres (Lukas, 2021; Peters et al., 2012; Sieg et al., 2017). En este sentido, los nanomateriales pueden ocasionar una amplia variedad de efectos en cada una de las capas del intestino, como por ejemplo cambios morfológicos en las células epiteliales, disrupción de las vellosidades y microvellosidades

intestinales, afectación en la absorción de carbohidratos, grasas y proteínas, modificaciones en la composición de la mucosa, desbalances en la colonización simbiótica de la microbiota, y activación de la respuesta inmunológica (9).

Absorción intestinal e internalización celular de nanopartículas

Las células epiteliales que forman al intestino tienen una organización polarizada epitelial y algunas son capaces de secretar mucosa, que constituye la primera barrera que enfrentan los nanomateriales para ser internalizados. La mucosa intestinal está cargada negativamente por lo que, además del tamaño, la carga superficial de los nanomateriales es crucial para atravesarla. Por lo tanto, la penetración de nanomateriales con carga superficial positiva se ve favorecida (10,11). Los nanomateriales que logran atravesar la mucosa son mayormente internalizados por las células M, y en menor proporción por los enterocitos, células encargadas de la absorción de agua y nutrientes (Bouwmeester, van der Zande, & Jepson, 2018; Lukas, 2021).

La internalización de los nanomateriales en las células se da por vías endocíticas, caracterizadas por la invaginación de la membrana plasmática para formar una vesícula conocida como endosoma. Dentro de las células, algunos nanomateriales pueden escapar de los endosomas e instalarse en el citoplasma, impactando negativamente en las células intestinales. En contraparte, la fracción de nanomateriales que no logre absorberse a través de las barreras intestinales puede acumularse en el interior del intestino y relacionarse con los microorganismos colonizadores (13,14).

Por ejemplo, en el caso de las ZnO NPs, Huang y Tang, describieron que, al estar compuestas de metales activos, entre el 65 y 100% de este tipo de nanopartículas se disuelven con facilidad en el ambiente ácido del estómago, provocando que su biodurabilidad sea baja (9). En otro estudio, Ghebretatios y colaboradores, describieron que las ZnO NPs reducen la abundancia y diversidad bacteriana de la microbiota, especialmente de bacterias beneficiosas para la función intestinal. Estos hallazgos sugieren que las ZnO NPs inducen un desbalance en la flora intestinal y alteraciones en su actividad metabólica (14). En concordancia, Lamas y colaboradores, reportaron el mismo desbalance en la microbiota, reflejado en la disminución de *Lactobacillus* y el incremento en el filo patógeno *Proteobacteria* (13).

Diversos reportes coinciden en que la exposición de las ZnO NPs a un ambiente ácido promueve su disociación en iones Zn^{2+} . Jeon y colaboradores llevaron a cabo un estudio para determinar el destino de las ZnO NPs tras su ingestión en alimentos empaquetados. Expusieron la línea celular Caco-2 a 50 $\mu g/ml$ de ZnO NPs con un

tamaño de aproximadamente 60 nm y encontraron que la absorción celular se presentaba mayoritariamente en forma de iones Zn^{2+} debido a que las ZnO NPs sufrían severas disociaciones por la acidez de los alimentos estudiados o por interacción con otros componentes del medio de cultivo empleado. A pesar de esto, los autores recalcaron que no debe despreciarse la contribución de las ZnO NPs que logran absorberse en forma de nanopartículas (3).

Por otro lado, Mittag y colaboradores estudiaron las líneas celulares de epitelio intestinal, Caco-2 y LT97, en presencia de ZnO NPs de < 50 nm y < 100 nm a concentraciones entre 12 y 1,229 $\mu mol/L$, con lo cual demostraron que las ZnO NPs son internalizadas por endocitosis. Una vez en el citoplasma, la formación de un endolisosoma ocasionará una disminución en el pH del medio en que se encuentran las ZnO NPs, hecho que promoverá su disolución en iones Zn^{2+} y la desestabilización del lisosoma. Esta cadena de eventos finalmente resultará en daño celular (15,16)

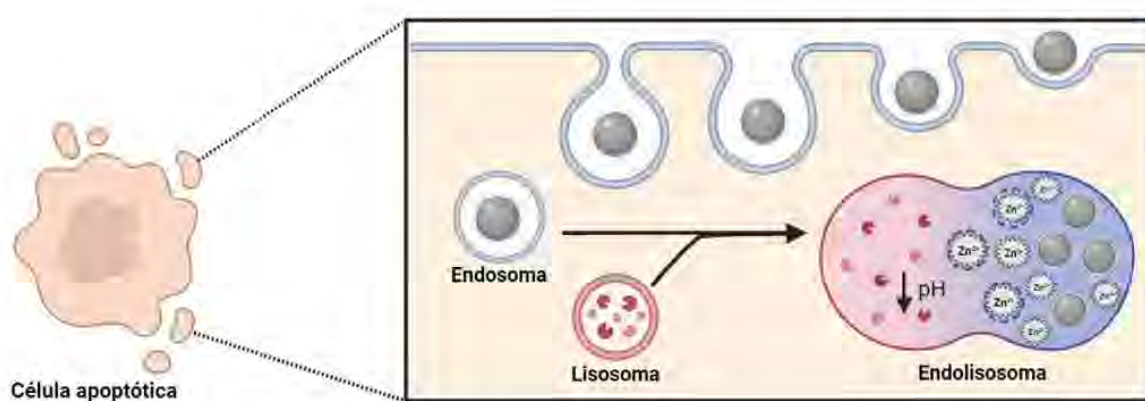


Figura 2. Después de ser internalizadas, las ZnO NPs serán depositadas en un endolisosoma, un orgánulo con contenido ácido. La acidez dentro de esta estructura intracelular ocasionará la disolución de las ZnO NPs en iones Zn^{2+} , mismos que desestabilizarán al endolisosoma y provocarán la muerte de la célula.

Para el caso de las nanopartículas plásticas, en 2018, Magrí y colaboradores, observaron que las PET NPs son internalizadas a partir de endosomas que se fusionan con lisosomas originando endolisosomas y determinaron que las PET NPs son capaces de atravesar las barreras intestinales sin inducir daños en la mucosa o en la estructura de las células a corto plazo. Sin embargo, se sabe que este tipo de nanopartículas son biopersistentes, por lo que no se debe descartar la toxicidad a largo plazo. Otro punto importante a considerar es que las PET NPs pueden interactuar y unirse a otras moléculas contaminantes que podrían ser depositadas en el torrente sanguíneo con la translocación de las nanopartículas (17).

Principales mecanismos de citotoxicidad inducida por nanomateriales

El término citotoxicidad hace alusión a la capacidad de un agente de infligir algún tipo de daño celular que afecte el desarrollo correcto de la célula. Se han observado dos posibles mecanismos en los que las ZnO NPs inducen citotoxicidad. El primero es dependiente de su tamaño y forma, así como de sus propiedades fisicoquímicas particulares. El segundo mecanismo se da por la liberación de iones tóxicos de Zn^{2+} dentro y fuera de las células (18).

Para determinar si la toxicidad de las ZnO NPs proviene de las nanopartículas, la liberación de iones o ambos factores, Wang y colaboradores, evaluaron los mecanismos de toxicidad de estas y otras nanopartículas de óxidos metálicos. Utilizando una cepa de *P. phosphoreum* analizaron los mecanismos de toxicidad de ZnO NPs de 30 nm en concentraciones de 0.19 a 0.48 mg/L. Determinaron que la toxicidad de las ZnO NPs se debía únicamente a la acción de los iones Zn^{2+} . Sin embargo, aclararon que el método que se utilice para medir la toxicidad y los componentes del medio en que se encuentren las ZnO NPs, tendrán impactos significativos en los resultados.

Debido a esto y a la existencia de reportes que asocian la toxicidad a su forma de nanopartículas, este mecanismo aún no puede ser tomado como contundente (19).

Por otra parte, Mittag y colaboradores, coincidieron en la citotoxicidad de los iones de Zn^{2+} y puntualizaron que la consecuencia principal de estos es la sobreproducción de las especies de oxígeno reactivas. A partir de sus ensayos anteriormente descritos, comprobaron cambios en el contenido intracelular de zinc que pueden afectar la cadena de transporte de electrones y la efectiva replicación y reparación del ADN (15). Además, los iones Zn^{2+} pueden ocasionar la disfunción mitocondrial, la desestabilización lisosomal y la iniciación de una respuesta inmunitaria por inducción de la liberación del factor pro-inflamatorio IL-8. En conjunto, el estrés oxidativo ocasionado por las ZnO NPs, disminuye la viabilidad celular, daña el DNA y otras estructuras intracelulares, impacta la integridad de la membrana plasmática y, finalmente, compromete a la célula hacia la apoptosis (20).

En contraparte, al estudiar las PET NPs en la línea celular Caco-2, Magrí y colaboradores, encontraron que estas NPs no afectan la viabilidad celular ni la integridad de membrana. A pesar de esto, especularon que la persistencia de las PET NPs en los lisosomas puede alterar las funciones de estos orgánulos activando algún mecanismo de estrés celular (17).

Al respecto, Yong y colaboradores, copiaron resultados de diversos autores con base a los cuales concluyeron que la endocitosis de nanopartículas de plástico puede ocasionar diversas alteraciones en el medio intracelular. Esta clase de NPs tienen el potencial de permeabilizar las membranas de los endosomas, liberándolas al citosol, donde interactuarán con otras estructuras intracelulares y afectarán procesos como

la formación del huso mitótico y la segregación cromosomal. Además, podrían interferir con el tráfico intracelular y la expresión de receptores y transportadores de membrana (21).

Otramaniestación de citotoxicidad son las alteraciones en el ciclo celular. Sobre este factor, se conoce que pueden presentarse diferencias en la cantidad y la velocidad a la que una célula internaliza los nanomateriales, así como en los efectos que estos desencadenen, según la fase del ciclo celular que atraviese la célula en cuestión (22).

Algunos autores reportan que las ZnO NPs tienen efectos importantes sobre el ciclo celular. En general, coinciden en que este tipo de NPs ocasiona una disminución en la cantidad de células que se encuentran en la fase G0/G1 e incrementa la cantidad de aquellas que atraviesan la fase S o G2/M, las cuales son propensas al arresto del ciclo celular (18,20,23).

En el caso de las nanopartículas plásticas, poco se ha evaluado acerca de su impacto en el ciclo celular. Xu y colaboradores, precisaron que las nanopartículas de poliestireno, otro tipo de nanoplásticos, están relacionadas con el incremento en la expresión de ciclina D y E, con un consecuente arresto del ciclo celular en la fase S (24). Sin embargo, cuáles son los efectos de las PET NPs en el ciclo celular continúa siendo una pregunta abierta.

Conclusiones y perspectivas futuras

A pesar de la ventaja tecnológica que representan, la presencia cotidiana de los nanomateriales implica un riesgo a la salud de la población y el medio ambiente. La ingesta es una de las principales vías a través de las cuales los humanos están expuestos a la materia a nanoescala. Por lo tanto, es necesario continuar y extender las investigaciones biomédicas que consideren los riesgos toxicológicos de los nanomateriales a corto, mediano y largo plazo, y que contribuyan a respaldar la importancia de generar políticas públicas que responsabilicen a las industrias, no solo del giro alimentario, a reportar en el etiquetado la presencia de nanomateriales en sus productos. Dichas investigaciones representan uno de los mayores retos actuales en el área de nanotoxicología debido a que la toxicidad de los nanomateriales es dependiente de sus propiedades fisicoquímicas y, al momento, la imposibilidad de estandarizar los nanomateriales dificulta las evaluaciones nanotoxicológicas. La falta de estándares torna particularmente compleja la determinación del efecto tóxico de los nanoplásticos, cuya formación en el medio abrasivo del océano, hasta el día de hoy, no es reproducible. En este sentido, el progreso en la resolución de los retos actuales de la nanotoxicología contribuirá a llevar a cabo estudios que consideren más aristas de la interacción de los nanomateriales con el aparato digestivo y esclarecer métodos de prevención y tratamiento de las posibles patologías asociadas a su consumo.

Agradecimientos

Agradecemos al Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica de Nanomateriales (SINANOTOX) por el financiamiento y apoyo a nuestros proyectos, al Departamento de Bionanotecnología, CNYN-UNAM, por facilitarnos las instalaciones y el equipo, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada a la alumna Salma López Rodríguez, con número de CVU 1036813.

Referencias

1. Comisión Europea. Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”. [Internet]. Comisión Europea. [Actualizado el 8 de diciembre del 2010-citado]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_032.pdf
2. Camacho Á, Zapata M. ¿Qué es un nanomaterial? .Momento [Internet]. 2017 [citado 2021 Mayo 11]. 0: 57–66. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/momento/articulo/que-es-un-nanomaterial>
3. Jeon Y-R, Yu J, Choi S-J. Fate.Determination of ZnO in Commercial Foods and Human Intestinal Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 enero 9 [citado el 2021 enero 18];21(2):433. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/433>
4. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health [Internet]. *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society; 2019 [citado el 2021 Mayo 24]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.8b05512>
5. Sohal IS, O’Fallon KS, Gaines P, Demokritou P, Bello D. Ingested engineered nanomaterials: State of science in nanotoxicity testing and future research needs [Internet]. , *Particle and fibre Toxicology*. BioMed Central Ltd.; 2018 [citado el 2021 Mayo 11]. 15: 1–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0265-1>
6. Lukas F. A journey through the “nano” world-an analytical and toxicological challenge [disertación en internet]. Berlín, Alemania: Freie Universität Berlin; 2020 [citado el 2021 Mayo 11]. Disponible en: https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/29611/Kriegel_Thesis_online.pdf?sequence=3&isAllowed=y
7. Sieg H, Kästner C, Krause B, Meyer T, Burel A, Böhmert L, et al. Impact of an artificial digestion procedure on aluminum-containing nanomaterials. *Langmuir* [Internet]. 2017 Oct 10 [citado el 2021 May 13];33(40):10726–35. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903564/>
8. Peters R, Kramer E, Oomen AG, Herrera Rivera ZE, Oegema G, Tromp PC, et al. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano* [Internet]. 2012 Mar 27 [citado el 2021 Mayo 13];6(3):2441–51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22364219/>
9. Huang X, Tang M. Review of gut nanotoxicology in mammals: Exposure, transformation, distribution and toxicity. *Sci Total Environ* [Internet]. 2021 Jun 15 [citado el 2021 Mayo 12];773:145078. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721001443>
10. García-Gallegos, J.C. (2015). Efecto de la ingesta de nanoestructuras en el organismo. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. pág 255-287.
11. Alger H, Momcilovic D, Carlander D, Duncan T V. Methods to evaluate uptake of engineered nanomaterials by the alimentary tract. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2014 Jul [citado el 2021 Mayo 13];13(4):705–29. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12077>
12. Bouwmeester H, van der Zande M, Jepson MA. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota [Internet]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. Wiley-Blackwell; 2018 [citado el 2021 May 11]. 10:1481. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/>

- full/10.1002/wnan.1481
13. Lamas B, Martins Breyner N, Houdeau E. Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-El potencial riesgo digestivo de los nanomateriales immune axis: Potential consequences for host health [Internet]. Vol. 17, Particle and Fibre Toxicology. BioMed Central Ltd. 2020 [citado el 2021 May 12]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32487227/>
 14. Ghebretatios M, Schaly S, Prakash S. Nanoparticles in the food industry and their impact on human gut microbiome and diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Feb 16 [citado el 2021 Mayo 12]; 22(4):1942. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1942>
 15. Mittag A, Hoera C, Kämpfe A, Westermann M, Kuckelkorn J, Schneider T, et al. Cellular uptake and toxicological effects of differently sized zinc oxide nanoparticles in intestinal cells. *Toxics* [Internet]. 2021 Apr 27 [citado el 2021 May 15];9(5):96. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6304/9/5/96>
 16. Olejnik M, Kersting M, Rosenkranz N, Loza K, Breisch M, Rostek A, et al. Cell-biological effects of zinc oxide spheres and rods from the nano- to the microscale at sub-toxic levels. *Cell Biol Toxicol* [Internet]. 2020 Nov 17 [citado el 2021 Jun 4];1–21. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09571-z>
 17. Magrì D, Sánchez-Moreno P, Caputo G, Gatto F, Veronesi M, Bardi G, et al. Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano* [Internet]. 2018 Aug 28 [citado el 2021 Jun 3];12(8):7690–700. Disponible en: www.acsnano.org
 18. Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Rallean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2017 Nov 1 [citado el 2021 Mayo 14];249:37–52. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868617301197>
 19. Wang D, Lin Z, Wang T, Yao Z, Qin M, Zheng S, et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both?. *J Hazard Mater* [Internet]. 2016 [citado el 2022 May 5];308:328–34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.066>
 20. McCracken C, Dutta PK, Waldman WJ. Critical assessment of toxicological effects of ingested nanoparticles. *Environ Sci Nano* [Internet]. 2016 Apr 1 [citado el 2021 Mayo 11];3(2):256–82. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EN00242G>
 21. Yong CQY, Valiyaveetill S, Tang BL. Toxicity of microplastics and nanoplastics in Mammalian systems [Internet]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2020 [citado el 2021 Jun 3]. 17: 1509. Disponible en: www.mdpi.com/journal/ijerph
 22. Kim JA, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2012 Enero 6 [citado el 2021 May 15];7(1):62–8. Disponible en: www.nature.com/naturenanotechnology
 23. Liu J, Feng X, Wei L, Chen L, Song B, Shao L. The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2016 Apr 20 [citado el 2021 May 14];46(4):348–84. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2015.1137864>
 24. Xu M, Halimu G, Zhang Q, Song Y, Fu X, Li Y, et al. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cells. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019 Dic 1 [citado el 2021 Jun 5]; 694:133794. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719337350>

Comité editorial

Dr. Germán E. Fajardo Dolci
Director de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Omar F. Carrasco
Editor en Jefe.

Dr. Germán E. Fajardo Dolci
Director de la Facultad de Medicina,
UNAM.

Dra. Irene Durante Montiel
Secretaría General. Facultad
de Medicina, UNAM.

Dra. Guadalupe Sánchez Bringas
Coordinadora de Ciencias Básicas.
Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Margarita Cabrera Bravo
Jefa del Departamento de
Microbiología y Parasitología.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dra. Guadalupe S. García
de la Torre**
Jefa del Departamento
de Salud Pública.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dra. Laura Silvia Hernández
Gutiérrez**
Jefa del Departamento de
Integración de Ciencias Médicas.
Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Virginia Inclán Rubio
Jefa del Departamento
de Fisiología.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dr. Alberto M.
Ángeles Castellanos**
Jefe del Departamento
de Anatomía.
Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Rubén Argüero Sánchez
Jefe del Departamento de Cirugía.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dr. José Benjamín
Guerrero López**
Jefe del Departamento de
Psiquiatría y Salud Mental.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dr. Federico
Martínez Montes**
Jefe del Departamento
de Bioquímica.
Facultad de Medicina, UNAM.

**Dr. Gustavo A.
Olaiz Fernández**
Coordinador General del Centro
de Investigación en Políticas,
Población y Salud.
Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Diana Barrera Oviedo
Farmacología y Bioquímica Clínica.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Karla Duarte Pérez
Anestesia y Dolor.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Claudia Gómez Acevedo
Farmacología Conductual.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Ruth Jaimez Melgoza
Estrógenos y Hemostasia.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Cristina Lemini Guzmán
Farmacología Endocrina.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Aurora de la Peña Díaz
Trombosis y Fibrinólisis. Instituto
Nacional de Cardiología.
Profesora del Departamento
de Farmacología. UNAM

Dra. Susana Tera Ponce
Farmacocinética.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dra. Rosa Ventura Martínez
Dolor y Plantas Medicinales.
Profesora del Departamento
de Farmacología, UNAM.

**Dr. Domingo F.
Aguilar Medina**
Coordinador de Enseñanza.
Departamento de Farmacología,
UNAM.

**Dr. Alfonso Efraín
Campos Sepúlveda**
Farmacocinética y Toxicología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Enrique Gómez Morales
Hematología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Enrique Hong Chong
Farmacología Cardiovascular.
CINVESTAV.

**Dr. Alejandro
Jiménez Orozco**
Farmacología Celular.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Arturo Juárez Flores
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Gil A. Magos Guerrero
Fitofarmacología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Juan A. Molina Guarneros
Farmacoepidemiología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Luis M. Montañó Ramírez
Farmacología del Asma.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Jesús E. Morales Ríos
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Luis Antonio Moreno Ruíz
Cardiología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Joel Nava Rangel
Medicina del Deporte.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

**Dr. José de Jesús
Rivera Sánchez**
Medicina Interna y Geriatria.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

**Dr. J. Alfredo
Saldívar González**
Neurofarmacología.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Víctor Torres Flores
Reproducción Humana.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

**Dr. Marco A.
Velasco Velázquez**
Farmacología Molecular.
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Dr. Félix Vicuña de Anda
Profesor del Departamento
de Farmacología, UNAM.

Apoyo editorial

Ingrid Amalinalli Ortiz Reyes
Médico Interno de Pregrado de la licenciatura de
Médico Cirujano. Hospital General de Subzona
con UMF 26°, CSL. Baja California Sur.

Guzmán Ballesteros Sofía Dolores
Estudiante de 8° semestre (4° año) de la
Licenciatura de Médico Cirujano. Hospital General
de México "Dr. Eduardo Liceaga".

Serrano Ortega Janis Jacqueline
Estudiante del 6to semestre (3° año) de la
carrera de Médico Cirujano. Instituto Nacional de
Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Zuñiga Aquino Guillermo Antonio
Estudiante de 8° semestre (4° año) de la
licenciatura de Médico Cirujano. Facultad de
Medicina, UNAM. Hospital General de Xoco.

Mariana Escobar Pacheco
Hospital General de México.

PONG DISEÑO Y COMUNICACIÓN
Diseño editorial y maquetación.

Angela Nikoll Castañeda Rosas
Estudiante de 8° semestre (4° año) de la
licenciatura de Médico Cirujano. Facultad de
Medicina, UNAM, CU. Hospital General Dr. Darío
Fernández Fierro.

Héctor Daniel Ávila López
Médico Interno de Pregrado de la licenciatura de
Médico Cirujano, Facultad de Medicina UNAM, CU.
Hospital General de Zona No. 11 Nuevo Laredo,
Tamaulipas.



DIRECCIÓN

Facultad de Medicina, Edificio "D", primer piso,
Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Ciudad de México

TELÉFONOS

55 5623-2167
55 5616-1489