

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Inorgánica



PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
EN BACTERIAS PROBIÓTICAS.
IMPLICACIONES
BIOTECNOLÓGICAS**

Víctor Jesús Garcés Robles

Granada, 16 julio 2018

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN BACTERIAS PROBIÓTICAS. IMPLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Víctor Jesús Garcés Robles
para aspirar al título de Doctor por la
Universidad de Granada

Fdo. Víctor Jesús Garcés Robles

LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL:

D. José Manuel Domínguez Vera

Catedrático del Departamento de Química Inorgánica
Instituto de Biotecnología
Universidad de Granada

y

D^a. Natividad Gálvez Rodríguez

Profesora titular del Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Victor Jesús Garcés Robles
ISBN: 978-84-9163-950-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52506>

Los resultados del trabajo de investigación realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de artículos cuyos indicios de calidad son:

- Miguel Martín, Alba Rodríguez-Nogales, Víctor Garcés, Natividad Gálvez, Lucía Gutiérrez, Julio Gálvez, Deyanira Rondón, Mónica Olivares and Jose M. Dominguez-Vera. (2016)
Magnetic study on biodistribution and biodegradation of oral magnetic nanostructures in the rat gastrointestinal tract.
Nanoscale, 8, 15041-15047.

INDICIOS DE CALIDAD:

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 7.760
 - Categorías (incluyendo N° de revistas y posición revistas):
MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY, 271 revistas,
posición 23
 - Cuartil: Q1
-
- Garcés, V., Rodríguez-Nogales, A., González, A., Gálvez, N., Rodríguez-Cabezas, M. E., García-Martin, M. L., Gutiérrez, L., Rondón, D., Olivares, M., Gálvez, J., & Domínguez-Vera, J. M. (2018).
Bacteria-Carried Iron Oxide Nanoparticles for Treatment of Anemia.
Bioconjugate Chemistry, 29 (5), 1785-1791.

INDICIOS DE CALIDAD:

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 4.818
- Categorías (incluyendo N° de revistas y posición revistas):
BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS – SCIE, 78 revistas,
posición 10 de 78; BIOCHEMISTRY & MOLECULAR
BIOLOGY – SCIE, 290 revistas, posición 53 de 290;
CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY – SCIE, 166 revistas,
posición 30 de 166; CHEMISTRY, ORGANIC – SCIE, 59
revistas, posición 9 de 59.
- Cuartil: Q1



**RESUMEN Y
ESTRUCTURA DE LA
TESIS DOCTORAL**

Algunas bacterias probióticas pueden incorporar nanopartículas en su capa externa de exopolisacáridos (EPS), adquiriendo las propiedades físico-químicas de dichas nanopartículas, sin perder sus capacidades biológicas más esenciales: superar la barrera química que supone el estómago y anidar en diferentes partes del intestino.

En esta tesis doctoral hemos explotado el uso de estos probióticos como *carriers* de nanopartículas metálicas de diversa composición química y morfología para alcanzar el intestino y poder ser aplicados en biomedicina.

El **capítulo 1**, se centra en los aspectos básicos del área de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral y la motivación del mismo en el contexto actual. Concretamente, se hace una revisión bibliográfica del uso de nanopartículas metálicas en Nanomedicina citando diferentes aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Asimismo se propone el uso de microorganismos carriers de dichas nanopartículas, y más concretamente del uso de EPS como plataformas para la preparación de nuevos nanomateriales con propiedades físico-químicas mejoradas.

El **capítulo 2** recoge el desarrollo de un nuevo suplemento de hierro (MNP-bacteria) para el tratamiento de anemia, basado en *Lactobacillus fermentum*, una bacteria que forma parte de nuestro microbioma, con nanopartículas de maghemita (MNP). Hemos demostrado que este probiótico es un *carrier* ideal para transportar y acumular MNP en el intestino, superando el medio químico estomacal. A diferencia del sistema MNP-bacteria, la administración de MNP no permite llegar al intestino puesto que las nanopartículas son mayoritariamente degradadas.

El ensayo en ratas anémicas ha demostrado que MNP-bacteria es un excelente suplemento de hierro, capaz de restablecer los parámetros de hierro en ratas anémicas a niveles fisiológicos sanos (**capítulo 3**). En concreto, dicho suplemento restablece los niveles de hierro y

hemoglobina en sangre, los niveles de las proteínas DMT1 y ferroportina en enterocitos de intestino y los niveles de hepcidina, la hormona que controla la excreción de hierro del enterocito.

En el **capítulo 4** hemos demostrado que es posible incorporar simultáneamente MNP y nanopartículas de oro AuNP (de diferentes morfologías) al *Lactobacillus fermentun*, obteniéndose así bacterias con propiedades magnéticas y ópticas simultáneamente. Los estudios de hipertermia magnética y óptica han demostrado que algunos de estos sistemas heterobimetálicos MNP-AuNP generan tasas de absorción específica de más de 130 W/g tras exposición a campos magnéticos alternos (hipertermia magnética), y temperaturas de calentamiento del orden de 50 – 70 °C tras irradiación con láser a 1064 nm, longitud de onda cercana a la de la banda SPR de las AuNP (hipertermia óptica).

Además, hemos visto que el probiótico *Lactobacillus fermentun* sirve como *carrier* para la internalización en el enterocito de las nanopartículas que porta. Por tanto, estos sistemas se presentan como una alternativa real para el tratamiento de cáncer de colon mediante hipertermia mixta magneto-óptica. No existen en bibliografía fármacos orales con estas características.

En el **capítulo 5** hemos extendido el protocolo de incorporación de nanopartículas a bacterias de tanto impacto en alimentación, como son los probióticos responsables de la fermentación de la leche para producir yogur. Además hemos demostrado que la incorporación de MNP y AuNP a los probióticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, no impide que puedan fermentar leche y producir yogur. De esta forma hemos desarrollado dos nuevos productos: yogur magnético y yogur dorado, que pudieran ser utilizados, al igual que MNP-bacteria, como suplementos de hierro para anemia, como fármacos anticancerígenos por hipertermia, o bien como nuevos ingredientes alimentarios en la *novel food*.



SUMMARY

Nanoparticles can be grafted to the outer exopolysaccharide (EPS) layer of some probiotic bacteria, so that these bacteria acquire new properties without losing their essential biological ability: to overcome the stomach barrier and nest in the intestine.

In this PhD, we have exploited the use of these probiotics as carriers of metallic nanoparticles, of different chemical composition and morphology, to be applied in biomedicine.

Chapter 1 is focused on the basic aspects of this research area and on its motivation in the current context. Specifically, there is a bibliographic review on the uses of metallic nanoparticles in Nanomedicine and about the use of microorganisms as drugs and nanoparticles carriers, as well as on the role of EPS as a material with potential uses in biotechnology.

Chapter 2 is devoted to the development of a new iron supplement (MNP-bacteria) for the treatment of anemia. This is based on *Lactobacillus fermentum*, a member of our microbiome, loaded with maghemite nanoparticles (MNP). We have shown that this probiotic is an ideal carrier to transport and accumulate MNP in intestine, overcoming the stomach chemical medium. Unlike the administration of free MNP, which entail the degradation of the nanoparticles at the stomach, the supplementation with MNP-bacteria does allow MNP reaching the intestine.

The test with anemic rats has shown that MNP-bacteria are excellent iron supplements, able to reestablish their iron parameters to healthy physiological levels (**chapter 3**). In concrete, this supplement reestablishes the levels of iron and hemoglobin in blood, the levels of the DMT1 and ferroportin proteins in enterocytes and the level of hepcidin, the hormone that controls the excretion of iron from the enterocyte.

In **Chapter 4** we demonstrate that it is possible to simultaneously incorporate MNP and gold nanoparticles (AuNP) of different

morphologies to *Lactobacillus fermentum*, thus obtaining bacteria with both magnetic and optical properties. The studies of magnetic and optical hyperthermia have shown that some of these heterobimetallic systems, MNP-AuNP-bacteria, generate specific absorption rate of more than 130 W/g after exposition to alternate magnetic fields (magnetic hyperthermia), and temperatures of heating of the order 50-70 °C after irradiation with laser at 1064 nm, a wavelength near the SPR band of the AuNP (optical hyperthermia).

Furthermore, we have seen that the probiotic *Lactobacillus fermentum* serves as a carrier for the internalization of the nanoparticles into enterocytes. Therefore, this system is a real alternative for the treatment of colon cancer through mixed magnetic-optical hyperthermia. There is no similar oral drug currently available in bibliography.

In **Chapter 5**, we have extended our protocol to incorporate nanoparticles to bacteria of high impact in food, such as the probiotics responsible of producing yogurt by milk fermentation. Besides, we have demonstrated that the incorporation of MNP and AuNP to the *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* probiotics does not prevent the fermentation and the production of yogurt. In this way, we have been able to develop two new products: magnetic yoghurt and golden yoghurt, that could be used as iron supplements (as MNP-bacteria) and as anticancer drugs (through hyperthermia techniques), or eventually used as a new ingredient in *novel food*.



ÍNDICE

1. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de oro..	23
1.1. Diferentes morfologías de las nanopartículas de oro.....	23
1.2. Propiedades ópticas de las AuNPs.....	24
1.3. AuNPs como agentes de bioimagen.....	26
1.4. AuNPs, agentes fototérmicos para hipertermia óptica.....	28
2. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de óxido de hierro.....	30
2.1. Propiedades magnéticas y composición de las SPIONs.....	31
2.2. SPIONs como agentes de contraste para Resonancia Magnética por Imagen.....	33
2.3. SPIONs para hipertermia magnética.....	34
2.4. SPIONs contra la anemia por deficiencia en hierro (IDA). 38	
2.4.1. IDA, un problema de salud global.....	38
2.4.2. El papel de las SPIONs en la lucha contra la IDA.....	40
3. “Microorganismos inusuales”. De la naturaleza al laboratorio.....	42
3.1. Bacterias magnetotácticas naturales y sus homólogas sintéticas.....	42
3.2. La naturaleza como inspiración para la biosíntesis artificial de nanopartículas metálicas.....	47
3.3. Bacterias inusuales como biofactorías de AuNPs.....	49
3.3.1. Mecanismos de biosíntesis de las AuNPs mediada por bacterias.....	51
3.3.2. Parámetros críticos en la biosíntesis de AuNPs mediada por bacterias.....	53
4. Bacterias saludables como biofactorías de AuNPs. Probióticos para aplicaciones biomédicas.....	55
4.1. Probióticos, las bacterias saludables.....	55
4.1.1. Lactobacillus, los probióticos por excelencia.....	60
4.2. <i>Lactobacillus</i> , los probióticos productores de AuNPs.....	61

5. El biofilm bacteriano, composición y función.....	63
5.1. Función del biofilm bacteriano.....	64
5.2. Composición del biofilm bacteriano. EPS.....	65
6. Objetivos.....	69
7. Referencias.....	70

CAPÍTULO 2. BIODISTRIBUCIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE
NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS ADMINISTRADAS
ORALMENTE 83

1.	
Introducción.....	85
2. Resultados y discusión.....	88
3. Conclusiones.....	99
4. Materiales y métodos.....	99
5. Referencias.....	103

CAPÍTULO 3. BACTERIAS PORTADORAS DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO PARA EL
TRATAMIENTO DE ANEMIA 107

1. Introducción.....	109
2. Resultados y discusión.....	111
3. Conclusiones.....	120
4. Materiales y métodos.....	120
5. Referencias.....	126

CAPÍTULO 4. BACTERIAS MAGNETO-ÓPTICAS
ARTIFICIALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS. 131

1. Introducción.....	133
2. Resultados y discusión.....	138
3. Conclusiones.....	155
4. Materiales y métodos.....	156
5. Referencias.....	161

CAPÍTULO 5. YOGUR MAGNÉTICO Y YOGUR DORADO 165

1. Introducción.....	167
2. Resultados y discusión.....	170
3. Conclusiones.....	186
4. Materiales y métodos.....	187
5. Referencias.....	191

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES 195

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Después de miles de millones de años de evolución, las criaturas de la naturaleza poseen estructuras funcionales casi perfectas. La naturaleza es, por tanto, una escuela para científicos e ingenieros en cuanto a la creación de materiales multifuncionales a múltiples escalas, desde lo nano, micro hasta lo macro.¹ Seguir las estrategias usadas en la naturaleza para generar materiales inorgánicos funcionales puede ser una vía con multitud de implicaciones en el campo de los nanomateriales.

El concepto de nanotecnología² fue concebido como la idea de generar dispositivos extremadamente pequeños mediante manipulación átomo a átomo, para obtener de manera controlada, herramientas que den solución a problemas en energía, salud y medio ambiente, que han acompañado a la humanidad desde sus orígenes.^{3,4}

Existen multitud de ejemplos de materiales a escala nanométrica producidos por organismos en la naturaleza.⁵ La mayoría son biominerales nanoestructurados que se generan por interacción entre una fase orgánica (proteínas, polisacáridos y lípidos) y una inorgánica (iones metálicos y sales inorgánicas) con un ordenamiento jerárquico y una perfecta organización.⁶ Ejemplo de esto son: materiales silíceos sintetizados por diatomeas y radiolarias,^{7,8} y las bacterias de capa S que sintetizan yeso y carbonato de calcio como capas superficiales. También ciertos microbios pueden acumular nanopartículas metálicas de magnetita, sulfuro de hierro, zinc u oro⁹. La función de estos materiales biológicos es diversa y puede ser vital, estructural, mecánica y fisiológica.¹⁰

Combinar los protocolos que ha traído consigo la nanotecnología con las estrategias de la naturaleza para la fabricación de materiales, ha generado una nueva disciplina, como es la de los materiales biomiméticos nanoestructurados, resultando en la aparición de nanomateriales con aplicación en diagnóstico,¹¹ terapia,¹² catálisis,¹³ electrónica,¹⁴ detección,^{3,15} entre otras. Este nuevo área de investigación

de materiales bioinspirados,^{16,17} se basa en la síntesis de materiales imitando la funcionalidad de los materiales que ofrece la naturaleza.

Una estrategia para la síntesis de materiales bioinspirados, es el empleo de microorganismos como biofactorías de biominerales y nanopartículas metálicas que usualmente no producen en su ambiente natural.^{6,18,19,20} Diversas especies de bacterias, hongos, levaduras y algas han sido empleadas con este propósito.^{6,18,19,20} Son lo que se denomina “*microorganismos inusuales*”, ya que no sintetizan estos nanomateriales en su hábitat normal.⁶ Otra aproximación se basa en incorporar nanomateriales artificiales a microorganismos, con la intención de generar nuevos materiales multifuncionales que podrían tener aplicaciones en áreas como la biomedicina y la electrónica.²¹ La idea principal es estudiar estos microorganismos, sus mecanismos de acción para la fabricación de materiales y sus mecanismos de interacción con los nanomateriales artificiales para, inspirándose en estos procesos, obtener en el laboratorio nuevas estructuras que tengan la misma funcionalidad que aquéllas que son sintetizadas por organismos vivos en la naturaleza. Se pretende por tanto mimetizar la funcionalidad más que la propia estructura en sí de los materiales naturales.

Los iones metálicos de hierro, cobre, sodio, potasio, calcio, magnesio, entre otros, son indispensables para la supervivencia de la mayoría de microorganismos.²² Son nutrientes esenciales que participan como centros de reacción, reguladores redox y estabilizadores de macromoléculas en diversos procesos biológicos; mantienen el balance osmótico; y forman parte integral de metaloproteínas.²³ La estrecha relación entre iones metálicos y microorganismos ha impulsado dentro de los materiales bioinspirados la biosíntesis de nanopartículas metálicas mediada por microorganismos.

La ventaja de emplear “*microorganismos inusuales*”, como bacterias y hongos, para producir a gran escala partículas metálicas pequeñas a nivel extracelular radica en que las nanopartículas biosintetizadas, a menudo,

muestran una alta estabilidad y un mejor control sobre la morfología y el tamaño. Además, la bio-fabricación es reproducible e incluye la posibilidad de sintetizar nanopartículas hidrofílicas. Este planteamiento evita los métodos de síntesis de nanomateriales tradicionales que a menudo precisan el uso de reactivos químicos tóxicos y altas presiones y temperaturas.^{24,25,26,27,28,29} Es por tanto, esta alternativa, un método de síntesis respetuoso con el medio ambiente.

El interés en la generación de materiales nanoestructurados reside en sus atractivas propiedades físico-químicas. Las cuales los capacitan para ser empleados en multitud de aplicaciones en áreas como farmacia, diagnóstico, cosmética, medicina regenerativa, y ciencia y tecnología de los alimentos.³⁰

Durante las dos últimas décadas ha ido en aumento el esfuerzo científico para aplicar la nanotecnología en el campo de la biomedicina, y las nanopartículas metálicas han sido objeto de gran interés con este fin.³¹ Dentro de las nanopartículas metálicas son las AuNPs, debido a sus propiedades ópticas únicas, y las nanopartículas magnéticas, de tipo óxido de hierro, las que encuentran un mayor potencial para su utilización en aplicaciones biomédicas.

1. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de oro.

1.1. Diferentes morfologías de las nanopartículas de oro.

La forma y el tamaño de las nanopartículas de oro (AuNPs) determinan sus propiedades físico-químicas.^{32,33} Las diferentes morfologías de las AuNPs van desde esferas (AuNSs), “rods” (barras, AuNRs),³⁴ prismas (AuNPRs),³⁵ estrellas (AuNSTs), cubos y poliedros, hasta nanopartículas amorfas (Figura 1). La disminución de las dimensiones, así como cambios en la morfología final en el caso de las AuNPs, tiene un efecto determinante en sus propiedades, las cuales

difieren mucho de las propiedades del material “*bulk*” del que proceden, o de los átomos aislados que las forman. La gran superficie atómica, la elevada energía de superficie, el confinamiento espacial y las reducidas imperfecciones son algunas de las causas de que las AuNPs puedan presentar propiedades eléctricas, electrónicas, mecánicas, magnéticas,³⁶ térmicas, dieléctricas, ópticas y biológicas, y por tanto, son causa de las ventajas que presentan frente a los materiales macrométricos con la misma composición.

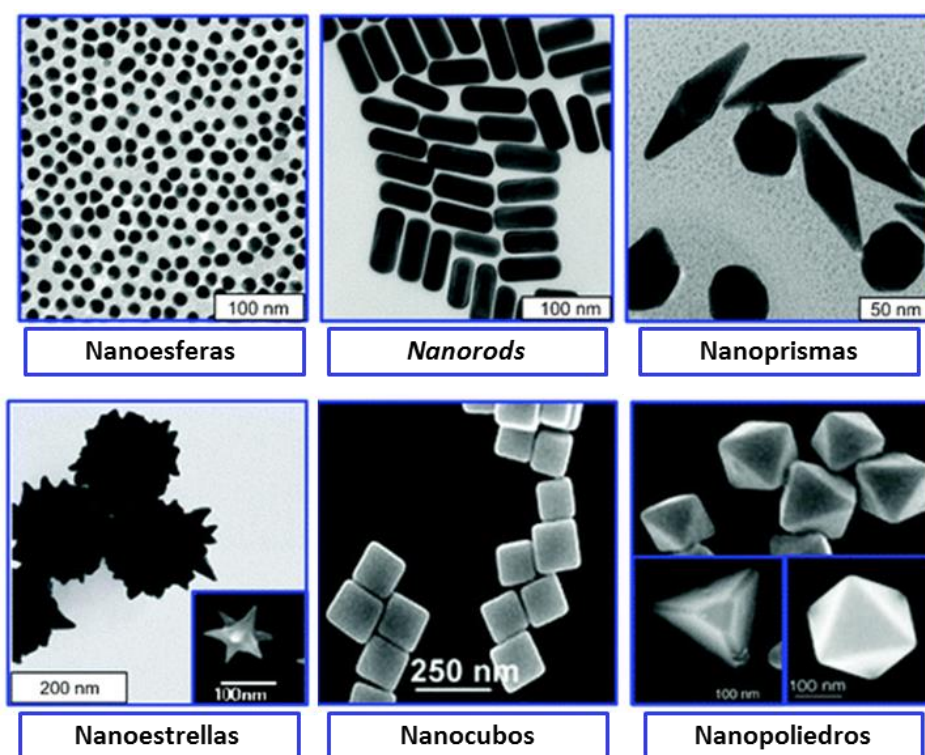


Figura 1. Diferentes morfologías de AuNPs.³⁷

1.2. Propiedades ópticas de las AuNPs.

Las AuNPs presentan una banda de absorción de energía en la región del ultravioleta-visible (UV-vis) resultado de la resonancia entre la frecuencia del fotón incidente (luz) y la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de las AuNPs,^{38,39,40, 41} también

llamados plasmones de superficie. El fenómeno, denominado resonancia de plasmones superficiales (*surface plasmon resonance*, SPR), es el responsable del color característico de cada morfología y es la clave de muchas de las aplicaciones biomédicas que presentan las AuNPs.

La banda de absorción SPR que presentan las AuNPs es dependiente del tamaño, la forma, el ambiente químico y la agregación de las nanopartículas. El ajuste preciso de estos parámetros puede desplazar esta banda a la región del infrarrojo cercano (NIR, *near infrared*).³⁸ De hecho, con el aumento de la anisotropía en la morfología, o la agregación de las AuNPs la banda SPR se desplaza hacia energías más bajas, o lo que es lo mismo a λ mayores, pudiendo alcanzar la zona del NIR^{42, 43} (zona energética ideal para las aplicaciones biomédicas).

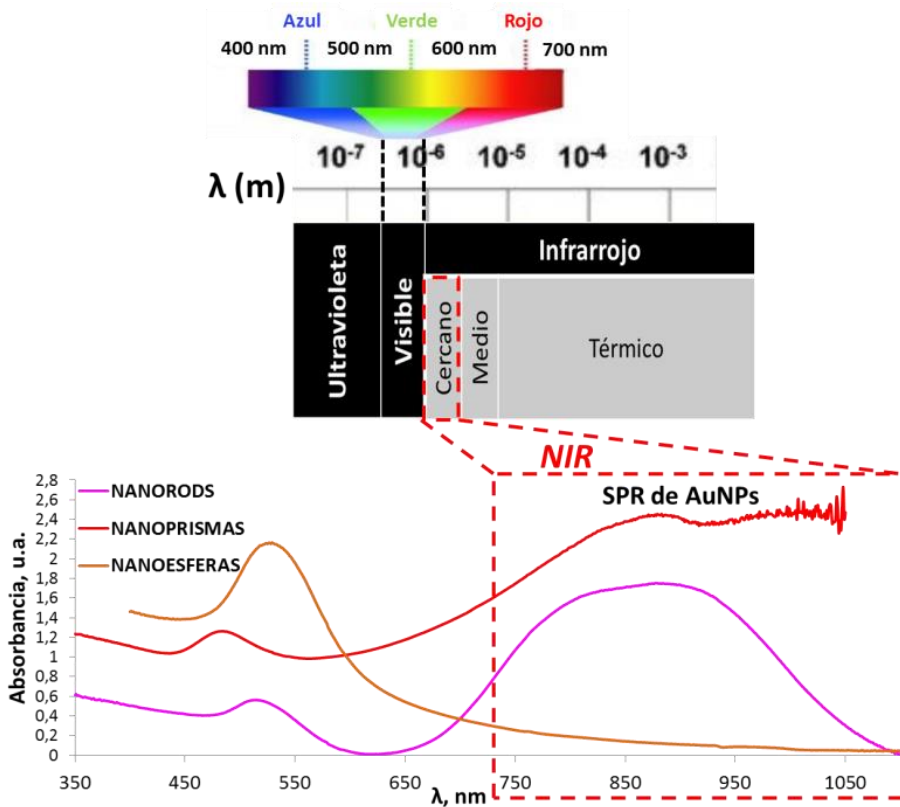


Figura 2. Sección del espectro electromagnético con las regiones UV-vis y NIR, y la localización de las bandas SPR de AuNSs, AuNRs y AuNPRs dentro de este.

Las AuNSs presentan una banda SPR centrada en el rango de 500-600 nm (UV-vis). Sin embargo, cuando las AuNPs pierden la forma esférica, hacia morfologías más anisotrópicas, aparecen resonancias con nuevos plasmones superficiales. En AuNRs, por ejemplo, el SPR se divide en dos bandas: la sección transversal muestra una resonancia de aproximadamente 530 nm, que es coincidente con el SPR de las nanopartículas esféricas, mientras que la resonancia de la sección longitudinal se desplaza hacia el rojo, a una λ que depende de la relación largo/ancho de los *rods*, pudiendo alcanzar el NIR. En formas con una anisotropía aún mayor, como los AuNPRs, el SPR de baja energía cae en la región del NIR con longitudes de onda que alcanzan valores de 1100 nm (Figura 2).

1.3. AuNPs como agentes de bioimagen.

Poder sintetizar AuNPs que presenten SPR en el NIR supone disponer de nanodispositivos de diagnosis que, tras su administración en humanos o incubación con muestras de tejido biológico o cultivos celulares, podrían actuar como agentes de bioimagen y biosensores,^{44,45} ya que la radiación infrarroja puede penetrar los tejidos y alcanzar las AuNPs que absorban a esta frecuencia en el interior del organismo, o de las células. Esto es posible gracias a que la sangre y los tejidos blandos absorben luz principalmente en el UV-vis, y no en el NIR, como estas AuNPs.

Las AuNPs con bandas SPR en el NIR se pueden considerar sondas idóneas para microscopía de dos fotones, así como agentes de bioimagen útiles en tomografía fotoacústica.⁴⁶ La señal de dispersión de la luz de las AuNPs es 10^5 - 10^6 veces más fuerte que la capacidad de emisión de un fluoróforo orgánico, por lo que las AuNPs se han empleado, tanto para la detección de células (sus receptores y sus metabolitos) mediante microscopía de campo oscuro,^{47, 48, 49} como para la obtención de imágenes por tomografía de coherencia óptica.⁵⁰ Por otro lado, y debido a su elevada masa atómica, el oro puede atenuar de forma considerable los Rayos X incidentes sobre las AuNPs. Esto las convierte en un

candidato ideal como agente de contraste para tomografía computarizada de Rayos X.

Cabe destacar que muchos de los estudios en bioimagen se han llevado a cabo utilizando AuNPs funcionalizadas con biomoléculas, lo que dirige su unión a células diana o moléculas biológicas específicas (Figura 3). Las AuNPs podrían actuar también como nanotransportadores para la liberación controlada de fármacos (*Targeted Drug Delivery Systems*).⁵¹ En estos nanodispositivos la liberación controlada se garantiza gracias a la elevada especificidad que presenta el ligando hacia su receptor. Con lo que su uso tanto diagnóstico, como terapéutico, se hace mucho más eficaz.⁵²

El campo electromagnético de la luz incidente sobre AuNPs puede mejorarse mucho en la superficie de estas debido a la excitación de plasmones superficiales, provocando la amplificación del campo láser incidente y de la dispersión Raman de este, lo que contribuye al efecto electromagnético SERS (*surface enhanced Raman scattering*). El SERS es una técnica de detección ultrasensible que mejora la dispersión Raman de moléculas absorbidas en una superficie metálica rugosa o en la superficie de nanopartículas metálicas.⁵³ El cambio de SPR no es la única consecuencia producida por la agregación de AuNPs. En comparación con las nanopartículas aisladas, los agregados de AuNPs aumentan el efecto SERS debido a la formación de puntos calientes en las regiones interpartícula.^{54,55,56,57,58} Las AuNPs actúan como antenas para la luz incidente con la misma frecuencia que la oscilación colectiva de los plasmones. Por lo tanto, las AuNPs concentran los campos eléctricos oscilantes en sus superficies, con la misma frecuencia que la luz incidente pero con intensidades varios órdenes de magnitud por encima. La mejora del campo eléctrico incrementa la señal Raman típica del compuesto con el que están en contacto las AuNPs, con lo cual mejora su detección.^{53,54,55,56,57} SERS es actualmente uno de los métodos espectroscópicos más potentes para la detección ultrasensible de moléculas, lo que vuelve a poner de manifiesto el gran potencial de las AuNPs como biosensores.

1.4. AuNPs, agentes fototérmicos para hipertermia óptica.

Como hemos visto hasta ahora, a consecuencia de sus propiedades ópticas las AuNPs son útiles como agentes de diagnosis, pero además pueden emplearse como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer o algunas enfermedades infecciosas.^{59, 60}

La terapia de hipertermia es un tratamiento médico no invasiva en el que los tejidos biológicos son expuestos a temperaturas superiores a la temperatura corporal normal para promover la destrucción selectiva de células anormales.⁶¹ La hipertermia de tumores sólidos consiste, por tanto, en la destrucción de células cancerosas mediante un aumento localizado de la temperatura hasta alcanzar valores entre 41° - 47°.⁶² Los tumores se destruyen selectivamente en este rango de temperatura debido a su vascularización defectuosa y a la reducida tolerancia al calor.⁶³ La hipertermia causa un daño celular irreversible al desnaturalizar las proteínas, lo que afecta a la estructura de la membrana celular.⁶⁴ Por lo tanto, la hipertermia para el tratamiento contra el cáncer podría inhibir la proliferación de células tumorales al destruirlas, o hacerlas más sensibles a los efectos de otras terapias antitumorales como la radioterapia o la quimioterapia.⁶⁵ En el caso de la radioterapia, la maquinaria de reparación del daño producido por la radiación en el ADN de las células cancerosas se ve alterado por el calor generado por hipertermia,⁶⁶ lo que mejora la eficacia de la radioterapia.

Las AuNPs son óptimos agentes fototérmicos ya que la luz absorbida en el NIR se transforma en calor, lo que provoca un aumento de temperatura que acabaría con las células a las que han sido dirigidas.⁶⁷ La luz absorbida en el NIR excita a los electrones libres de la banda de conducción de las AuNPs, lo que conduce a la aparición de fuertes repulsiones electrón-electrón, originándose una nube de electrones excitados en una escala de tiempo de decenas de femtosegundos. Estos electrones excitados se relajan por colisión con los iones de la red cristalina de las AuNPs, lo que resulta en el calentamiento homogéneo de

los nanocristales de oro mediante interacciones electrón-fonón.⁶⁸ Esto ocurre en 1 fs. La red cristalina de las AuNPs se enfría transfiriendo su calor al medio circundante mediante relajación fonón-fonón en 100 fs. La transferencia de calor de la AuNPs al medio es lo que provoca el aumento de temperatura localizado y su consecuente efecto antitumoral.⁶⁵

Sumado a lo anterior, la biofuncionalización de las AuNPs (Figura 3) aumenta la precisión y la eficacia del tratamiento hipertérmico, evitando la destrucción del tejido sano.⁶⁹

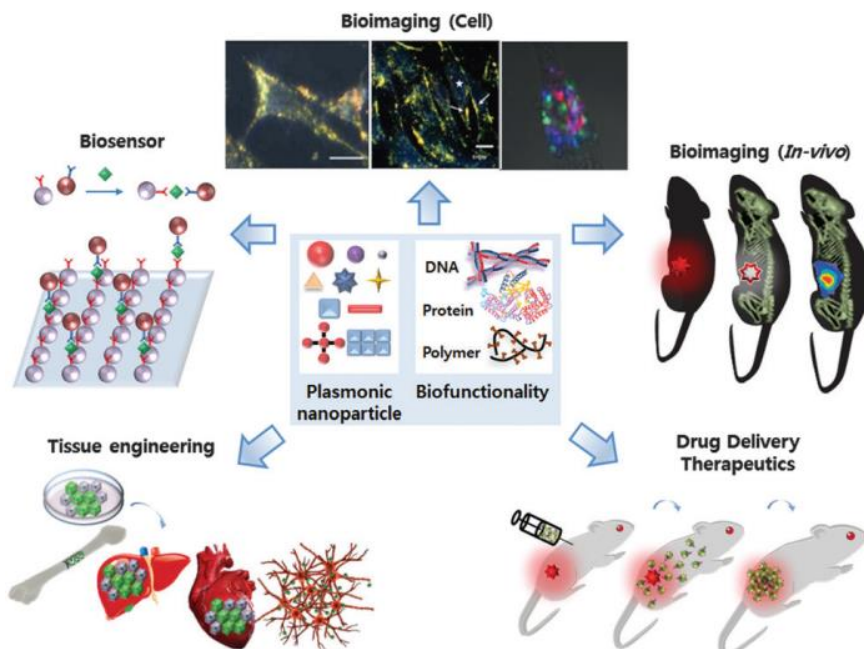


Figura 3. Biofuncionalización y aplicaciones biomédicas de las AuNPs.⁵²

Por lo tanto, la terapia fototérmica por infrarrojo mediada por AuNPs es un método mucho menos dañino que las quimioterapias convencionales. Además, esta misma técnica puede ser útil para destruir bacterias⁷⁰ y parásitos⁷¹ en el interior del organismo.

En resumen, son sus propiedades ópticas únicas y su estabilidad química las que explican que las AuNPs hayan sido muy estudiadas

durante las últimas décadas por la multitud de aplicaciones biomédicas potenciales que presentan (Figura 4).

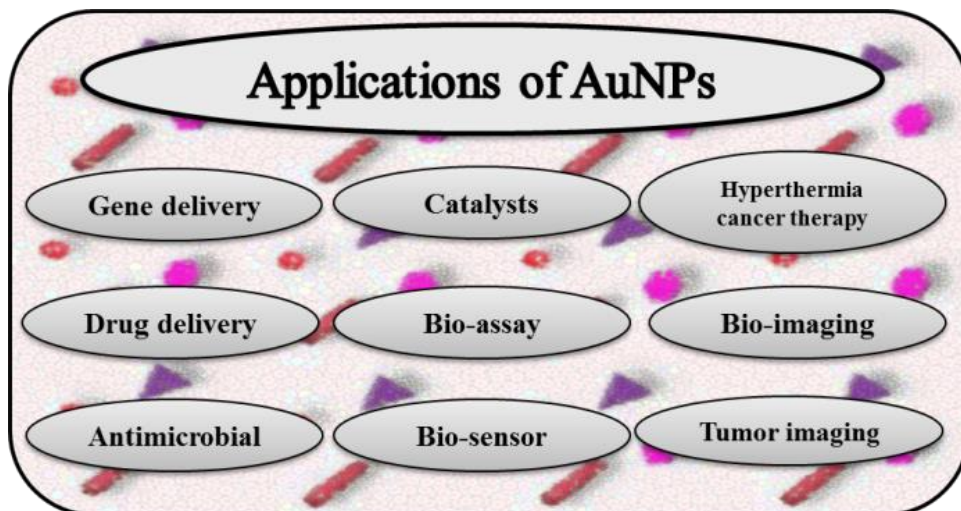


Figura 4. Aplicaciones biomédicas de AuNPs.

Se puede pensar, por tanto, en las AuNPs como firmes candidatas para el desarrollo de la siguiente generación de teranósticos y biosensores.

2. Aplicaciones biomédicas de nanopartículas de óxido de hierro.

Además de las AuNPs, otras nanopartículas metálicas también ofrecen aplicaciones biomédicas interesantes como es el caso de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs, del inglés *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*).

Una cualidad muy ventajosa para su aplicación en biomedicina, que además comparten con las AuNPs, es la facilidad de biofuncionalizar su superficie. Es posible revestir las SPIONs con biomoléculas que dirigen su unión a una diana biológica precisa, incrementando así su especificidad y la efectividad de su acción.^{72,73,74} Por esto, y principalmente por sus

propiedades magnéticas, las SPIONs son potenciales agentes teranósticos de las que se puede aprovechar su acción combinada como agentes de diagnóstico y terapia, por ejemplo, como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) (diagnóstico), y como agentes terapéuticos para destrucción de tumores sólidos por hipertermia magnética, y/o mediante la liberación controlada de fármacos (Figura 5).^{75,76,77,78,79}

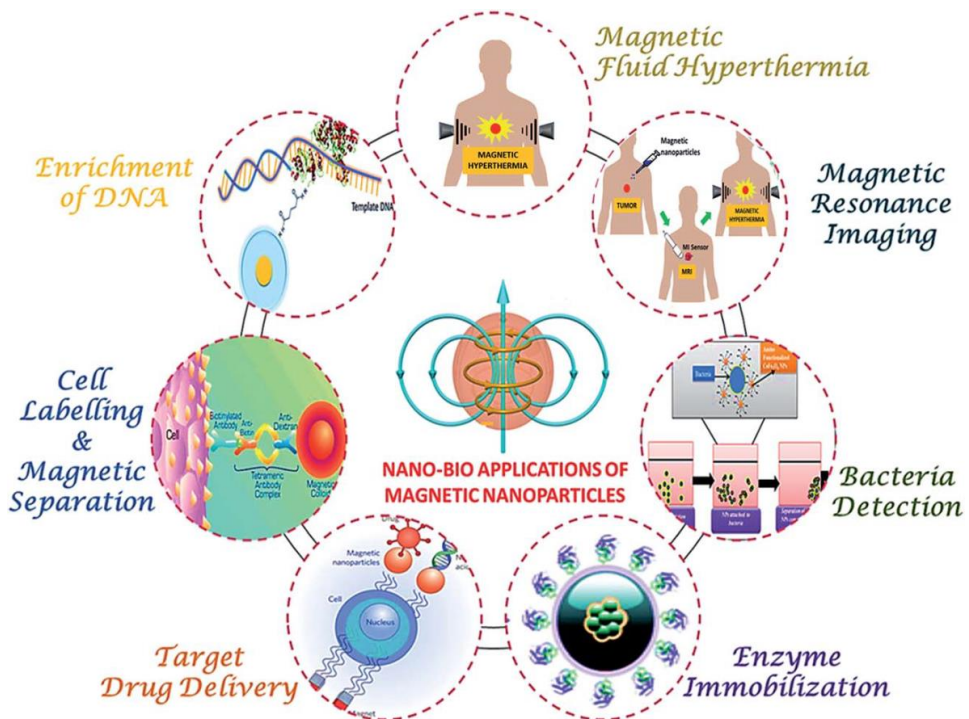


Figura 5. Aplicaciones biomédicas de las MNP.⁷⁵

2.1. Propiedades magnéticas y composición de las SPIONs.

El tamaño determina las propiedades magnéticas de las SPIONs, de tal manera que un diámetro inferior a 30 nm les confiere propiedades superparamagnéticas.⁸⁰ El superparamagnetismo es un fenómeno que se produce cuando las partículas son lo suficientemente pequeñas como para que las fluctuaciones térmicas provoquen una inversión aleatoria de

los momentos magnéticos de cada nanopartícula. La aleatoriedad de la orientación de estos momentos magnéticos da como resultado una magnetización neta igual a cero en ausencia de un campo magnético aplicado (Figura 6), sin embargo estas nanopartículas presentan una alta magnetización en presencia de un campo magnético.

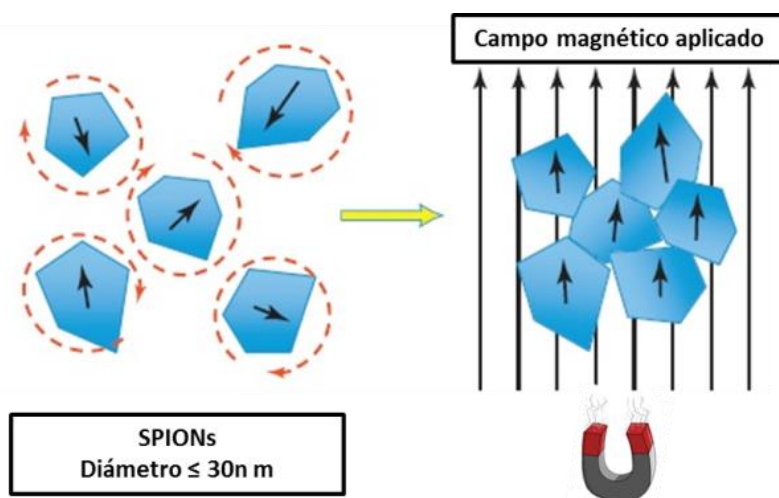


Figura 6. Comportamiento superparamagnético de las SPIONs. En presencia de un campo magnético aplicado los momentos magnéticos de cada partícula se alinean con dicho campo, dando lugar a la magnetización.⁷¹

El núcleo metálico de las SPIONs está formado por magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). La magnetita es un óxido de hierro mixto $\text{Fe(II)}/2\text{Fe(III)}$ (ferroso/diférrico) que presenta una estructura de espinela inversa, ya que los huecos octaédricos (B) de la celda unitaria están ocupados por el catión divalente Fe(II) , mientras que los cationes trivalentes Fe(III) están repartidos al 50% entre huecos octaédricos (B) y tetraédricos (A). Sólo se ocupan $1/2$ de los huecos octaédricos y $1/8$ de los huecos tetraédricos, formándose una celda unitaria cúbica centrada en las caras ligeramente distorsionada, que contiene 8 unidades $(\text{Fe}^{\text{III}})_A(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}})_B\text{O}_4$. La maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) es la forma oxidada de la magnetita, en la que todos o la mayoría de los átomos de hierro se encuentran en su estado trivalente (Fe(III)), lo cual origina sitios vacantes en los huecos octaédricos (B), a causa del mayor volumen de los iones

trivalentes Fe(III), conteniendo finalmente la celda unitaria 8 unidades $(\text{Fe}^{\text{III}})_A(\text{Fe}^{\text{III}}_{5/3}\square_{1/3})_B\text{O}_4$, donde \square representa una vacante. Es por esto que la densidad de la maghemita ($\rho=4870\text{Kg/m}^3$) es ligeramente menor que la de la magnetita ($\rho=5180\text{Kg/m}^3$) (Figura 7).⁸¹

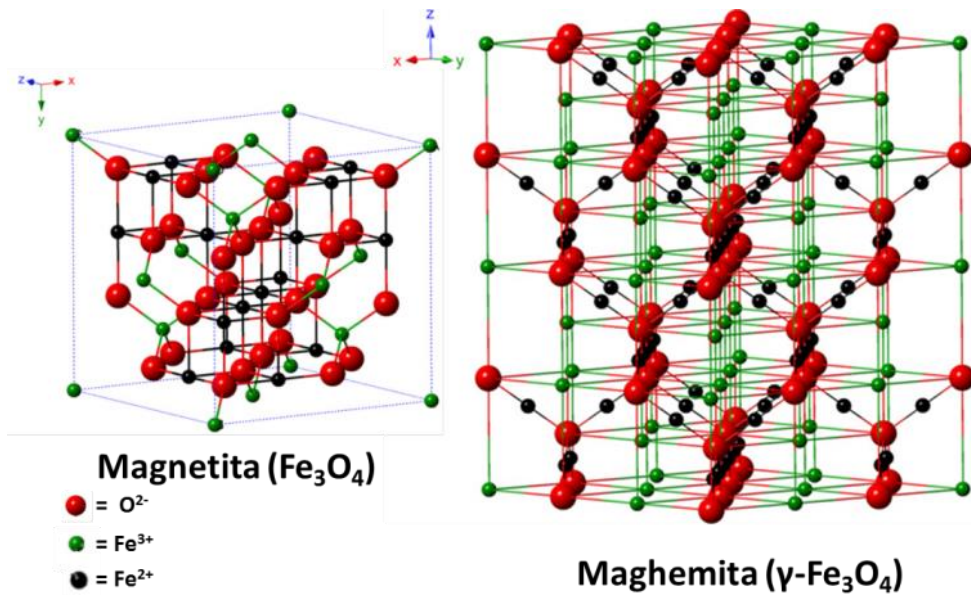


Figura 7. Estructura cristalina de la magnetita y la maghemita.⁸⁰

2.2. SPIONs como agentes de contraste para Resonancia Magnética por Imagen.

Como consecuencia de su alta susceptibilidad magnética, los núcleos de las SPIONs, entre 10-30 nm, proporcionan un fuerte aumento de la relajación transversal (T_2 y T_2^*) en las regiones tisulares donde las nanopartículas se localizan.⁸² La relajatividad se manifiesta, en las imágenes de resonancia magnética ponderadas en T_2 , como contraste negativo muy pronunciado (hipointensidad), que se visualiza como un oscurecimiento del tejido donde se han acumulado las SPIONs (Figura 8). Debido a que es el sistema fagocítico mononuclear el encargado mayoritario de la captación e internalización de las SPIONs de este tamaño, son especialmente útiles para la obtención de imágenes de

órganos que presenten una elevada actividad fagocítica por macrófagos, como es el caso de hígado y bazo.^{83,84,85}

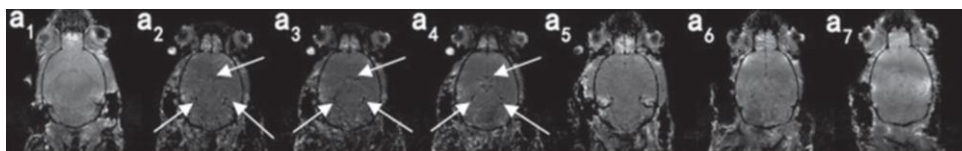


Figura 8. Imágenes de resonancia magnética T2* de cerebro de ratón antes (a₁) y después (a₂-a₇) de la inyección intravenosa de SPIONs. Se aprecia el contraste negativo (hipointensidad) en los vasos sanguíneos cerebrales donde se acumulan las SPIONs.⁸⁶

A pesar de su habitual uso como agentes de contraste negativo para MRI, las SPIONs también se han utilizado como agentes de contraste en secuencias de imágenes de resonancia magnética ponderadas en T1, o lo que es lo mismo, como agentes de contraste positivo (Figura 9).^{87,88,89,90}

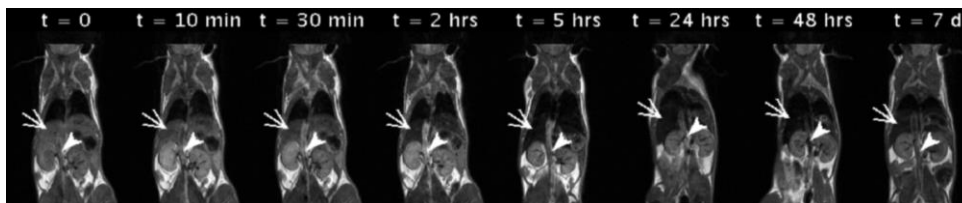


Figura 9. Imágenes de resonancia magnética ponderadas en T1 (contraste positivo) a diferentes tiempos. Tras la administración de SPIONs de 4,8 nm de diámetro se observó el contraste positivo en hígado de ratón (flechas) y en los capilares abdominales (puntas de flecha).⁹¹

Esto supone una alternativa al empleo de quelatos de gadolinio (Gd³⁺) como agentes de contraste positivo para MRI, evitando el efecto nefrotóxico de estos últimos.⁹²

Genera un interés especial en el empleo de las SPIONs como agentes de contraste para MRI,^{93,94} la posibilidad de administrarlas mediante técnicas no invasivas, por ejemplo administración oral, así como, dirigir las a órganos diana mediante la funcionalización de su superficie o mediante su incorporación a plataformas que dirijan dicha entrega.

2.3.SPIONs para hipertermia magnética.

Además del uso diagnóstico que presentan las nanopartículas de óxido de hierro, su uso terapéutico está probado para el tratamiento de

tumores por hipertermia magnética.⁷¹ El fundamento de la técnica es el mismo que el de la hipertermia térmica, con la diferencia de que la elevación local de la temperatura del tejido (41°-47°), en este caso, está provocada por la exposición de las SPIONs a un campo magnético alterno (Figura 10).

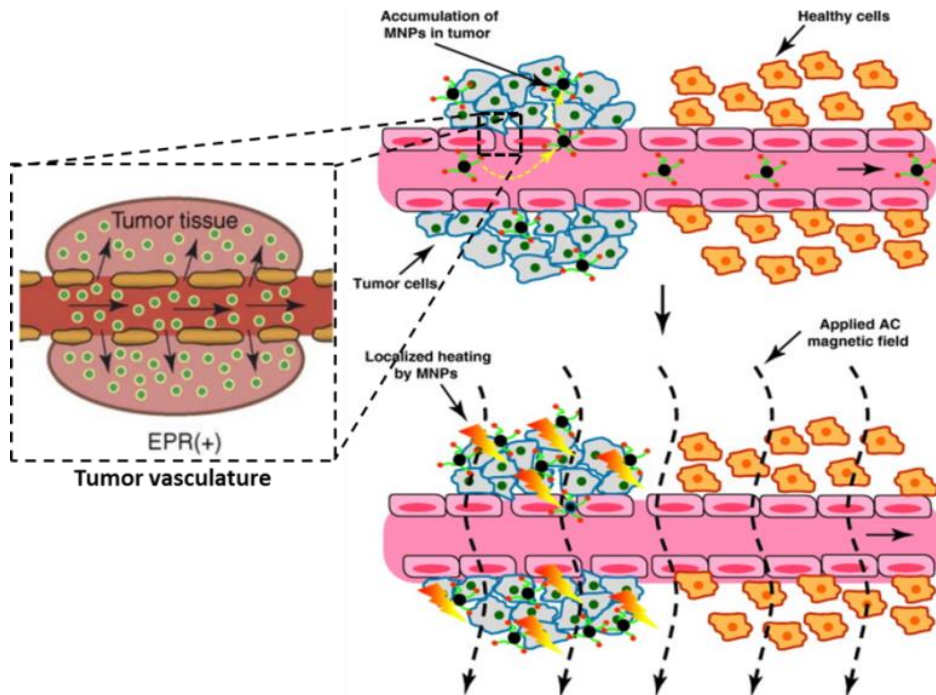


Figura 10. Fenómeno de EPR y terapia antitumoral por hipertermia magnética.^{71, 96}

La acumulación de las SPIONs en el interior del tumor sólido se ve favorecida tanto por el crecimiento descontrolado del tumor, como por la alta vascularización para satisfacer las necesidades nutricionales del mismo. Esto provoca que las estructuras fisiológicas en torno a él estén desorganizadas y poco estructuradas, dando lugar al fenómeno de EPR (*enhanced permeability and retention*).⁹⁵ Al presentar los vasos tumorales paredes endoteliales no alineadas y con grandes fenestraciones, así como un lento retorno venoso y un mal drenaje linfático, las nanopartículas se

mantienen en el tumor por más tiempo, algo que no ocurre con fármacos de bajo peso molecular (Figura 10).

Tras la acumulación de las SPIONs en el tumor, la eficacia de la hipertermia magnética se ve favorecida debido a que las células del tumor son más termosensibles que las células sanas. En primer lugar, porque las bajas concentraciones de oxígeno en el interior del tumor promueven un aumento en la producción de ácido láctico, que se acumula por el flujo sanguíneo defectuoso en el interior del tumor, aumentando la acidez del medio y con ello la termosensibilidad del tumor.^{96, 97} Y en segundo lugar, porque en el rango de temperaturas de 42°-45° la función de muchas proteínas estructurales y enzimáticas de la célula se ve alterada, lo que afecta al crecimiento y la diferenciación celular y puede inducir apoptosis (muerte celular programada).⁹⁸

Las SPIONs son buenos agentes de hipertermia magnética (Figura 11), ya que al someterlas a un campo magnético alterno absorben energía que luego se transforma en calor, principalmente, por dos procesos de relajación: la relajación de Néel y la relajación browniana o de Bronw.⁹⁷

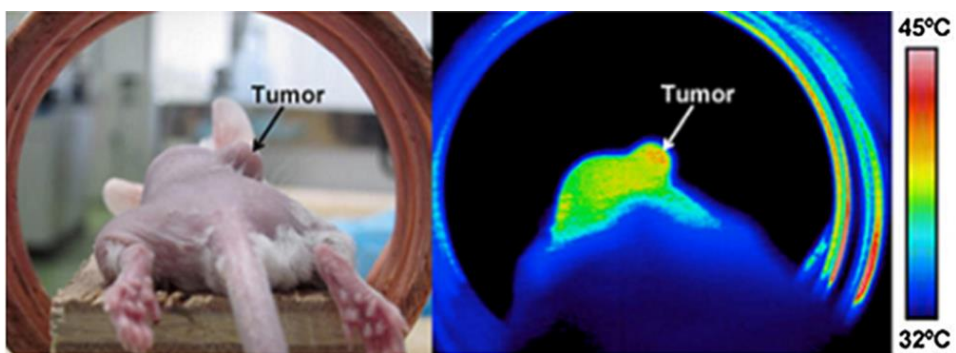


Figura 11. Fotografía (izquierda) e imagen térmica (derecha) de un ratón, 24 horas después de la inyección intravenosa de nanoclusters de SPIONs recubiertas con polietilenglicol (PEG) y ácido fólico (FA) (FA-PEG-SPION NCs), bajo la acción de un campo magnético alterno con $H=8 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ y $f=230 \text{ kHz}$.⁹⁹

La aplicación del campo magnético alterno provoca que el sentido de la magnetización cambie a lo largo del eje de imantación fácil de las

SPIONs, recibiendo así energía del campo aplicado que impulsa a los momentos magnéticos de las SPIONs a alinearse con él. Esta energía se disipa en forma de calor cuando el momento magnético de la nanopartícula se relaja a su orientación de equilibrio, lo que se conoce como relajación de Néel. Por la cual, en el interior de la SPION tiene lugar una rotación del momento magnético sin que haya una rotación mecánica de la nanopartícula (Figura 12). El proceso de relajación también puede darse mediante el movimiento browniano rotatorio de la SPION dentro del medio en el que se encuentra, lo que se conoce como relajación de Brown. En este caso, se produce una rotación mecánica de la SPION, la cual rota manteniendo su momento magnético en la misma dirección, de tal forma que la relajación, en este caso se da por rotación física de la nanopartícula (Figura 12).⁹⁸

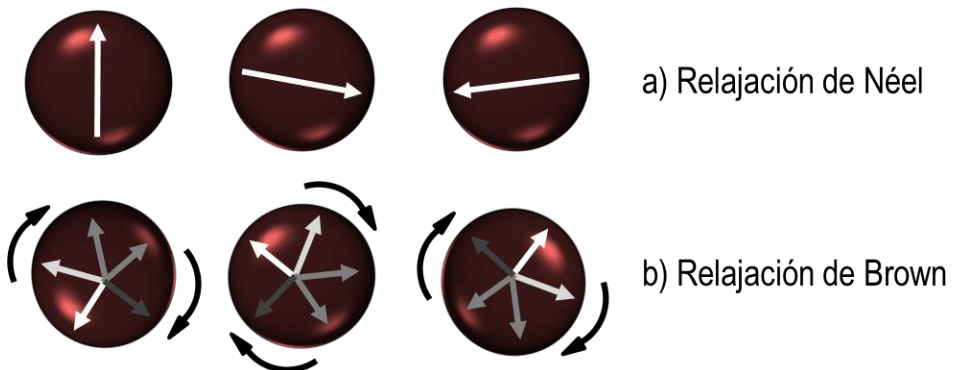


Figura 12. Esquema de los procesos de relajación a) de Néel, por rotación del vector del momento magnético sin rotación mecánica de las SPIONs, y b) de Brown, con rotación mecánicas de las SPIONs.

La combinación de ambos efectos de relajación causa el calentamiento generado por las SPIONs tras la aplicación del campo magnético alterno. La contribución de cada uno de los efectos en el calentamiento global depende principalmente del tamaño de las partículas, y para partículas ultrapequeñas como las SPIONs, el mecanismo dominante se debe a la rotación del momento magnético dentro de la nanopartícula, y está gobernado, por tanto, por el fenómeno de relajación de Néel.¹⁰⁰

2.4. SPIONs contra la anemia por deficiencia en hierro (IDA).

Además de las aplicaciones biomédicas de las SPIONs que ya hemos mencionado, la composición de estas nanopartículas ofrece la posibilidad de utilizarlas como una fuente de hierro en patologías que desencadenan un déficit de este metal en el organismo.

Las SPIONs son biocompatibles y fácilmente biodegradables por lo que pueden ser metabolizadas en el organismo, y los iones de hierro que las componen, almacenados en los depósitos de hierro del cuerpo y eventualmente incorporados por los eritrocitos (glóbulos rojos) formando parte de la hemoglobina.¹⁰¹ Por lo tanto, pueden ser empleadas como suplemento de hierro para el tratamiento de anemia por deficiencia en hierro (IDA, *iron deficiency anemia*).

2.4.1. IDA, un problema de salud global.

La anemia se diagnostica cuando los niveles de hemoglobina en sangre caen por debajo de los valores de corte establecidos (<13 g/dL en los hombres y <12 g/dL en las mujeres).¹⁰² Son tres los mecanismos principales por los que se desarrolla la anemia: eritropoyesis ineficaz, el cuerpo produce muy pocos glóbulos rojos; hemólisis, se destruyen los glóbulos rojos; y pérdida de sangre. Las deficiencias nutricionales, las enfermedades y los trastornos genéticos de la hemoglobina son los factores que más contribuyen a la anemia.¹⁰³ A nivel mundial las tres principales causas de la anemia son la deficiencia de hierro, las hemoglobinopatías y la malaria. La anemia es una enfermedad de gran importancia a nivel social ya que más de 1.600 millones de personas, casi un cuarto de la población mundial, son anémicas. Además, La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en todo el mundo, el 42% de las mujeres embarazadas, el 30% de las mujeres no embarazadas (de 15 a 50 años), el 47% de los niños en edad preescolar (de 0 a 5 años) y el 12,7% de los hombres mayores de 15 años son anémicos.¹⁰⁴ Por otro lado, la deficiencia de hierro representa aproximadamente la mitad de los casos de anemia del mundo (IDA).¹⁰⁵ Y curiosamente, el 9% de los

pacientes mayores de 65 años con IDA padecen algún tipo de cáncer gastrointestinal tras el diagnóstico.¹⁰⁶

La deficiencia de hierro puede ser el resultado de una ingesta y absorción inadecuadas del metal, deberse a una mayor demanda de hierro durante el crecimiento, o a la pérdida excesiva de hierro. Las mujeres en edad fértil corren un riesgo particular a padecer esta deficiencia, debido a la menstruación, y al hecho que el embarazo y el parto resultan en una pérdida neta de hierro de 580 a 680 mg. Esto último, debido a las necesidades fetales y placentarias y a la hemorragia durante el parto.¹⁰⁷ En niños, el requerimiento de hierro en la dieta es muy alto debido a la expansión de los hematíes o glóbulos rojos. De hecho, el requisito promedio estimado de hierro, al día y por kilogramo, para un bebé de 6 a 12 meses (6,9 mg) excede el de un varón adulto (6 mg).¹⁰⁸

Durante el embarazo el metabolismo del hierro de la madre (absorción, almacenamiento y uso) tiene un efecto directo en los niveles del metal en el feto. Las reservas maternas de hierro pueden influir en el peso del bebé al nacer y en la duración de la gestación. Tanto es así, que los bebés prematuros o de bajo peso nacen con menores reservas de hierro y, por lo tanto, corren un mayor riesgo de padecer IDA.¹⁰⁹ Por todas estas razones; mujeres embarazadas, mujeres no embarazadas en edad fértil y los niños en edad preescolar corren un riesgo particular de padecer IDA.

Cuando la concentración de hemoglobina disminuye, la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos se ve comprometida, lo que provoca síntomas como fatiga, reducción de la capacidad de trabajo físico y dificultad para respirar, entre otros.¹⁴⁷ Mientras que en algunos pacientes, la anemia puede ser asintomática, la mayoría presentarán síntomas que incluyen debilidad, irritabilidad, sequedad de boca, picor, fatiga, disminución de la tolerancia al ejercicio y dolor de cabeza.¹¹⁰

En cuanto al diagnóstico, la concentración de hemoglobina, si bien es esencial para diagnosticar la anemia, no puede por sí sola determinar la causa de la anemia. Para determinar si la anemia es causada por la deficiencia de hierro, se necesitan mediciones adicionales, como la ferritina sérica o el receptor de transferrina sérico, entre otras. La ferritina sérica es una medida de la cantidad de hierro almacenado en el cuerpo. En ausencia de infecciones, la ferritina aumenta cuando hay reservas de hierro, y disminuye a medida que se agotan. Por otro lado, el nivel de receptor de transferrina en el suero refleja la intensidad de la eritropoyesis y la demanda de hierro; los niveles de receptor de transferrina aumentan después de que se hayan agotado las reservas de hierro.¹¹¹

2.4.2. El papel de las SPIONs en la lucha contra la IDA.

Aumentar la ingesta de alimentos ricos en hierro normalmente no es suficiente para corregir la deficiencia. Actualmente el tratamiento mediante terapia oral debe usarse en pacientes con anemia por deficiencia en hierro, de leve a moderada, que puedan tolerar los efectos secundarios gastrointestinales asociados a los suplementos de hierro empleados: como heces oscuras, náuseas y dolor epigástrico. Las terapias orales suponen el consumo de hierro en forma de sales como: sulfato ferroso, gluconato ferroso, fumarato ferroso y otros preparados. La dosis oral debe proporcionar a los adultos 150-200 mg de hierro elemental al día¹¹² y 3-6 mg de hierro elemental/kg/día para los niños.¹¹³

La irritación gastrointestinal secundaria al tratamiento con suplementos de hierro se puede minimizar cuando se administran con o antes de las comidas. También la vitamina C puede mejorar la absorción, mientras que las tetraciclinas y los antiácidos pueden disminuir la absorción.¹⁵⁸

La absorción de hierro tiene lugar principalmente en el duodeno, y el efecto positivo de los antioxidantes y moléculas con capacidad ferrireductasa (reducción de Fe(III) a Fe(II)) en la absorción de hierro

tiene su explicación en el hecho que en los humanos, el hierro ingresa al intestino delgado principalmente como Fe (III) como resultado de la oxidación de Fe (II) por los componentes del jugo gástrico del estómago. La proteína ferrireductasa DcytB (citocromo B duodenal, *duodenal cytochrome B*) está altamente expresada en los enterocitos duodenales y reduce Fe (III) a Fe (II). Tras la reducción, el Fe (II) se internaliza a través de la membrana apical de los enterocitos mediante transportadores de metal divalente, principalmente DMT1 (transportador de metales divalentes 1, *divalent metal transporter 1*).¹¹⁴ Así que la administración de Fe (II) junto con antioxidantes y moléculas con capacidad ferrireductasa favorece su absorción por el efecto sinérgico de estos últimos con DcytB.

La reposición oral de hierro generalmente es el tratamiento de elección para la anemia por deficiencia en hierro. Sin embargo, en pacientes que no pueden tolerar el hierro por vía oral, que presentan malabsorción o que pierden sangre a un ritmo que la terapia oral no puede compensar, está indicado el reemplazo intravenoso de hierro.¹¹⁵ En este sentido, Ferumoxytol es una preparación de hierro intravenosa que desde 2009 se emplea para el tratamiento de la anemia causada por la enfermedad renal crónica.¹¹⁶ Se trata de SPIONs recubiertas de carbohidratos.¹¹⁷ La fórmula, comercializado bajo el nombre de Feraheme® (Ferumoxytol), no presenta hierro libre. A medida que su uso ha ido en aumento han aparecido una serie de efectos adversos tras la administración del medicamento que incluyen: mareos, desmayos, presión arterial baja (hipotensión), reacciones en el sitio de inyección (dolor, hinchazón o enrojecimiento), náuseas, vómitos, dolor de estómago, diarrea, estreñimiento, dolor de cabeza, hinchazón de manos o pies, dolor de pecho o tos.¹¹⁸

La situación actual frente al tratamiento de la anemia por deficiencia en hierro pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y suplementos nutricionales de hierro para frenar el avance

de esta enfermedad, que se sitúa por ahora como uno de los problemas de salud global más preocupantes.

3. “Microorganismos inusuales”. De la naturaleza al laboratorio.

La adaptación de organismos a ambientes con altos niveles de metales surge por la evolución de los mecanismos biológicos para hacer frente a dichos metales. Estos mecanismos tienen como fin cambiar la naturaleza química de los metales para evitar su toxicidad. Este cambio químico puede materializarse en la formación de nanopartículas del metal en cuestión. Por lo tanto, la formación de nanopartículas es el producto de un mecanismo de resistencia a un metal específico, y esto puede usarse como una vía alternativa para producirlas.¹¹⁹

3.1. Bacterias magnetotácticas naturales y sus homólogas sintéticas.

Existen en la naturaleza microorganismos productores de nanopartículas metálicas, tanto intra- como extracelularmente. En ocasiones la generación de las nanopartículas es resultado de un complejo sistema regulado genéticamente, y de su formación depende la supervivencia del organismo, como es el caso de los nanocristales magnéticos producidos por las bacterias magnetotácticas.¹²⁰ Este singular grupo de bacterias, descubiertas a mediados de los 70 por Blackmore,¹²¹ son capaces de alinearse pasivamente y desplazarse activamente a lo largo de campos magnéticos, incluido el de la Tierra¹²² lo que consiguen gracias a los magnetosomas, unas vesículas intracelulares constituidas por cristales de magnetita (Fe_3O_4) o greigita (Fe_3S_4) biomineralizados rodeados de una membrana.¹²³ Los magnetosomas se forman por una invaginación de la membrana citoplasmática, en estas vesículas se produce el acúmulo de hierro, la nucleación de un nanocristal de magnetita o greigita y el posterior crecimiento del mismo.¹²⁴

El mecanismo de formación y alineamiento de los magnetosomas es un proceso complejo muy bien regulado. En el caso de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, está guiado por multitud de enzimas, entre las que destacan dos proteínas, MamK y MamJ.¹²⁵ Las subunidades poliméricas de MamK forman el filamento magnetosómico que se extiende a lo largo del eje mayor de la magnetobacteria.¹²⁶ MamJ es la proteína implicada en el anclaje del magnetosoma al filamento magnetosómico.¹²⁷ De esta forma, los nanocristales de los magnetosomas se orientan a lo largo del eje del filamento magnetosómico, y el momento magnético del filamento es la suma de los momentos individuales de los nanocristales de la cadena. La bacteria maximiza así su momento magnético alineando los magnetosomas, y se comporta como un único imán gracias al ensamblaje de los mismos (Figura 13).



Figura 13. (A) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una delgada sección de la bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense* con el filamento magnetosómico dispuesto a lo largo de su eje mayor, los nanocristales del interior de los magnetosomas son de maghemita.¹²¹ (B) Reconstrucción tridimensional del interior de una célula de *Magnetospirillum gryphiswaldense*. La membrana celular en azul, los nanocristales del magnetosoma en rojos, y las vesículas que lo rodean, amarillas. La membrana vesicular y los cristales del magnetosoma “maduro” están enhebrados como perlas a lo largo de una estructura filamentososa (verde, MamK), muy similar al citoesqueleto.¹²⁸

Para la producción de nanocristales de magnetita o greigita las bacterias magnetotácticas presentan requerimientos de hierro bastante mayores a los de las bacterias no-magnetotácticas, y este metal puede suponer hasta el 4% de su peso seco.¹²⁹ La absorción de los iones de hierro se lleva a cabo tanto en su forma férrica (Fe(II)) como ferrosa (Fe(III)),¹³⁰ y en ocasiones está mediada por sideróforos.¹³¹, pequeñas

moléculas de bajo peso molecular que actúan como quelatos del ión férrico, acomplejándolo y disolviéndolo.

La supervivencia de las bacterias magnetotácticas depende de que su hábitat presente unas condiciones ambientales muy concretas, las cuales se dan en una estrecha región microaeróbica conocida como interfase óxica-anóxica.¹³² La formación de los magnetosomas (Figura 14) y la consecuente capacidad de las bacterias de alinearse y desplazarse por las líneas del campo geomagnético es determinante a la hora de que las bacterias encuentren esta interfase, y por tanto, condición necesaria para la supervivencia de las bacterias magnetotácticas.

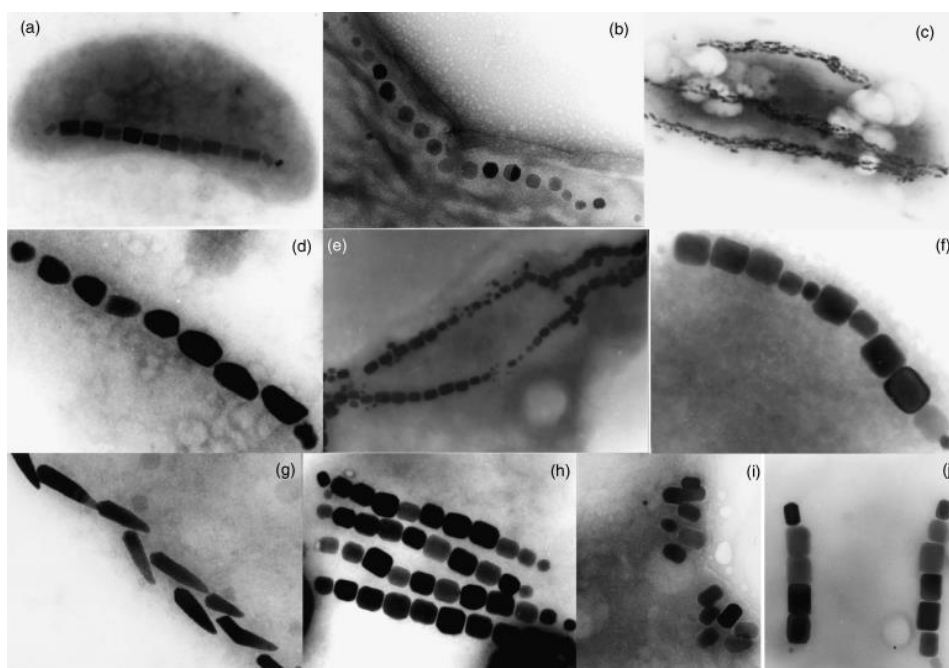


Figura 14. Diversas morfologías de los nanocristales en los magnetosomas de bacterias magnetotácticas. Dependiendo de la morfología de las nanopartículas, que pueden ser: prismas elongados (a, e, f, h, i, j), cúbica-octaédricas (b) o en forma de bala (c, d, g), el alineamiento de los magnetosomas cambia.¹²¹

El ensamblaje de los magnetosomas, que contienen nanopartículas de magnetita o greigita, mejora las propiedades magnéticas respecto a las nanopartículas magnéticas independientes, ya que su respuesta

magnética es más fuerte. Debido a esto, las bacterias magnetotácticas podrían aplicarse en el área de la biomedicina como: agentes de contraste por RMI; como *carriers* y liberadores de determinados fármacos, incluido material genético; y para el tratamiento del cáncer por hipertermia magnética.^{133,134} Sin embargo, con ellas aparecen una serie de inconvenientes o retos a superar, ya que son difíciles de aislar y de cultivar en un laboratorio, es muy complicada su producción a escala industrial y no existen precedentes de su uso en humanos.

Con la intención de superar estas barreras y así poder aprovechar sus atractivas propiedades magnéticas, se han llevado a cabo intentos para crear bacterias magnéticas estructuralmente miméticas mediante ingeniería genética.^{135,136} Otra vía más sencilla, económica y en un solo paso ha sido la desarrollada recientemente por Domínguez-Vera y colaboradores,²¹ los cuales, han conseguido desarrollar una estrategia química que permite la preparación de lo que denominan “bacterias magnéticas artificiales”, obtenidas mediante acoplamiento de SPIONs de tipo maghemita sobre la superficie externa de bacterias probióticas, concretamente *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacteria breve*. Esta metodología, permite obtener de forma sencilla, con gran rendimiento y reproducibilidad, bacterias probióticas “cargadas” con nanopartículas magnéticas (Figura 15).

La técnica desarrollada se fundamenta en el control de la interacción química entre las nanopartículas de maghemita y la superficie externa de la bacteria, en particular, en la interacción electrostática entre la superficie de las nanopartículas y el biofilm de la bacteria. Esta técnica ha permitido obtener imanes vivos a temperatura ambiente (Figura 16).

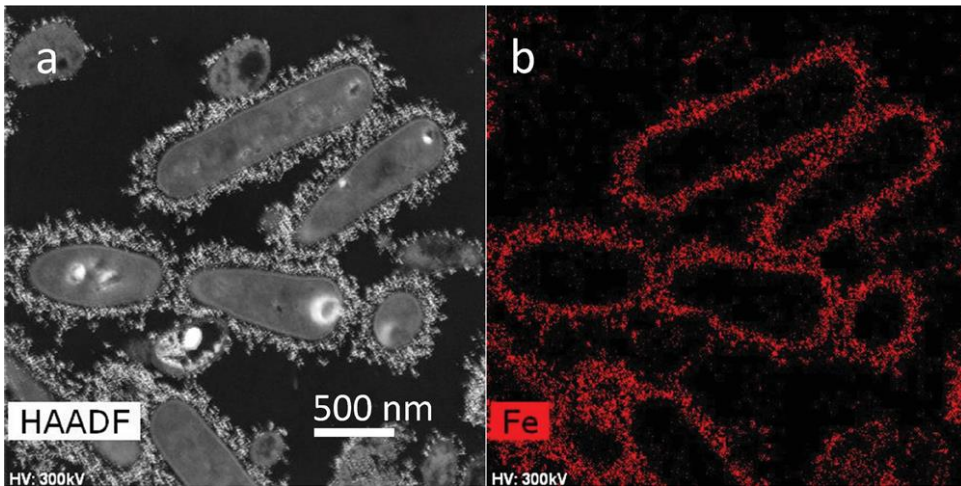


Figura 15. (a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión por barrido a campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM) de una delgada sección de resina epoxi donde se aprecian las nanopartículas de maghemita en la superficie externa de las bacterias magnéticas artificiales. (b) Mapa composicional de hierro EDX de la imagen (a) (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*).²¹

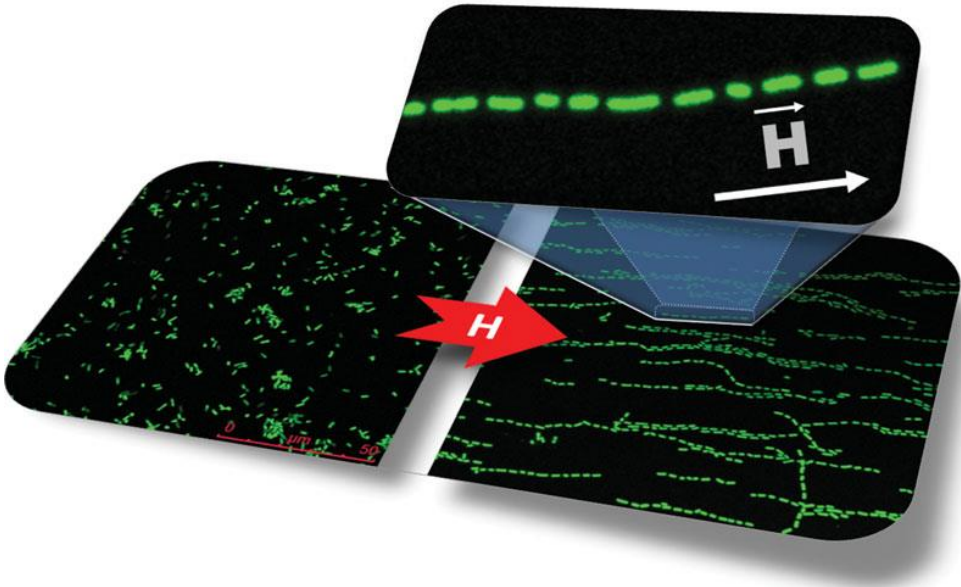


Figura 16. Alineamiento de las bacterias magnéticas artificiales marcadas con SYTO9 verde (fluoróforo intercalante de ADN) con un campo magnético (H) aplicado.²¹ Las bacterias magnéticas artificiales se comportan como imanes a temperatura ambiente, la presencia de SYTO9 certifica la viabilidad de las mismas.²¹

El comportamiento magnético de las bacterias magnéticas artificiales abre un enorme abanico de aplicaciones a nivel biomédico, ya que se superan algunos de los obstáculos que presentaban las bacterias magnetotácticas naturales para su aplicación en biomedicina. Así como, el aislamiento, el cultivo y la producción a escala industrial de las homólogas artificiales está garantizado, y su uso inocuo en humanos demostrado.

3.2. La naturaleza como inspiración para la biosíntesis artificial de nanopartículas metálicas.

A diferencia de los casos en los que la formación de nanopartículas metálicas es el resultado de una compleja regulación genética en ambientes en los que la concentración del metal no es excesiva, en otras ocasiones en la naturaleza, la formación de nanopartículas es la respuesta a la presencia de un metal tóxico en el medio, es decir, un mecanismo de tolerancia a metales, normalmente metales pesados. La detoxificación microbiana puede llevarse a cabo tanto por biomineralización extracelular, biosorción, acomplejamiento o precipitación de los metales, o bioacumulación intracelular.^{137, 138, 139} Así, en bacterias reductoras de sulfatos se han observado nanopartículas de sulfuro de zinc (ZnS) y sulfuro de cobre(II) (CuS), resultantes de la reacción entre el sulfuro de hidrógeno (H₂S) generado por la actividad bacteriana y los metales en el medio.¹⁴⁰ También Klaus y colaboradores mostraron, por primera vez, que la bacteria *Pseudomonas stutzeri* AG 259, aislada de minas de plata y resistente a este metal era capaz de reducir iones de plata y formar nanopartículas de plata.^{141, 142} La exposición de *P. stutzeri* a muy altas concentraciones de iones de plata resultó en la formación de nanopartículas de plata (Ag) y de sulfuro de plata (Ag₂S), intracelulares y con un diámetro entre 25 y 45 nm.^{40, 41} también se han formado en el interior de las bacterias Nanopartículas monocristalinas con diferentes morfologías, como triángulos equiláteros y hexágonos, con un tamaño desde unos pocos hasta 200 nm (Figura 17).

En todas estas situaciones es indispensable la presencia del metal en el medio.

De la observación de lo que ocurre en ambientes naturales, los investigadores dedujeron que poniendo en contacto microorganismos con iones metálicos inusuales en su hábitat se aprovecharía la capacidad adaptativa a ambientes con metales para hacer química verde y generar así productos biomiméticos que, ni son necesarios para el desarrollo de los microorganismos, ni son resultado de su metabolismo habitual. Los iones metálicos son convertidos en nanopartículas metálicas, que se pueden acumular intra- y/o extracelularmente, y cuyos mecanismos de síntesis están todavía por determinar. Desde los años 80 son muchas las especies de organismos estudiadas y utilizadas para la síntesis de nanopartículas metálicas mediada por microorganismos.

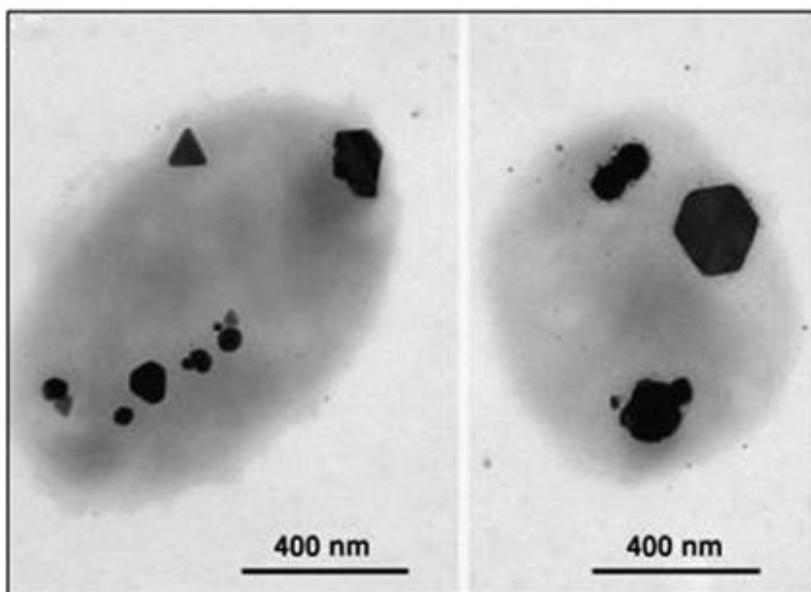


Figura 17. Imágenes TEM de secciones de *Pseudomonas stutzeri* con nanopartículas de Ag_2S con diferentes morfologías.⁴⁰

Se han empleado diferentes especies de bacterias y hongos, de hábitats y formas nutricionales distintos como biofactorías de nanopartículas de metales nobles, como Au, Ag, Pt y Pd. Se han estudiado

estos microorganismos como posible aplicación para extracción mineral y recuperación metálica.^{143, 144, 145} Las nanopartículas de metales nobles, biosintetizadas por microorganismos, presentan atractivas propiedades ópticas, electrónicas y químicas,^{7, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152} lo que las convierte en nanomateriales útiles para un abanico amplísimo de aplicaciones en diversas áreas, de las cuales, destacan las biomédicas. Las bacterias han sido los microbios más empleados en la biosíntesis de nanopartículas de metales nobles por la facilidad a la hora de cultivarlas y manipularlas, simplificando así todo el proceso de producción.^{153,154,155}

3.3. Bacterias inusuales como biofactorías de AuNPs.

La biosíntesis, mediada por bacterias, de AuNPs está ganando fuerza debido a la facilidad de reducción de las sales de Au a temperatura ambiente. Este nuevo método simple y en un solo paso parece ser apropiado para la producción a gran escala de nanopartículas de oro. Se trata de un método rápido, benigno medioambientalmente, económico y biocompatible, y por tanto, seguro para su uso en estudios clínicos. Este modo de producción ha generado mucho interés por la necesidad de desarrollar nuevos métodos en síntesis respetuosos con el medio ambiente dentro de los campos de la nanotecnología y la biotecnología.¹⁵⁶

Los primeros estudios referentes al empleo de microorganismo para la bioproducción de AuNPs se remontan a la década de los 80. Cuando Beveridge y Murray demostraron que la incubación de HAuCl_4 con la especie *Bacillus subtilis* daba como resultado la acumulación de nanopartículas de oro, con tamaños de 5-25 nm sobre la pared celular (Figura 18).¹⁵⁷

Un estudio más reciente ha mostrado que la cepa de la cianobacteria filamentosa *Plectonema boryanum* UTEX 485 es capaz de sintetizar AuNPs cuando reacciona con complejos de tiosulfato de oro (I) ($\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$) y AuCl_4^- .¹⁵⁸ Las nanopartículas formadas con un tamaño de 10-25 nm se depositaron en la pared celular, mientras que las de menos

de 10 nm se forman intracelularmente (Figura 19). La incubación prolongada de los iones de Au (III) con la biomasa dio como resultado la formación de delgados prismas triangulares y hexagonales con un tamaño de unas pocas micras. Los investigadores que realizaron este trabajo propusieron que las nanopartículas de oro fueron sintetizadas en vesículas de membrana en el interior celular. Los componentes de las vesículas son ricos en ligandos de fósforo, azufre y nitrógeno que al reaccionar con los iones de oro dirigen la deposición de nanopartículas en el interior de la célula y en el espacio periplasmático. Sin embargo, sigue siendo un misterio el mecanismo preciso bioquímico que envuelve la biosíntesis de nanopartículas de oro mediada por *P. boryanum*.

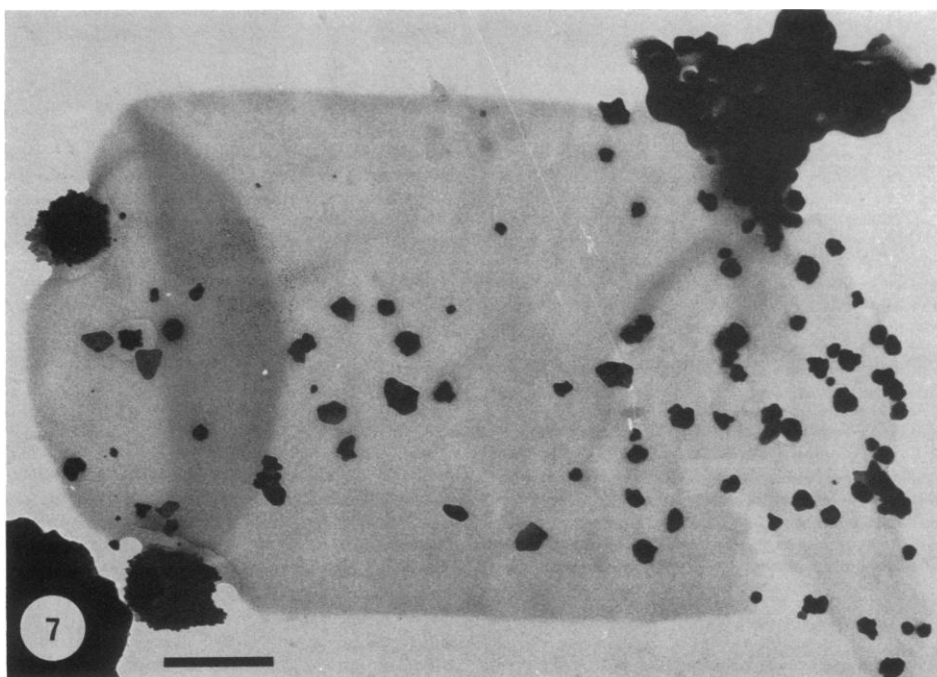


Figura 18. Nanopartículas de oro biosintetizadas en el *biofilm* de la pared celular de *Bacillus subtilis*.⁵⁶

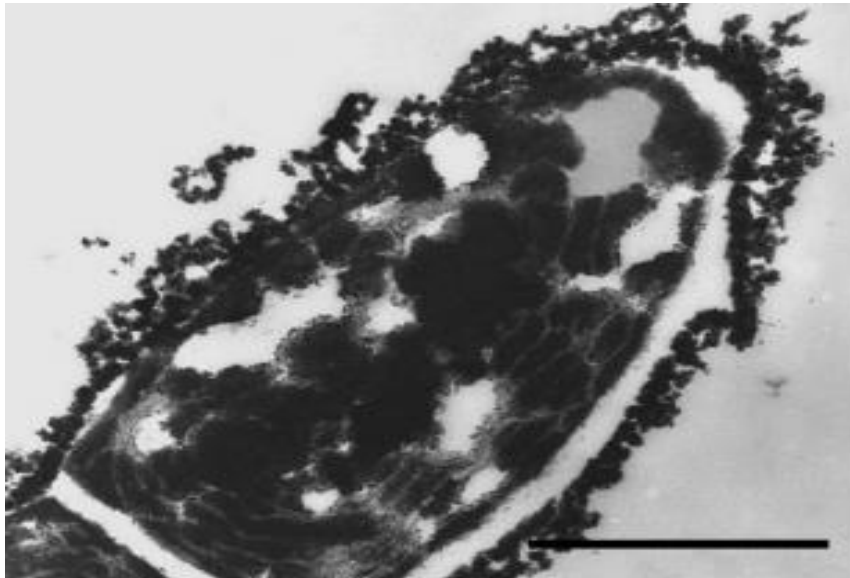


Figura 19. Micrografía TEM de una delgada sección de cianobacteria con nanopartículas de oro y de sulfuro de oro depositadas en la envoltura e interior celular, la síntesis se llevó a cabo a 100°C.⁵⁸

3.3.1. Mecanismos de biosíntesis de las AuNPs mediada por bacterias.

El mecanismo de síntesis de AuNPs mediante el empleo de diferentes agentes biológicos es todavía desconocido. Diversas entidades químicas presentes en los compuesto biogénicos podrían actuar como agentes reductores que reaccionan con iones metálicos dirigiendo su reducción y consecuente síntesis de nanopartículas metálicas (Figura 20).¹⁵⁹

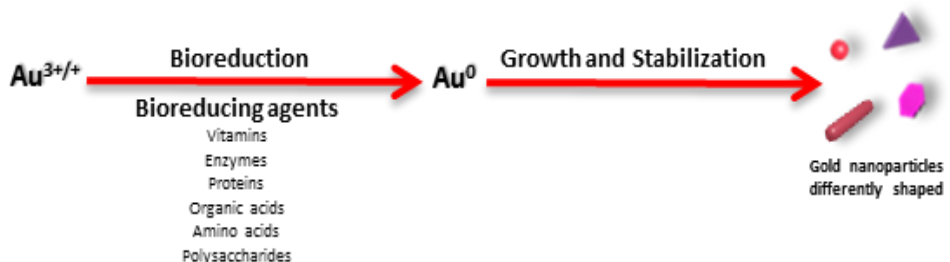


Figura 20. Mecanismo de biorreducción de oro y estabilización en nanopartículas.

El mecanismo de reducción llevado a cabo por las bacterias incluye reductasas, naftoquinonas, flavonoides y antraquinonas con potencial redox suficiente para reducir los iones de Au (III) en nanopartículas de oro.¹⁶⁰

Stenotrophomonas maltophilia, una bacteria anaerobia gramnegativa, es un microorganismo útil para la síntesis de AuNPs con un tamaño y una forma deseados. Los resultados de los experimento llevados a cabo con esta cepa aislada, demostraron que una reductasa bacteriana dependiente de NADPH reduce los iones Au^{3+} a Au^0 mediante un mecanismo de inyección de electrones (Figura 21). La síntesis de la reductasa, específica de los iones Au(III) presente en *Stenotrophomonas maltophilia*, puede ser inducida por los iones metálicos para posteriormente reducirlos a nanopartículas.¹⁶¹

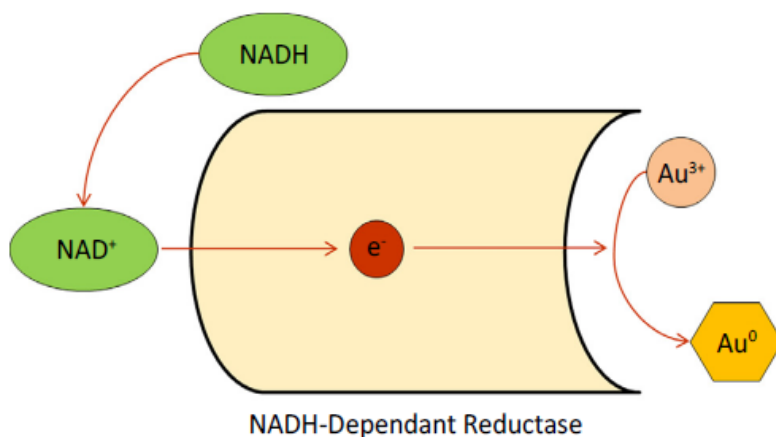


Figura 21. Mecanismo de síntesis de AuNPs mediante reducción enzimática por *Stenotrophomonas maltophilia*.³²

Muchas bacterias reductoras de hierro (III) pueden reducir iones Au (III) en condiciones de anaerobiosis. Entre ellas *Shewanella algae*, un bacilo gramnegativo con un solo flagelo polar. En presencia de H_2 , *S. algae* reduce completamente los iones de oro hasta formar AuNPs de 10-20 nm. Se ha propuesto que en la biorreducción pueden estar involucrados citocromos tipo c del microorganismo. Otra hipótesis

interpelada fue que las hidrogenasas específicas del bacillo podían estar involucradas en la reducción de los iones de oro cuando el hidrógeno actúa como donador de electrones. También fue interesante la presencia de reductasas de oro en la membrana celular, lo cual podría estar relacionado con la formación directa de AuNPs extracelulares.¹⁶²

Recientemente se ha investigado el mecanismo de formación de AuNPs llevado a cabo por *Actinobacter sp.*¹⁶³ La exposición de la biomasa a los iones de Au (III) resultó en la formación de nanoprismas de oro (AuNPsR) con morfologías triangulares y hexagonales, de diámetro desde los 200 nm a los 2 µm y pocos nanómetros de espesor. Al profundizar en el mecanismo bioquímico de formación de los AuNPsR se reveló que la citocromo c oxidasa de *Actinobacter sp.* es responsable de la reducción inicial de los iones acuosos Au (III). Tras esta primera reducción se forman pequeñísimas nanopartículas de oro esféricas, denominadas semillas de Au. La pared bacteriana provee un sitio de nucleación perfecto para el crecimiento de las semillas hacia morfologías triangulares y hexagonales. Los investigadores identificaron también tres proteínas de la pared celular que guían el ensamblaje del oro coloidal y la formación de AuNPsR.

3.3.2. Parámetros críticos en la biosíntesis de AuNPs mediada por bacterias.

La concentración de sal de oro, la especie bacteriana, el medio de cultivo, el pH, la temperatura, la presencia o ausencia de oxígeno, el tiempo de contacto entre los iones metálicos y los microbios, y la agitación son los principales parámetros que afectan a la biosíntesis de AuNPs mediada por bacterias.^{11, 16} Por tanto, el ratio de producción, la morfología, el tamaño y la agregación de las nanopartículas producidas dependerá de estos parámetros. Controlarlos es la vía para llevar a cabo procesos de producción de AuNPs con una morfología y tamaño deseados, así como, aumentar el rendimiento de la biosíntesis.

Un claro ejemplo de la dependencia del pH en la biosíntesis de AuNPs es el de la bacteria Gram negativa *Rhodopseudomonas capsulate*.¹⁶⁴ A pH neutro la biorreducción de los iones Au (III) da lugar a la formación de nanopartículas de 10-20 nm. A valores de pH más ácidos se formaron partículas triangulares con un tamaño de lado ~500 nm, acompañadas de AuNPs esféricas más pequeñas. Al exponer un extracto de cultivo de *R. capsulate* a concentraciones más altas de Au se observaron nanocables con una estructura en red. La formación de los nanocables se cree que se debe tanto al fenómeno de maduración de Ostwald, como a la deposición de oro metálico recién formado por la reducción de iones de oro.¹⁶⁵ Según el fenómeno de maduración de Ostwald, en un coloide, las partículas grandes están energéticamente más favorecidas que las pequeñas, pues al presentar muchos más átomos en el interior que en superficie son más estables que las más pequeñas. Estas últimas tienden a disolverse, puesto que los átomos de superficie tienden a desprenderse de la partícula pequeña por su inestabilidad energética. La disolución de las partículas pequeñas satura la solución de átomos libres que por estabilidad termodinámica van a condensarse en las partículas más grandes, favoreciendo su crecimiento (Figura 22).

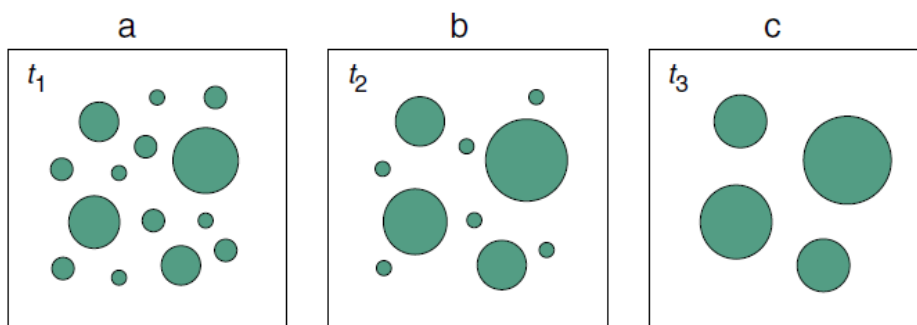


Figura 22. Ilustración del fenómeno de maduración de Ostwald de partículas en una fase diferente a la fase de la matriz en la que se encuentran. Las partículas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas por difusión atómica de las últimas a través de la matriz. Lo que conduce a un aumento del tamaño medio de nanopartícula con el paso del tiempo ($t_1 < t_2 < t_3$).¹⁶⁶

La temperatura y la presencia de oxígeno atmosférico también condicionan la forma y el tamaño de las AuNPs biosintetizadas, así como la velocidad de reacción. Empleando una nueva cepa de actinomiceto *Actinobacter sp.*, Sastry y colaboradores han demostrado que es posible controlar la morfología y el tamaño de las AuNPs.¹⁶⁷ Cuando la bacteria reaccionó con Au (III) en ausencia de O₂ se formaron nanoprismas (AuNPsR) triangulares y hexagonales de 30-50 nm y algunas AuNPs esféricas. Esta reacción fue rápida y se completó en 4 horas. Al bajar la temperatura se ralentizó el proceso y los AuNPsR que se formaron eran más pequeños ~10 nm. Sin embargo, en presencia de oxígeno atmosférico ocurrió algo sorprendente, se formaron AuNPsR triangulares y hexagonales mucho más grandes, de 50-500 nm. Se cree que esto es debido a una reducción mucho más lenta de Au (III), ya que se observó que la proteasa secretada por *Actinobacter sp.* responsable de la reducción rápida de los iones Au (III) se vería inhibida en presencia de O₂.

Todas estas investigaciones sugieren que controlando simples parámetros de reacción, es posible desarrollar una síntesis biológica de AuNPs con morfologías variables. Por ello es necesario profundizar más en estos descubrimientos para alcanzar un mejor control sobre el tamaño y la forma de las AuNPs biogénicas, parámetros claves en las propiedades finales de dichas nanopartículas.

4. Bacterias saludables como biofactorías de AuNPs. Probióticos para aplicaciones biomédicas.

4.1. Probióticos, las bacterias saludables.

En su origen el término "*Probiotika*" fue acuñado por Werner Kollath en 1954, para designar -"sustancias activas que son esenciales para el desarrollo saludable de la vida"-, en contraposición con los antibióticos. Desde 2002 la definición aceptada por la comunidad científica, propuesta por la unión FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*),^{168,169} para los probióticos, es: "microorganismos vivos que

administrados en una cantidad concreta ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador”.

Para algunas especies probióticas su uso terapéutico está probado,¹⁷⁰ no obstante, es más conveniente pensar en el uso de los probióticos con un fin profiláctico o nutricional.¹⁷¹ Así, diversas instituciones sanitarias internacionales están ejerciendo un control cada vez más estricto en aspectos como: la regulación en el etiquetado de alimentos funcionales y suplementos dietéticos comercializados como “probióticos”; las evidencias científicas necesarias para certificar efectos sobre la salud en alimentos que contienen probióticos, y los criterios para evaluar su eficacia y seguridad. Aspectos, hasta hace poco, carentes de un marco legal que permitiese estandarizar los criterios de evaluación de eficacia y seguridad de los probióticos, y proteger los derechos del consumidor.¹⁷² Conceptos como dosis efectiva, seguridad, métodos de evaluación de su efecto saludable, forma de administración, sitio de actuación u órgano diana, son imprescindibles para definir un probiótico concreto.

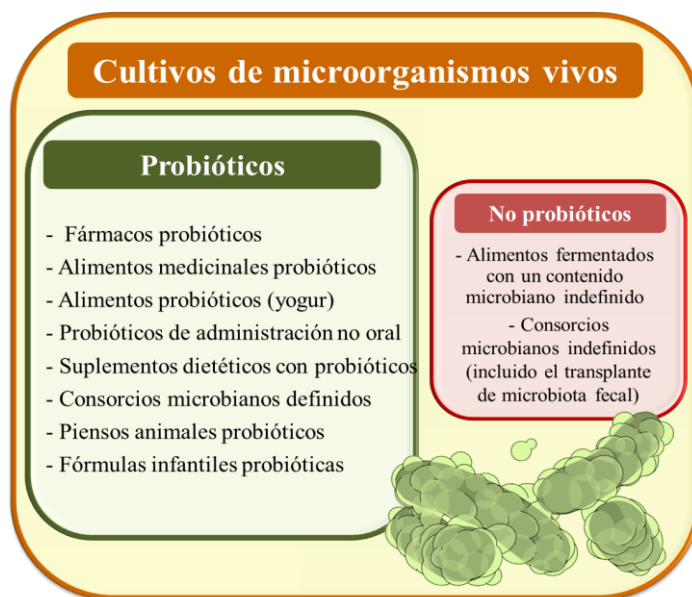


Figura 23. Marco general para productos probióticos. Los microbios muertos, los productos microbianos y los componentes microbianos no entran en la clasificación probiótica.

La Figura 23 resume los diferentes formatos en los que se presentan los probióticos, así como las combinaciones microbianas que no se pueden considerar como tal.

La microflora o microbiota normal humana es el conjunto de microorganismos que habitan las superficies internas y externas de individuos sanos, como son: la piel, la conjuntiva del ojo, las vías respiratorias, y los tractos gastrointestinal y genitourinario. Actuando como una barrera de acceso a las infecciones mediante la producción de moléculas que evitan la invasión de patógenos.¹⁷³ En este sentido, los probióticos pueden emplearse para regular y restaurar la microbiota bacteriana normal, fortaleciendo este escudo microbiano natural.¹⁷⁴

Aunque parecía una condición necesaria para los probióticos que su procedencia y origen fuera humano, ciertas especies cuyo origen no es ninguna de las mucosas corporales, tienen reconocidos ciertos efectos beneficiosos en la salud del hospedador al ser administrados en una dosis concreta. Tal es el caso de *Bifidobacterium lactis*, cuyos efectos antipatogénicos, de mejora inmune y capacidad para colonizar el intestino, están probadas.¹⁷⁵ Este último efecto pone de manifiesto la estrecha relación entre los probióticos y la biota digestiva humana o microflora gastrointestinal. De hecho, las cepas pertenecientes a las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que son los grupos predominante y subdominante de la microbiota digestiva respectivamente,¹⁷⁶ son las bacterias probióticas más ampliamente usadas y las más incorporadas a alimentos y suplementos dietéticos.^{177, 178, 179}

Los probióticos pueden modificar procesos fisiológicos y metabólicos, controlados normalmente por la microbiota natural, provocando numerosos y variados efectos saludables como son: maduración del sistema inmune, actuar de barrera intestinal, influir en el metabolismo de células epiteliales del intestino al modificar las condiciones del lumen, unión y degradación de potenciales carcinógenos, alteración enzimática

de ácidos biliares y exclusión competitiva de especies patógenas.¹⁸⁰ Del conjunto de efectos beneficiosos que pueden ejercer los probióticos, algunos son muy habituales, otros menos frecuentes y algunos muy raros y poco frecuentes, como recoge la Figura 24. Es importante destacar que los efectos favorables suelen ser específicos de cada cepa probiótica. Así es, que los efectos saludables de una cepa concreta no son necesariamente aplicables a otra cepa, incluso dentro de la misma especie.¹⁸¹

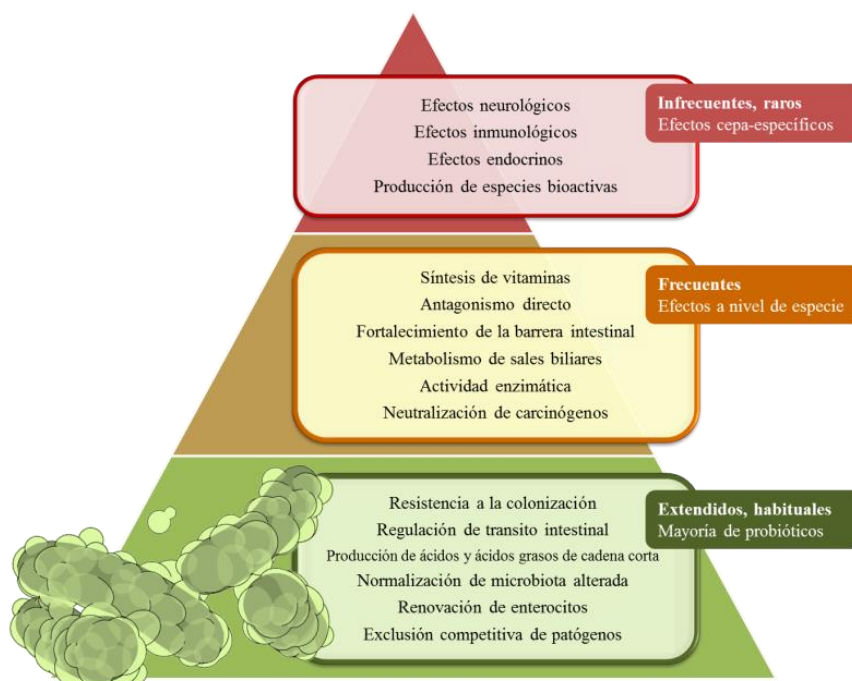


Figura 24. Efectos saludables de los probióticos.

Como muestra la Figura 25, los mecanismos de acción de los probióticos, mediante los cuales ejercen sus beneficiosos efectos sobre la salud del hospedador, podrían resumirse en:¹⁸²

1. **Mejora de la barrera epitelial intestinal:** Los probióticos pueden mejorar las uniones ocluyentes entre los enterocitos del epitelio intestinal,¹⁸³ reparar la barrera intestinal tras sufrir un daño,^{184,}¹⁸⁵ y favorecer la secreción de mucinas del enterocito.^{186, 187}

2. Aumento de la adhesión a la mucosa intestinal: Lo que proporciona defensa frente a la invasión de patógenos^{188, 189, 190} y mejora la efectividad de la respuesta inmune modulada por los probióticos
3. Exclusión competitiva de patógenos:¹⁹¹ Los probióticos pueden reducir el crecimiento y/o excluir competitivamente patógenos, creando microambientes hostiles, captando y secuestrando nutrientes esenciales,¹⁹² y bloqueando de los sitios de unión de los patógenos.
4. Producción de sustancias antibacterianas y antifúngicas: Muchas cepas probióticas producen bacteriocinas (>1000 Da), moléculas de bajo peso molecular (<1000 Da) con actividad antimicrobiana, como ácidos acético y láctico,^{193,194,195,196,197,198} así como agentes anticarcinogénicos.^{199, 200}
5. Modulación de la inmunidad innata: Las bacterias probióticas pueden actuar como inmunomoduladores por medio de su interacción con células epiteliales intestinales y células dendríticas principalmente. Aunque pueden llegar a interactuar con monocitos/macrófagos y linfocitos.²⁰¹

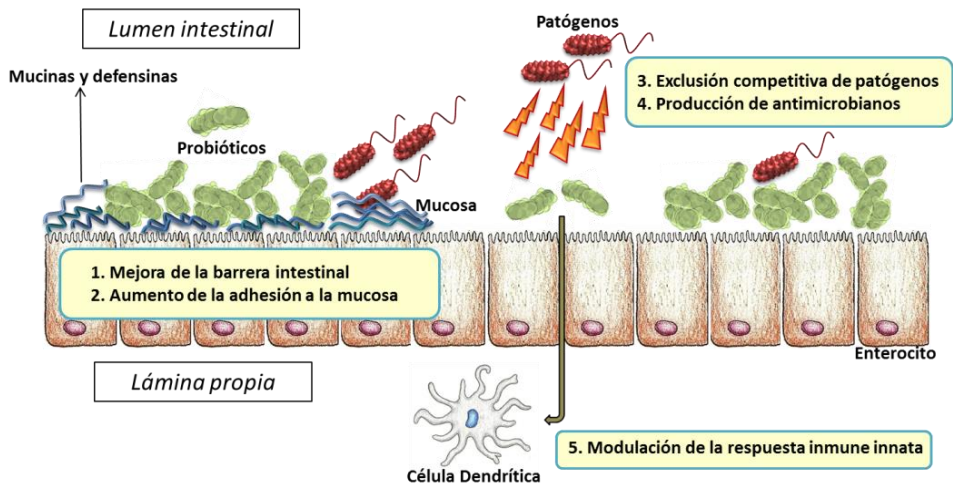


Figura 25. Mecanismos de acción de los probióticos.

4.1.1. *Lactobacillus*, los probióticos por excelencia.

El género bacteriano *Lactobacillus* es un conocido grupo de probióticos formado por un conjunto de bacterias Gram-positivas, los lactobacilos presentan formas bacilares entre 2 y 5 μm de longitud (Figura 26) y la mayoría de sus miembros son anaerobios facultativos.²⁰² Lo que significa que aunque son anaerobios, sobreviven en presencia de O_2 , a pesar de que no presentan cadena de transporte electrónico. En los organismos aerobios, la superóxido dismutasa (SOD) es la enzima encargada de proteger de la toxicidad del oxígeno. Esto lo lleva a cabo eliminando las especies reactivas de oxígeno tóxicas (ROS, *reactive oxygen species*) que se generan en presencia de O_2 , principalmente ión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).²⁰³ Sin embargo, en las especies de lactobacilos que carecen de SOD, como por ejemplo *Lactobacillus plantarum*, la aerotolerancia se consigue mediante iones Mn (II) libres que suplen la función de la enzima antioxidante SOD y eliminan $\cdot\text{O}_2^-$.²⁰⁴

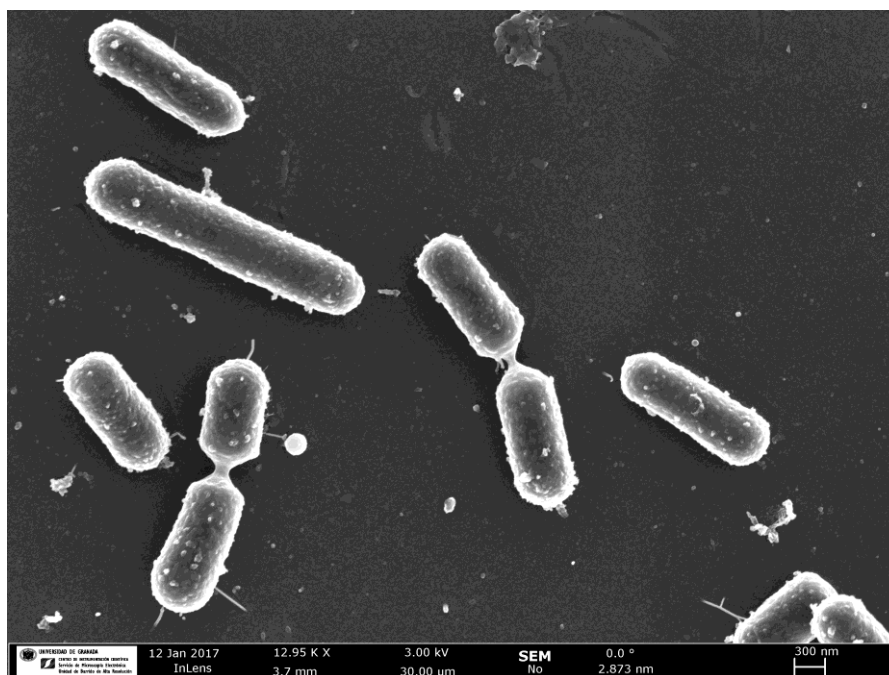


Figura 26. Imagen HRSEM (*High-Resolution Scanning Electron Microscopy*) de *Lactobacillus fermentum* CECT5716.

Junto con algunas especies de la familia *Streptococcaceae* forman el grupo denominado bacterias ácido lácticas (LAB, *lactic acid bacteria*).⁶⁹ Las LAB son capaces de transformar azúcares (principalmente monómeros y dímeros) en ácido láctico mediante un proceso de fermentación láctica.²⁰⁵ El género *Lactobacillus* tiene, por tanto, un papel importantísimo en la industria alimentaria por su participación en la producción de alimentos fermentados, principalmente alimentos derivados de la leche como yogur y queso.²⁰⁶

Muchas especies de lactobacilos son conocidos probióticos por los efectos beneficiosos que ejercen sobre la salud humana y animal; como potenciadores del sistema inmune, por su actividad antimicrobiana,²⁰⁷ o por mejorar la absorción de nutrientes y micronutrientes.²⁰⁸ Es lógica la relación tan íntima con la salud humana ya que son el género bacteriano mayoritario formando parte de las mucosas digestiva y vaginal,^{209, 210} y su presencia en la leche de madres lactantes ha quedado fehacientemente demostrada.²¹¹ Otro efecto probiótico de los *Lactobacillus* se debe a que no son dependientes de hierro.²¹² Para la mayoría de bacterias enteropatógenas el hierro es un elemento esencial. De modo que, en tejidos en los que el hierro es limitado, los *Lactobacillus* ganarían la batalla de la colonización, ya que pueden secuestrar el metal y evitar así que aniden y proliferen en este ambiente microorganismos patógenos hierro-dependientes.²¹³

4.2. *Lactobacillus*, los probióticos productores de AuNPs.

La capacidad de este género bacteriano para la producción de nanopartículas de Au y Ag ha sido estudiada. Así, Nair y Pradeep mostraron que diferentes cepas de *Lactobacillus*, en cuyo hábitat natural no es habitual encontrar iones metálicos a altas concentraciones, biosintetizaron nanopartículas de oro, de plata y de una aleación oro-plata.²¹⁴ Las cepas bacterianas se extrajeron de suero de leche de vaca y, tras 72 h en contacto con los iones Au (III) y/o Ag (II), las nanopartículas que formaron estaban bien definidas y presentaron una morfología facetada (Figura 27).

De especies de la familia *Lactobacillaceae* se han aislados compuestos para llevar a cabo una síntesis ecológica de AuNPs. Recientemente los exopolisacáridos (EPS) excretados por *Lactobacillus plantarum*, y que forman parte de su biofilm, han sido empleados para producir Au-NP.²¹⁵ Aunque inicialmente se pensó que el poder reductor de los carbohidratos no sería suficiente para transformar los iones Au(III) en AuNPs, se demostró que los EPS de *L.plantarum* actúan como un agente protector de las AuNPs reduciendo las interacciones superficie-superficie de las mismas. Además, que la presencia de grupos hidroxilo y el hemiacetal final (ambos grupos reductores) de los carbohidratos podrían conducir la reducción y la estabilización de las AuNPs. Finalmente dichas AuNPs se funcionalizaron con antibióticos para usarse en el tratamiento de infecciones bacterianas con resistencia a fármacos.

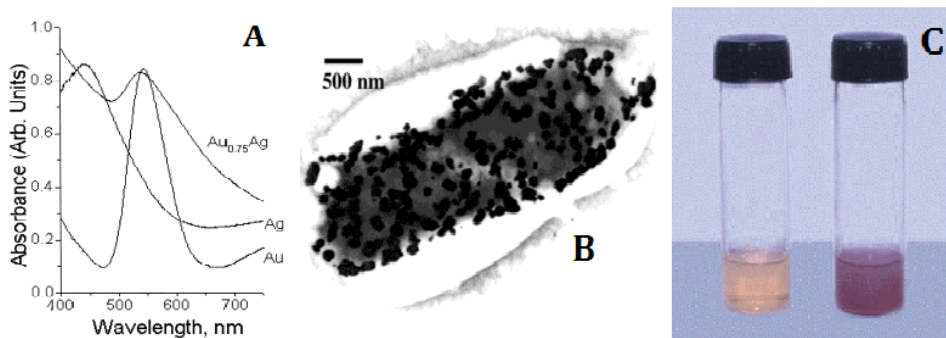


Figura 27. (A) Espectros de absorbancia UV-vis de las nanopartículas de Au, de Ag y de la aleación Au-Ag formadas por *Lactobacillus*. Las nanopartículas de Ag puras presentan una banda SPR a 449nm y las de Au a 547nm, mientras que la banda para las de Au-Ag se sitúa en una posición intermedia. Lo cual hace pensar que se trate de nanopartículas de una aleación de los dos metales y no nanopartículas tipo núcleo-cáscara o “core-shell”. En el último caso cabría esperar un pico coincidente con una de las bandas de los metales puros, correspondiente al metal que forma la cáscara de las Au-AgNPs. **(B)** Micrografía de TEM de los nanocristales de la aleación Au-Ag depositados en la superficie de *Lactobacillus*. **(C)** Imagen del cultivo bacteriano al poco de añadirle HAuCl_4 (izquierda), y tras 12h desde la adición (derecha).⁸¹

5. El biofilm bacteriano, composición y función

Las bacterias son organismos unicelulares autosuficientes que pueden crecer, dividirse, detectar y adaptarse a los cambios en el ambiente de forma individual. Sin embargo, tienden naturalmente a aunar fuerzas con su congéneres para desarrollar actividades cooperativas.^{216, 217, 218} En la naturaleza las bacterias optan por formar colonias o comunidades con más frecuencia que vivir de forma aislada. El desarrollo del biofilm bacteriano es uno de los procesos más comunes en los que las bacterias actúan de manera coordinada y cooperativa.

Los biofilms son comunidades de microorganismos que crecen unidos a una superficie o interfase y que están embebidos en una matriz extracelular producida por ellos mismos.²¹⁹ En el interior del biofilm las bacterias se protegen de diversos factores como estrés ambiental, desecación, depredación por protozoos y agentes antimicrobianos. Durante la formación del biofilm se suceden tres acontecimientos: la adhesión irreversible de la bacteria a una superficie, a esto le sigue la proliferación bacteriana y desarrollo de la matriz extracelular del biofilm, y por último la separación de la bacteria del biofilm y su dispersión (Figura 28).²²⁰

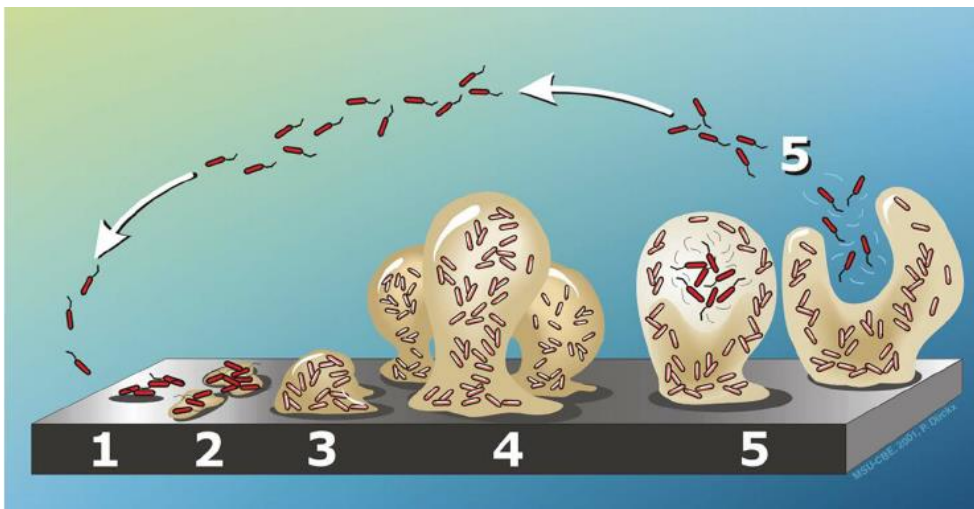


Figura 28. Etapas de la formación del biofilm bacteriano.²²¹

La primera etapa de adherencia a una superficie puede verse favorecida por la presencia de elementos de motilidad en la bacteria, como cilios y flagelos, porque contrarrestan la repulsiones hidrofóbicas, pero estos no son necesarios para que ocurra la adhesión. Algunas proteínas de superficie (AlE, Bap, Esp) están involucradas en esta primera etapa en bacterias grampositivas.^{222, 223} Tras la adhesión comienza la proliferación bacteriana, que junto con la secreción, por parte de la bacteria, de los EPS (“*extracelular polymeric substances*”) que componen la matriz del biofilm, promueven el crecimiento de este. El biofilm crece con una forma de seta (*mushroom*) muy característica. No todas las especies de bacterias secretan los mismos EPS.

5.1. Función del biofilm bacteriano.

La función defensiva del biofilm es clara, protege a las bacterias de la acción de anticuerpos, células fagocíticas y antimicrobianos. Dentro del biofilm las bacterias pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antibióticos que fuera de él. Dicha resistencia es debida a los siguientes factores: los exopolisacáridos que constituyen la matriz del biofilm actúan como una barrera físico-química para la difusión de antimicrobianos; la limitación de nutrientes en el biofilm ralentiza el crecimiento bacteriano y esto disminuye la efectividad del antimicrobiano; el en interior del biofilm se crean microambientes con actividad antagónica a la del antibiótico; y las respuestas a situaciones de estrés pueden suponer un cambio en la fisiología de la bacteria, y con ello un fenotipo de biofilm que contraataque los efectos del antimicrobiano.²²⁴

El biofilm interactúa con el ambiente anclándose a una superficie, y también por sus propiedades de sorción, ya que presenta canales donde es posible el secuestro de partículas y sustancias disueltas en el medio que proveen nutrientes para los microorganismos que lo forman.²²⁵ En definitiva, proporciona un ambiente íntimo en el que las bacterias pueden estar próximas unas a otras, lo cual favorece la comunicación entre ellas. Comunicación que es necesaria para la supervivencia de la colonia, pues les permite conocer la densidad de población y organizarse

colectivamente frente a la presencia de un competidor por el nicho ecológico, la presencia de tóxicos o limitaciones nutricionales.

Por lo tanto, se puede concluir que el biofilm bacteriano es, tanto causa, como consecuencia de la comunicación entre las bacterias. El fenómeno de regulación "*Quorum sensing*" o autoinducción es el que determina el crecimiento y la maduración del biofilm.^{226, 227} Dicho fenómeno se basa en la comunicación célula-célula mediante la liberación-detección de moléculas señales, denominadas autoinductores. El reconocimiento de los mensajeros químicos se ve favorecido, en el interior del biofilm, por la cercanía entre las bacterias. Lo cual regula la expresión génica dependiente de la densidad bacteriana para hacer frente a cualquier estímulo consecuencia de las condiciones ambientales variables.

5.2. Composición del biofilm bacteriano. EPS.

Definido el biofilm como la comunidad bacteriana anclada a una superficie inerte, a un tejido vivo, o comunidades bacterianas floculantes que evolucionan embebidas en la matriz que ellas mismas han generado, hablaremos ahora de su composición.

La composición de esta matriz es diversa y compleja, tanto por lo heterogénea, como por la nomenclatura que utilizan los expertos para definirla. El término "EPS" ha sido empleado para referirse exclusivamente a los exopolisacáridos o polisacáridos extracelulares, en inglés "*exopolysaccharides*" o "*extracellular polysaccharides*", ya que durante mucho tiempo se han considerado el componente mayoritario de la matriz del biofilm.²²⁸ Sin embargo otras biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, y moléculas anfifílicas, como (fosfo)-lípidos, han demostrado estar presentes en cantidades considerables e incluso predominantes en biofilms de fangos activos, biofilms de alcantarillado, biofilms de filtros de goteo, y en cultivos de bacterias tradicionales en laboratorio. También se han descrito sustancias húmicas como componentes de la matriz de biofilms de suelos y aguas.^{229, 230, 231} Es por

esto que un concepto más amplio, como el de “sustancias poliméricas extracelulares” parece más apropiado al referirse al término “EPS” (“*extracellular polymeric substances*”). Cabe aclarar que, aunque en la introducción de esta tesis, el concepto “EPS” se referirá a “sustancias poliméricas extracelulares”. En otros capítulos de la misma, lo emplearemos para referirnos sólo a los exopolisacáridos o polisacáridos extracelulares de las bacterias probióticas estudiadas, ya que son el componente mayoritario de su biofilm.

Metafóricamente el biofilm sería “el edificio de las bacterias” y los EPS “el apartamento de cada bacteria del biofilm”.²³² Los EPS son biopolímeros de origen microbiano que determinan las condiciones de vida como porosidad, densidad, contenido en agua, carga, propiedades del sorción, hidrofobicidad y estabilidad mecánica del biofilm.²³³

La composición del biofilm varía de unas especies a otras, incluso en la misma especie cambia en función de las condiciones ambientales. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* la matriz del biofilm se compone de alginato, de celulosa en *Salmonella typhimurium*, y en el caso de *Vibrio cholerae* es un polisacárido rico en glucosa y galactosa. Además las condiciones ambientales determinan también la composición de EPS de la matriz del biofilm. El componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede llegar a representar el 97% de su composición. Al agua y las bacterias, los acompañan un complejo entramado de exopolisacáridos, proteínas, glicoproteínas, glucolípidos, y en algunos casos sorprendentes cantidades de ADN extracelular (e-DNA),²³⁴ además de diversos productos procedentes de lisis celular.

Hacer una caracterización de la composición y la estructura del biofilm es un reto difícil de conseguir actualmente. Desde la purificación de los EPS que constituyen la matriz del biofilm de otros elementos como bacterias o sustancias unidas transitoriamente a los EPS, hasta la identificación de los exopolisacáridos que lo forman suponen problemas analíticos muy difíciles de resolver.²³⁵ El aislamiento y la caracterización

química de la fracción de hidratos de carbono del biofilm son complejos debido a la diversidad de monómeros de azúcares, las uniones entre ellos, y la existencia de estructuras únicas formando parte de la matriz de biofilms. Todo esto sumado, a que en la naturaleza la composición de los EPS del biofilm es dinámica y puede seguir patrones cíclicos temporales.

La técnica más empleada para la identificación y caracterización de los exopolisacáridos presentes en los EPS es el marcaje con lectinas funcionalizadas con fluoróforos y su seguimiento por microscopía confocal y microscopía Raman.²³⁶ El uso de la microscopía láser confocal de barrido (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*) en combinación con diferentes protocolos de tinción permite la visualización y cuantificación de la estructura del biofilm. Introducir, por ejemplo, lectinas funcionalizadas hace posible la detección de glicoconjugados, in situ, en el biofilm. Por otro lado, la aplicación de la microscopía Raman (RM) proporciona información más detallada sobre la composición química de la matriz de biofilm y mejorar el conocimiento sobre la estructura de los EPS. En esta técnica no se requiere tinción, por lo tanto, se pueden obtener información incluso de estructuras que no son susceptibles a las técnicas de tinción conocidas, pues no interaccionan con el tinte. Por lo tanto, la preparación de la muestra es sencilla y rápida, lo que reduce el riesgo de alterar el biofilm y la creación de artefactos. Otra ventaja que presenta la microscopía Raman es la posibilidad de medir directamente en fase acuosa, ya que puede revelar información sobre el biofilm en su estado nativo con una resolución espacial en el rango de μm . Aunque los espectros Raman de la matriz de biofilm, que proporciona esta técnica, son superposiciones complejas de huellas dactilares de diferentes polímeros, es posible identificar cambios en la estructura y la química del biofilm.

Algunos componentes EPS han generado especial interés, como el Alginato, un polisacárido polianiónico producido por *Pseudomonas aeruginosa*, con interés biotecnológico por su capacidad gelificante al captar iones bivalentes. La celulosa es otro polisacárido presente en

algunos biofilm que ha atraídos las miradas. El fortalecimiento del biofilm es crucial para el mantenimiento de su estructura y la conservación de la cercanía entre las bacterias que lo habitan, lo cual favorece la sinergia entre ellas. El material de naturaleza proteica que forma parte de los EPS del biofilm podría contribuir a las propiedades mecánicas del mismo.²³⁷

La funcionalidad de los componentes EPS del biofilm se resumen en la Tabla 1.²³⁸

TABLA 1. Funcionalidad de los EPS del biofilm		
Efecto del EPS	Naturaleza del EPS	Rol en el biofilm
Constructivo	Polisacáridos neutros Péptidos amiloides	Componente estructural Componente estructural
Sorción	Polisacáridos cargados o hidrofóbicos	Intercambio iónico, sorción
Activación	Enzimas extracelulares	Degradación de polímeros
Activación a nivel de superficie	Anfifílicos Vesículas de membrana	Interacciones en interfaces Exportar sustancias desde las células Sorción
Transmisión de información	Lectinas Ácidos nucleicos	Especificidad, reconocimiento Información genética, estructural
Actividad Redox	Polímeros refractarios bacterianos	¿ Donadores o aceptores de electrones ?
Nutritivo	Diversos polímeros	Fuentes de C, N y P

Tabla 1. Componentes del biofilm bacteriano y su rol en él.

El biofilm es un sistema dinámico en el que los componentes interactúan unos con otros, creando un ambiente activo, donde los EPS parecen ser algo más que un simple adhesivo. La presencia de vesículas de membrana en las profundidades del biofilm es una muestra más de

esta activación.²³⁹ Las vesículas pueden contener enzimas y material genético, y liberar su contenido generando microambientes dentro del biofilm, degradando determinados EPS, o actuando como transportadores de genes para favorecer la conjugación bacteriana. También pueden participar en procesos de señalización celular y defensa. La cohesión en la estructura macromolecular en panal del biofilm se alcanza tanto por interacciones hidrofóbicas, cross-linking mediado por cationes multivalentes y por entrecruzamiento de los EPS.^{183, 240}

6. Objetivos.

Las bacterias probióticas pueden servir como plataformas para la deposición de nanopartículas de maghemita y de oro en sus exopolisacáridos (EPS), adquiriendo por tanto propiedades magnéticas y ópticas de una forma artificial. El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido estudiar las posibilidades de estos sistemas en aplicaciones biomédicas.

La singularidad de estos sistemas radica en el hecho conocido que los probióticos son organismos capaces de superar el ambiente químico del estómago, alcanzar y anidar en los intestinos, dónde se originan enfermedades de gran impacto social como la anemia o el cáncer de colon. Por tanto, cabe pensar que estos probióticos podrían ser utilizados como “*carriers*” ideales para transportar al intestino materiales con tanta potencialidad para el diagnóstico y la terapia como las nanopartículas de maghemita y de oro.

En este sentido, los objetivos específicos que nos hemos planteado han sido:

1. Desarrollar un nuevo suplemento de hierro para anemia basado en *Lactobacillus fermentum* con nanopartículas de maghemita, que suponga una alternativa y ofrezca alguna ventaja a los suplementos de hierro actualmente disponibles en el mercado, cuya baja absorción y efectos secundarios dañinos, tras un uso prolongado, están demostrados.

2. Preparar sistemas magneto-ópticos basados en *Lactobacillus fermentum* que contengan simultáneamente nanopartículas magnéticas y nanopartículas

de oro. Para ello nos basamos en los resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación en cuanto a la creación del primer imán vivo sintético del mundo, generado a partir de la incorporación de nanopartículas magnéticas sobre la superficie de *L. fermentum*.

3. Estudiar el potencial de estas bacterias magneto-ópticas como agentes en hipertermia magnética y/u óptica. Esto implica, por un lado, la medición del calor que generan una vez sometidas a campos magnéticos alternos (hipertermia magnética) o a irradiación lumínica (hipertermia óptica) y por otro lado, su capacidad de penetrar al interior de células del tejido intestinal.

Extender la metodología desarrollada con *Lactobacillus fermentum* para la obtención de otras bacterias probióticas magnéticas y/u ópticas. En particular, nos hemos planteado una familia de probióticos muy genuina, como son las bacterias ácido lácticas que, mediante fermentación de la leche, dan lugar al yogur. Hemos pretendido desarrollar un nuevo tipo de alimento fermentado, lo que hemos denominado yogur magnético y yogur dorado.

7. Referencias.

¹ Liu K, Yao X, Liang L. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3240.

² Drexler KE. *Engines of creation: the coming era of nanotechnology.* Anchor Books, New York, USA **1986**.

³ Nassif N, Roux C, Coradin T, Bouvet OMM, Livage J. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2264.

⁴ Tian L, Yam L, Wang J, Tat H, Uhrich KE. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2317.

⁵ Sánchez C, Arribart H, Guille MM. *Nat. Mater.* **2005**, 4, 277.

⁶ Bansal V, Bharde A, Ramanathan R, Bhargava SK. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, 179-182, 150.

⁷ Kröger N, Deutzmann R, Sumper M. *Science.* **1999**, 286, 1129.

⁸ Parkinson J, Gordon R. *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 190.

⁹ Hosea M, Greene B, McPherson R, Henzl M, Dale Alexander M, Darnall DW. *Inorg. Chim. Acta.* **1986**, 123, 161.

¹⁰ Lowenstam H. *Science.* **1981**, 211, 1126.

- ¹¹ Cao YC, Jin R, Mirkin CA. *Science*. **2002**, 297, 1536.
- ¹² Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1517.
- ¹³ Bansal V, O'Mullane AP, Bhargava SK. *Electrochem. Commun.* **2009**,11,1639.
- ¹⁴ Schmid G, Corain B. *Eur J. Inorg. Chem.* **2003**,2003,3081.
- ¹⁵ Sawant PD, Sabri YM, Ippolito SJ, Bansal V, Bhargava SK. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**,11,2374.
- ¹⁶ Ahmed S, Ikram S. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **2016**, 161, 141.
- ¹⁷ Dujardin E, Mann S. *Adv. Mater.* **2002**, 14, No 11.
- ¹⁸ Hayden C. S. et al *JACS*. **2012**, 134, 6920.
- ¹⁹ Reith F, Rogers SL, McPhail DC, Webb D. *Science* **2006**, 313, 233.
- ²⁰ Park JT, Lee SY, Heo NS, Seo TS. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7019.
- ²¹ Martín M, Carmona F, Cuesta R, Rondón D, Gálvez N, Dominguez-Vera JM. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24, 3489.
- ²² Gadd GM. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, 100, 197.
- ²³ Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. *Ecotoxicol Environ Saf* **2000**, 45, 198.
- ²⁴ Bansal V, Ramanathan R, Bhargava SK. *Aust. J. Chem.* **2011**, 64, 279.
- ²⁵ Parikh R Y et al. *PLoS One*. **2011**, 6, e21401.
- ²⁶ Parikh RY et al. *ChemBioChem*. **2008**, 9, 1415.
- ²⁷ Ramanathan R, Campbell JL, Soni SK, Bhargava SK, Bansal V. *PLoS One*. **2011**, 6.
- ²⁸ Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. (Nanobiotechnology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005). doi:10.1002/3527602453.
- ²⁹ Ramanathan R et al. *Langmuir*. **2011**, 27, 714.
- ³⁰ Rai M, Porten C, editors. Green Biosynthesis of Naportacles . CABI, Boston, USA **2013**.
- ³¹ Nalwa HS. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, 10, 2421.
- ³² Schmid G. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1709.
- ³³ Daniel MC, Astruc D. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 104, 293.
- ³⁴ Nikoobakht B, El-Sayed MA. *Chem. Mater.* **2003**, 15, 1957.
- ³⁵ Pelaz B, Grazu V, Ibarra A, Magen C, del Pino P, de la Fuente JM. *Langmuir*. **2012**, 28, 8965.
- ³⁶ Crespo P, Litrán R, Rojas TC, Multigner M, de la Fuente JM, Sánchez-López JC, García MA, Hernando A, Penadés S, Fernández A. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93, 087204-1.
- ³⁷ Dykmana L, Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2256.
- ³⁸ Li N, Zhao P, Astruc D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 1756.

- ³⁹ Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2739.
- ⁴⁰ Jans H, Huo Q. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2849.
- ⁴¹ Dykman L, Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2256.
- ⁴² Reguera J, Langer J, Jimenez de Aberasturi D, Liz-Marzan LM. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 3866.
- ⁴³ Ghosh SK, Pal T. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4797.
- ⁴⁴ Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 7238.
- ⁴⁵ Dykmana L, Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2256.
- ⁴⁶ Yang X, Stein EW, Ashkenazi S, Wang LV. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, 1, 360.
- ⁴⁷ York J, Spetzler D, Hornung T, Ishmukhametov R, Martin J, Frasch WD, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, 39, 435.
- ⁴⁸ Curry AC, Crow M, Wax A, *J. Biomed. Opt.* **2008**, 13, 014022.
- ⁴⁹ Bickford L, Chang J, Fu K, Sun J, Hu Y, Gobin A, Yu TK, Drezek R, *Nanobiotechnology.* **2008**, 4, 1.
- ⁵⁰ Oldenburg AL, Hansen MN, Ralston TS, Wei A, Boppart SA. *J. Mater.Chem.* **2009**, 19, 6407.
- ⁵¹ Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 2826.
- ⁵² Kim EY, Kumar D, Khanga G, Lim DK. *Mater. Chem. B.* **2015**, 3, 8433.
- ⁵³ Xu X, Li H, Hasan D, Ruoff RS, Wang AX, Fan DL, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23, 4332.
- ⁵⁴ Li K, Stockman MI, Bergman DJ. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 227402.
- ⁵⁵ Alvarez-Puebla RA, Agarwal A, Manna P, Khanal BP, Aldeanueva-Potel P, Carbó-Argibay E, Pazos-Pérez N, Vigderman L, Zubarev ER, Kotov NA, Liz-Marzán LM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2011**, 108, 8157.
- ⁵⁶ Pazos-Perez N, Wagner CS, Romo-Herrera JM, Liz-Marzán LM, García de Abajo FJ, Wittemann A, Fery A, Alvarez-Puebla RA. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 12688.
- ⁵⁷ Xu J, Zhang L, Gong H, Homola J, Yu Q. *Small.* **2011**, 7, 371.
- ⁵⁸ Barbosa S, Agrawal A, Rodríguez-Lorenzo L, Pastoriza-Santos I, Alvarez-Puebla RA, Kornowski A, Weller H, Liz-Marzán LM. *Langmuir.* **2010**, 26, 14943.
- ⁵⁹ Takahashi H, Niidome T, Nariai Y, Yamada S. *Nanotechnology.* **2006**, 17, 4431.
- ⁶⁰ Takahashi H, Niidome T, Nariai Y, Yamada S. *Chem. Lett.* **2006**, 35, 500.

- ⁶¹ van der Zee J. *Ann. Oncol.* **2008**, 13, 1173.
- ⁶² Jordan A, Scholz R, Wust P, Schirra H, Schiestel T, Schmidt, Felix R. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 194, 185.
- ⁶³ Overgaard K, Overgaard J. *Eur. J. Cancer.* **1972**, 8,65.
- ⁶⁴ Fernandez-Cabada T, Sánchez-Lopez de Pablo C, Martínez-Serrano A, del Pozo-Guerrero F, Serrano-Olmedo JJ, Ramos-Gómez M. *Int. J. Nanomedicine.* **2012**, 7, 1511.
- ⁶⁵ Svaasand LO, Gomer CJ, Morinelli E. *Lasers Med. Sci.* **1990**, 5, 121.
- ⁶⁶ Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Felix R. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 201, 413.
- ⁶⁷ Kuo WS, Chang CN, Chang YT, Yang MH, Chien YH, Chen SJ, Yeh CS. *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2771.
- ⁶⁸ El-Sayed MA. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 257.
- ⁶⁹ Oyelere AK, Chen PC, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18(5), 1490.
- ⁷⁰ Norman RS, Stone JW, Gole A, Murphy CJ, Sabo-Attwood TL. *Nano. Lett.* **2008**, 8(1), 302.
- ⁷¹ Pissuwan D, Valenzuela SM, Miller CM, Cortie MB. *Nano. Lett.* **2007**, 7(12), 3808.
- ⁷² Luchini A, Heenan RK, Paduanoab L, Vitiello G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 18441.
- ⁷³ Valero E, Tambalo S, Marzola P, Ortega-Muñoz M, López-Jaramillo FJ, Santoyo-González F, de Dios López J, Delgado JJ, Calvino JJ, Cuesta R, Domínguez-Vera JM, Gálvez N. *J Am Chem Soc.* **2011**, 133(13), 4889.
- ⁷⁴ Valero E, Fiorini S, Tambalo S, Busquier H, Callejas-Fernández J, Marzola P, Gálvez N, Domínguez-Vera JM. *J Med Chem.* **2014**, 57(13), 5686.
- ⁷⁵ Bohara RA, Thoratb ND, Pawar SH. *RSC Adv.* 2016, 6, 43989.
- ⁷⁶ Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. *Bioconjug Chem.* **2005**, 16(5), 1181.
- ⁷⁷ Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 293, 483.
- ⁷⁸ Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. *Chem Rev.* **2008**, 108(6), 2064.
- ⁷⁹ Sun C, Lee JS, Zhang M. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, 60(11), 1252.
- ⁸⁰ Cole AJ, Yang VC, David AE. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29(7), 323.

- ⁸¹ Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, 16, 023501.
- ⁸² Tran N, Webster TJ. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 8760.
- ⁸³ Na HB, Song IC, Hyeon T. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 2133.
- ⁸⁴ Quiao R, Yang C, Gao M. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 6274.
- ⁸⁵ Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, 58, 1471.
- ⁸⁶ Wang J, Zhanga B, Wang L, Wang M, Gao F. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2015**, 48, 416.
- ⁸⁷ Zeng J, Jing L, Hou Y, Jiao M, Qiao R, Jia Q, Liu C, Fang F, Lei H, Gao M. *Adv. Mater.* **2014**, 26, 2694.
- ⁸⁸ Lu Y, Xu YJ, Zhang G, Ling D, Wang M, Zhou, Y, Wu YD, Wu T, Hackett MJ, Hyo Kim B, Chang H, Kim J, Hu XT, Dong L, Lee N, Li F, He JC, Zhang L, Wen HQ, Yang B, Hong Choi S, Hyeon T, Zou DH. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, 1, 637.
- ⁸⁹ Lee N, Hyeon T. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2575.
- ⁹⁰ Taboada E, Rodríguez E, Roig A, Oró J, Roch A, Muller RN. *Langmuir.* **2007**, 23, 4583.
- ⁹¹ Xiao W, Legros P, Chevallier P, Lagueux J, Kwon Oh J, Fortin MA. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**.
- ⁹² Chen R, Ling D, Zhao L, Wang S, Liu Y, Bai R, Baik S, Zhao Y, Chen C, Hyeon T. *ACS Nano.* **2015**, 9, 12425.
- ⁹³ Ferrari M. et al. Magnetic nanoparticles for MR imaging, In *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, Springer, **2006**, pp. 227–237
- ⁹⁴ Weissleder, R. et al. *Radiology.* **1990**, 175, 489.
- ⁹⁵ Parikh RY et al. *PLoS One.* **2011**, 6, e21401.
- ⁹⁶ Maenosono S, Saita S. *IEEE Trans. Magn.* **2006**, 42, 1638.
- ⁹⁷ Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2161.
- ⁹⁸ Moroz P, Jones SK, Gray BN. *J. Surg. Oncol.* **2001**, 77, 259.
- ⁹⁹ Hayashi K, Nakamura M, Sakamoto W, Yogo T, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Ishimura K. *Theranostics.* **2013**, 3(6), 366.
- ¹⁰⁰ Rosensweig RE. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, 252, 370.
- ¹⁰¹ Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. *Radiology.* **1990**, 175, 489.

- ¹⁰² WHO, Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland **2017**.
- ¹⁰³ Kassebaum NJ, *Hematol Oncol Clin North Am.* **2016**, 30(2), 247.
- ¹⁰⁴ FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. The state of food security and nutrition in the world 2017. Building resilience for peace and food security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; **2017**:1–109 (<http://www.fao.org/3/a-I7695e.pdf>, accessed 1 November 2017).
- ¹⁰⁵ Benoist B, McLean E, Egli I, et al. Worldwide Prevalence of Anaemia 1993-2005. World Health Organization, Geneva, Switzerland **2008**.
- ¹⁰⁶ Killip S, Bennett JM, Chambers MD. *Am. Fam. Physician.* **2007**, 75(5), 671.
- ¹⁰⁷ Bothwell TH. *Am J Clin Nutr.* **2000**; 72, 257S.
- ¹⁰⁸ Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD, editors. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. The National Academies Press, Washington DC, USA **2006**.
- ¹⁰⁹ Chaparro CM. *J. Nutr.* **2008**, 138(12), 2529.
- ¹¹⁰ Paulman P. Iron Deficiency. In Bope E, Kellerman R, editors. Conn's Current Therapy. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA **2010**.
- ¹¹¹ Assessing the iron status of populations. 2th edition including literature reviews. Report of a Joint WHO/Centers for Disease Control and Prevention technical consultation on the assessment of iron status at the population level, Geneva, Switzerland, 6–8 April 2004. World Health Organization, Geneva, Switzerland **2007**.
- ¹¹² Alleyne M, Horne MK, Miller JL. *Am J Med.* **2008**, 121(11), 943.
- ¹¹³ Arcara K, Tschudy M. In Hopkins J, editor. The Harriet Lane Handbook, 19th edition. Elsevier Mosby, **2011**.
- ¹¹⁴ Morgan EH, Oates PS, *Blood Cells Mol. Dis.* **2002**, 29, 384.
- ¹¹⁵ Silverstein SB, Rodgers GM. *Am. J. Hematol.* **2004**, 76, 74.
- ¹¹⁶ Provenzano R, Schiller B, Rao M, Coyne D, Brenner L, Pereira BJ. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, 4(2), 386.
- ¹¹⁷ Chen B, Li Y, Zhang X, Liu F, Liu YI, Ji M, Xiong F, Gu N. *Mater. Lett.* **2016**, 170, 93.
- ¹¹⁸ Singh A, Patel T, Hertel J, Bernardo M, Kausz A, Brenner L. *Am. J. Kidney Dis.* **2008**, 52(5), 907.
- ¹¹⁹ Pantidos N, Horsfall LE. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, 5, 5.
- ¹²⁰ Schüler D. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 654.
- ¹²¹ Blakemore R. *Science.* **1975**, 190, 377.

- ¹²² Lefèvre CT, Abreu F, Lins U, Bazylinski DA, in Metal Nanoparticles in Microbiology. Mahendra R, Nelson D, editors. **2011**, doi:10.1007/978-3-642-18312-6, ch 4.
- ¹²³ Jogler C, Schuler D, Schüler D. *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, 63, 501.
- ¹²⁴ Bazylinski DA, Schübbe S. *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, 62, 21.
- ¹²⁵ Draper O, et al. *Mol. Microbiol.* **2011**, 82, 342.
- ¹²⁶ Katzmann E, Scheffel A, Gruska M, Plitzko JM, Schüler D. *Mol. Microbiol.* **2010**, 77, 208.
- ¹²⁷ Scheffel A, et al. *Nature.* **2006**, 440, 110.
- ¹²⁸ Franks AE, Malvankar N, Nevin KP. (2010). at <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4155/bfs.10.25?journalCode=bfu20>>
- ¹²⁹ Faivre D, Böttger LH, Matzanke BF, Schüler D. *Angew. Chemie.* **2007**, 119, 8647.
- ¹³⁰ Taoka A, Umeyama C, Fukumori Y. *Curr. Microbiol.* **2009**, 58, 177.
- ¹³¹ Sandy M, Butler A. *October.* **2009**, 109, 4580.
- ¹³² Bazylinski DA, Garratt-Reed AJ, Frankel RB. *Microsc. Res. Tech.* **1994**, 27, 389.
- ¹³³ Schüler D, Frankel RB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 464.
- ¹³⁴ Matsunaga T, Suzuki T, Tanaka M, Arakaki A. *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 182.
- ¹³⁵ Hu XP, Chan AW-S, Zurkiya O. Patent WO 2006119102 A1 20061109, **2006**.
- ¹³⁶ Nishida K, Silver PA. *PLoS Biol.* **2012**, 10, e1001269.
- ¹³⁷ Narayanan KB, Sakthivel N. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, 156, 1.
- ¹³⁸ Yong P, Rowson AN, Farr JPG, Harris IR, Mcaskie LE. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, 55, 593.
- ¹³⁹ Wiley B, Herricks T, Sun Y, Xia Y. *Nano Letters.* **2004**, 4, 1733.
- ¹⁴⁰ Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. *Science.* **2006**, 311, 622.
- ¹⁴¹ Klaus-Joerger T, Joerger R, Olsson E, Granqvist C-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96, 13611.
- ¹⁴² Slawson RM, Van Dyke MI, Lee H, Trevors JT. *Plasmid.* **1992**, 27, 72.
- ¹⁴³ Bansal V, Sanyal A, Rautaray D, Ahmad A, Sastry M. *Adv. Mater.* **2005**, 17, 889.
- ¹⁴⁴ Bansal V, Syed A, Bhargava SK, Ahmad A, Sastry M. *Langmuir.* **2007**, 23, 4993.

- ¹⁴⁵ Mulligan CN, Kamali M. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, 78, 497.
- ¹⁴⁶ Plowman B, Ippolito SJ, Bansal V, Sabri YM, O'Mullane AP, Bhargava SK. *Chem. Commun.* 2009, 5039.
- ¹⁴⁷ Bansal V, Li V, O'Mullane AP, Bhargava SK. *Cryst. Eng. Comm.* **2010**, 12, 4280.
- ¹⁴⁸ Jackson P, Periasamy S, Bansal V, Geso M. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* **2011**, 34, 243.
- ¹⁴⁹ Pearson A, O'Mullane AP, Bansal V, Bhargava SK. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 731.
- ¹⁵⁰ Pearson A, O'Mullane AP, Bansal V, Bhargava SK. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 1705.
- ¹⁵¹ Sabri YM, Ippolito SJ, O'Mullane AP, Tardio J, Bansal V, Bhargava SK. *Nanotechnology.* **2011**, 22, 305501.
- ¹⁵² Sadek AZ, Bansal V, McCulloch DG, Spizzirri PG, Latham K, Lau DWM, et al. *Sens. Actuators B.* **2011**, 160, 1034.
- ¹⁵³ Parikh RY, Singh S, Prasad BLV, Patole MS, Sastry M, Shouche YS. *Chembiochem.* **2008**, 9, 1415.
- ¹⁵⁴ Ramanathan R, O'Mullane AP, Parikh RY, Smooker PM, Bhargava SK, Bansal V. *Langmuir.* **2010**, 27, 714.
- ¹⁵⁵ Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, 6, 257.
- ¹⁵⁶ Bhattacharya D, Gupta RK. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2005**, 25, 199.
- ¹⁵⁷ Beveridge TJ, Murray RG. *J. Bacteriol.* **1980**, 141, 876.
- ¹⁵⁸ Lengke MF, Fleet ME, Southam G. *Langmuir.* **2006**, 22, 2780.
- ¹⁵⁹ Hulkoti NI, Taranath TC. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2014**, 121, 474.
- ¹⁶⁰ Murugan K, Benelli G, Panneerselvam C, Subramaniam J, Jeyalalitha T, Dinesh D et al. *Exp. Parasitol.* **2015**, 153, 129.
- ¹⁶¹ Nangia Y, Wangoo N, Goyal N, Shekhawat G, Suri CR. *Microb. Cell Factories.* **2009**, 8, 39.
- ¹⁶² Kashafi K, Tor JM, Nevin KP, Lovley DR. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 3275.
- ¹⁶³ Bharde A, Kulkarni A, Rao M, Prabhune A, Sastry M. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, 7, 4369.
- ¹⁶⁴ He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N. *Mater. Lett.* **2007**, 61, 3984.
- ¹⁶⁵ He S, Zhang Y, Guo Z, Gu N. *Biotechnol. Progr.* **2008**, 24, 476.

- ¹⁶⁶ Werz T, Baumanna M, Wolfram U, Krill CE. *Mater. Charact.* **2014**, 90, 185.
- ¹⁶⁷ Bharde A, Kulkarni A, Rao M, Prabhune A, Sastry M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7, 4369.
- ¹⁶⁹ Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. *J. Clin. Gastroenterol.* **2003**, 37, 105.
- ¹⁷⁰ Kopp-Hoolihan L. *J. Am. Diet. Assoc.* **2001**, 101(2), 229.
- ¹⁷¹ Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 73, 430S.
- ¹⁷² Sanz Y, Dalmau J. *Acta Pediatr Esp.* **2008**, 66(1), 27.
- ¹⁷³ Mackowiak PA. *N Engl J Med.* **1982**, 307(2), 83.
- ¹⁷⁴ Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16(2), 204.
- ¹⁷⁵ Sanders ME. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, 40, 776.
- ¹⁷⁶ Guarner F, Malagelada JR. *Lancet.* **2003**, 361, 512.
- ¹⁷⁷ Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. *J. Leukoc. Biol.* **2011**, 89, 685.
- ¹⁷⁸ Macpherson AJ, Harris NL. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, 4, 478.
- ¹⁷⁹ Frick JS, Schenk K, Quitadamo M, et al. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**; 13: 83.
- ¹⁸⁰ Sanders ME. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, 40, 776.
- ¹⁸¹ Williams NT. *Am. J. Health System Pharm.* **2010**, 67, 449.
- ¹⁸² Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, 61, 160.
- ¹⁸³ Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *BMC Microbiol.* **2010**, 10, 316.
- ¹⁸⁴ Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 1140.
- ¹⁸⁵ Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. *Cell Microbiol.* **2007**, 9, 804.
- ¹⁸⁶ Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. *Gut* **2003**, 52, 827.
- ¹⁸⁷ Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. *Pediatr. Surg. Int.* **2002**, 18, 586.
- ¹⁸⁸ Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkio S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E. *Clin Diag Lab Immunol.* **2002**, 9, 184.

- ¹⁸⁹ Haller D, Colbus H, Ganzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP. *Syst Appl Microbiol* **2001**, 24, 218.
- ¹⁹⁰ Van Tassell ML, Miller MJ. *Nutrients*. **2011**, 3, 613.
- ¹⁹¹ Greenberg B. *J. Bacteriol.* **1969**, 99, 629.
- ¹⁹² Rolfe RD. Population dynamics of the intestinal tract. In Blankenship LC, editor. *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*. Academic Press, San Diego, USA **1991**.
- ¹⁹³ Prema P, Smila D, Palavesam A, Immanuel G. *Food Bioprocess Technol.* **2008**, 3, 379.
- ¹⁹⁴ Niku-Paavola ML, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, 86, 29.
- ¹⁹⁵ Sjogren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 7554.
- ¹⁹⁶ Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 2001.
- ¹⁹⁷ De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 259, 89.
- ¹⁹⁸ Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Servin A, De Vuyst L. *Res Microbiol.* **2006**, 157, 241.
- ¹⁹⁹ O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, 152, 189.
- ²⁰⁰ Macouzet M, Lee BH, Robert N. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, 106, 1886.
- ²⁰¹ Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. *Proc. Nutr. Soc* **2010**, 69, 381.
- ²⁰⁴ Archibald FS, Fridovich I. *J. Bacteriol.* **1981**, 146, 928.
- ²⁰⁵ Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica (2ª ed)*, Omega, **1995**.
- ²⁰⁶ Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd. ed. Marcel Dekker, New York, USA **2004**.
- ²⁰⁷ Nielsen DS, Cho GS, Hanak A, Huch M, Franz CM, Arneborg N. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 141, S53.
- ²⁰⁸ Saran S, Gopalan S, Krishna TP. *Nutrition*. **2002**, 18, 393.
- ²⁰⁹ Sekirov I, Russel SL, Antunes LCM, Finlay BB. *Physiol. Rev.* **2010**, 90, 859.

- ²¹⁰ Barrons R, Tassone D. *Clin. Ther.* **2008**, 30, 453.
- ²¹¹ Xaus PJ, Martin JR, Rodriguez GJM, Boza PJ, Jiménez LJ. Probiotic strains, a process for the selection of them, compositions thereof, and their use. Google Patents: **2004**.
- ²¹² Weinberg ED. *Perspect. Biol. Med.* **1997**, 40, 578.
- ²¹³ Duhutrel P, Bordat C, Wu TD, Zagorec M, Guerquin-Kern JL, Champomier-Vergès MC. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 560.
- ²¹⁴ Nair B, Pradeep T. *Cryst. Growth. Des.* **2002**, 2, 293.
- ²¹⁵ Pradeepa, Vidya SM, Mutalik S, Bhat KU, Huilgol P, Avadhani K. *Life Sci.* **2016**, 153, 171.
- ²¹⁶ Novick RP, Geisinger E. *Genetics.* **2007**, 42:541.
- ²¹⁷ Ng WL, Bassler BL. *Annu Rev Genet.* **2009**, 43, 197.
- ²¹⁸ Rutherford ST, Bassler BL. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**, 2.
- ²¹⁹ Costerton J, Cheng K, Geesey G, Ladd T, Nickel J, Dasgupta M, Marrie T. *Annu Rev Microbiol.* **1987**, 41, 435.
- ²²⁰ O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. *Microbiology.* **1999**, 54, 49.
- ²²¹ Stoodley P, Sauer K, Davies DG, J. W. Costerton JW. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**. 56, 187.
- ²²² Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. *J Bacteriol.* **2001**, 183, 2888.
- ²²³ Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa I. *Appl Environ Microbiol.* **2001**, 67, 4538.
- ²²⁴ Mah TF, O'Toole GA. *Trends Microbiol.* **2001**, 9, 34.
- ²²⁵ Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. *J. Bacteriol.* **2007**, 189(22), 7945.
- ²²⁶ Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Vet. Microbiol.* **2009**, 135, 187.
- ²²⁷ Hooshangi S, Bentley WE. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, 19, 550.
- ²²⁸ Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. *Annu Rev Microbiol.* **1981**, 35, 299.
- ²²⁹ Burns RG. Microbial and enzymic activities in soil biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA, editors. Structure and function of biofilms. Wiley, Chichester, England **1989**.
- ²³⁰ Nielsen PH, Jahn A, Palmgren R. *Wat Sci Tech.* **1997**, 36, 11.
- ²³¹ Jahn A, Nielsen PH. *Wat Sci Tech.* **1998**, 37, 17.
- ²³² Watnick P, Kolter R. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 2675.

- ²³³ Flemming HC, Wingender J. Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In Bitton G, editor, *Encyclopedia of environmental microbiology*, vol. 3. Wiley, New York, USA **2002**.
- ²³⁴ Frølund B, Palmgren R, Keiding K, and Nielsen PH. *Water Res.* **1996**, 30, 1749.
- ²³⁵ Nielsen PH, Jahn A. Extraction of EPS. In Wingender J, Neu TR, Flemming HC, editors. *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin, Germany **1999**.
- ²³⁶ Wagner M, Ivleva NP, Haisch C, Niessner R, Horn H. *Water Res.* **2009**, 43, 63.
- ²³⁷ Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH. *Environ Microbiol.* **2007**, 9(12), 3077.
- ²³⁸ Flemming HC, Wingender J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 623.
- ²³⁹ Schooling SR, Beveridge TJ. *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 5945.
- ²⁴⁰ Klausen MM, Thomsen TR, Nielsen JL, Mikkelsen LH, Nielsen PH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, 50, 123.

CAPÍTULO 2.

BIODISTRIBUCIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS ADMINISTRADAS ORALMENTE

1. Introducción.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONS) de magnetita (Fe_3O_4)/maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), presentan propiedades magnéticas únicas que junto con su biodegradabilidad y su baja toxicidad justifican su empleo para diversas aplicaciones biomédicas, incluidas la resonancia magnética (MRI), la administración de fármacos y la hipertermia magnética.^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10} Sin embargo, la eficacia de las SPIONS como fármacos requiere el control de dos procesos cruciales: su biodistribución y su biodegradación. Tras su administración, las SPIONS tienen, primero, que acumularse específicamente en el tejido que se va a fotografiar o tratar, y en segundo lugar, degradarse en un tiempo y forma adecuados para reducir los posibles efectos tóxicos.¹¹

Cuando se emplean para aplicaciones biomédicas, las nanopartículas de magnetita/maghemita se administran principalmente por inyección intravenosa. En cambio, cuando su diana se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI), la administración oral supone la vía más conveniente, ya que se evita la complejidad y los inconvenientes asociados a la administración intravenosa. A pesar de las ventajas de la administración oral, es necesario superar un par de obstáculos cuando se opta por esta vía de administración: el ambiente gástrico fuertemente ácido que reduce la estabilidad del fármaco, y las enzimas digestivas que degradan el fármaco reduciendo su biodisponibilidad. En contraposición a las ventajosas oportunidades de diagnóstico y terapia que ofrecen las SPIONS, los datos referentes a su biodistribución y biodegradación en el TGI son actualmente escasos.¹² El diagnóstico y el tratamiento de enfermedades del intestino despiertan el mayor interés, puesto que es en esta región del TGI donde se desarrollan más patologías, como el conjunto de enfermedades denominadas enfermedades inflamatorias intestinales (Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diverticulitis y colon irritable), así como el cáncer colorrectal, el tercer tipo de tumor más común, que causó 700,000 muertes en 2012.¹³

Además, las nanopartículas de magnetita/maghemita han surgido como nuevas formas físicas y químicas para controlar la deficiencia de hierro. Está demostrado que el hierro es el micronutriente con mayores deficiencias en todo el mundo. La anemia es en realidad un gran problema de salud pública mundial, que afecta al 20% de la población del planeta.¹⁴

La anemia por deficiencia en hierro está causada por una ingesta insuficiente de hierro en la dieta, así como una mala absorción de este micronutriente. Para aumentar la cantidad de hierro ingerido en la dieta, existen en el mercado numerosos suplementos de hierro basados en formas químicas clásicas. Estos suplementos presentan dos limitaciones importantes: su baja biodisponibilidad, y los efectos secundarios perjudiciales que provocan.¹⁵ Es por esto que las SPIONs han surgido como una prometedora ruta para la administración de hierro ya que son más bioactivas que las fórmulas de hierro clásicas y presentan un mejor acceso a los tejidos.

La absorción de hierro tiene lugar en el intestino delgado, preferentemente en el duodeno. Por lo tanto, sigue siendo un desafío desarrollar rutas para superar el fuerte ambiente ácido del estómago y conducir las nanopartículas de hierro al intestino. Se pueden prever dos enfoques para superar este desafío: el uso de nanopartículas magnéticas con recubrimientos protectores para evitar el ataque químico en el estómago o el uso de bioplataformas como vehículos de transporte de SPIONs hacia el intestino. A este respecto, recientemente hemos demostrado cómo las bacterias probióticas, *Lactobacillus fermentum* o *Bifidobacterium breve*, actúan como plataformas para agrupar densamente las nanopartículas magnéticas en sus superficies externas.¹⁶ Esta es una ruta prometedora para permitir que las nanopartículas magnéticas pasen a través del medio estomacal y alcancen el intestino, ya que las bacterias probióticas constituyen una parte importante de la microbiota natural humana, sobreviven a las condiciones estomacales y anidan en diferentes áreas del intestino. Paralelamente a este desarrollo,

es necesario obtener más información sobre los procesos de distribución y degradación de nanopartículas magnéticas a lo largo del TGI.

En este capítulo, describimos un estudio magnético para monitorizar en paralelo la biodistribución y biodegradación, a largo del TGI de ratas, de: nanopartículas desnudas de maghemita de 10 nm (MNP), y bacterias probióticas que contienen en su superficie miles de estas mismas nanopartículas (MNP-bacteria), ambos tratamientos administrados oralmente. El objetivo de este estudio es comparar los patrones de biodistribución y biodegradación de las nanopartículas de maghemita a lo largo del TGI de los animales, cuando se administran por vía oral en forma de nanopartículas individuales (MNP) o agregadas en una bioplatforma, como *Lactobacillus fermentum* (MNP-bacteria).

Para lograr este objetivo, llevamos a cabo medidas de susceptibilidad magnética AC (susceptibilidad dentro y fuera de fase, $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ respectivamente) de diferentes tejidos obtenidos después del sacrificio de los dos grupos de ratas tratadas. En particular, extrajimos el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y el ciego de cada uno de los animales. La dependencia de la susceptibilidad fuera de fase ($\chi''(T)$) con la temperatura es un parámetro de alta sensibilidad para la detección de nanopartículas magnéticas en tejidos^{17, 18} porque: (i) otras especies de hierro paramagnético presentes en enterocitos no contribuyen a $\chi''(T)$; (ii) las nanopartículas de maghemita objeto de este estudio se distinguen de otras especies superparamagnéticas nativas presentes en enterocitos como la ferritina, atendiendo a sus temperaturas de bloqueo, que sirven como huellas dactilares para la identificación de la presencia de estas nanopartículas en muestras de tejido; (iii) los máximos en las curvas de susceptibilidad en $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ brindan información sobre el tamaño de partícula y el grado de agregación de estas; y (iv) la susceptibilidad magnética AC de las nanopartículas administradas por masa de hierro, proporciona una curva de calibración para la determinación cuantitativa de la presencia de las nanopartículas en las muestras tisulares.

2. Resultados y discusión.

2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión de MNP y MNP-bacteria.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de MNP mostraron nanopartículas esféricas irregulares (Figura 1). El tamaño medio de partícula fue 10 nm ($\sigma=0.9$).

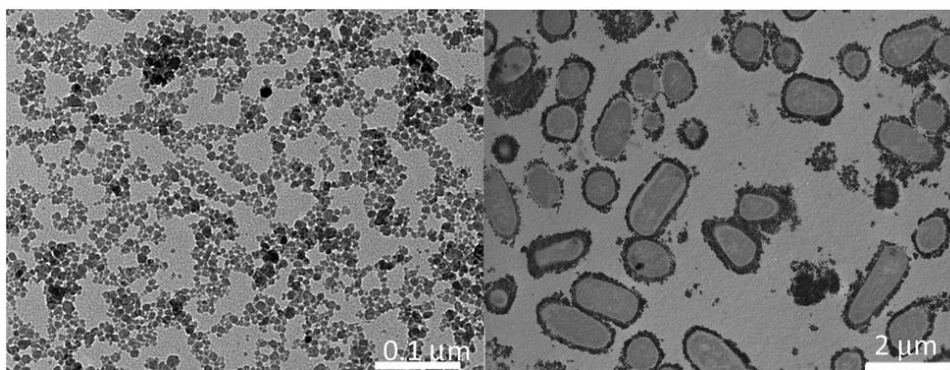


Figura 1. Típica micrografía TEM (izquierda) de nanopartículas de maghemita (MNP). A la derecha, una micrografía de una delgada sección de resina epoxi donde se observa la presencia de nanopartículas en la superficie externa de las bacterias *L. fermentum* (MNP-bacteria).

En el caso del sistema MNP-bacteria, se observaron por TEM grandes acumulaciones de nanopartículas en las superficies externas de las bacterias (Figura 1). Solo una pequeña fracción de nanopartículas se encuentra en la región interbacteriana, mientras que en el interior de las bacterias, no se observan nanopartículas. Las MNP se adhieren a la superficie externa bacteriana, probablemente en los exopolisacáridos (EPS) que rodean la bacteria, debido a la interacción electrostática entre la superficie de MNP con carga positiva y el EPS bacteriano cargados negativamente.^{16, 19}

2.2. Análisis del hierro en los tejidos.

El contenido en hierro de cada uno de los tejidos gastrointestinales de las ratas controles y de las ratas tratadas con MNP, y MNP-bacteria se midió por ICP-OES (Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrofotómetro

de Emisión Óptica, en inglés *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*). Como se muestra en la Figura 2, la cantidad total de hierro en intestinos (la suma del contenido en hierro en ciego, intestino delgado e intestino grueso) es sensiblemente mayor cuando administramos MNP-bacteria (0.620 mg Fe por g tejido) que cuando administramos MNP (0.414 mg Fe por g tejido).

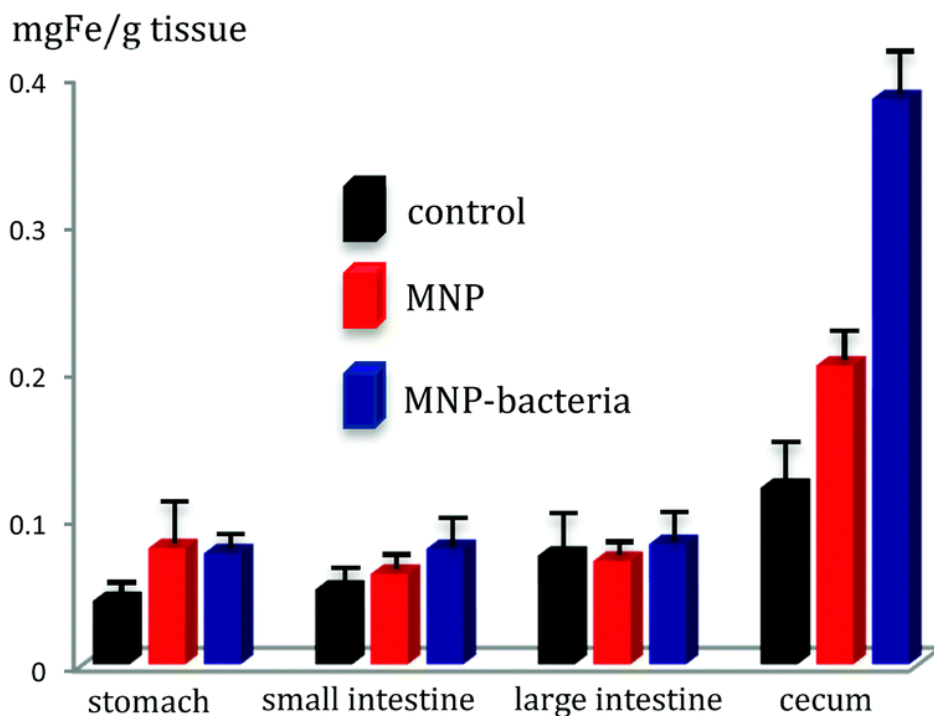


Figura 2. Contenido en hierro de los tejidos del TGI tras la administración de MNP y MNP-bacteria. Barra negra: grupo control; barra roja: grupo tratado con MNP y barra azul: grupo tratado con MNP-bacteria. Barras de error, \pm sem.

La diferencia es particularmente significativa en el caso del ciego, donde la cantidad de hierro tras la administración de MNP-bacteria (0.384 mg Fe por g tejido) es prácticamente dos veces la obtenida tras la administración de MNP (0.203 mg Fe por g tejido). Estos hallazgos coinciden con el conocido hecho que las bacterias probióticas anidan en las diferentes áreas del TGI con diferente preferencia, y sugiere que las

bacterias probióticas actúan como transportadores que asisten a las nanopartículas magnéticas para superar la barrera estomacal.

2.3. Estudio magnético de los tejidos.

Las propiedades magnéticas de MNP y MNP-bacteria se caracterizaron por susceptibilidad magnética AC. La susceptibilidad tanto dentro como fuera de fase ($\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ respectivamente) de ambas muestras presentó un único máximo. Para la componente fuera de fase ($\chi''(T)$) el máximo se situó a temperaturas ligeramente inferiores, indicativo del fenómeno de relajación magnética del bloqueo magnético de partículas superparamagnéticas (Figura 3).

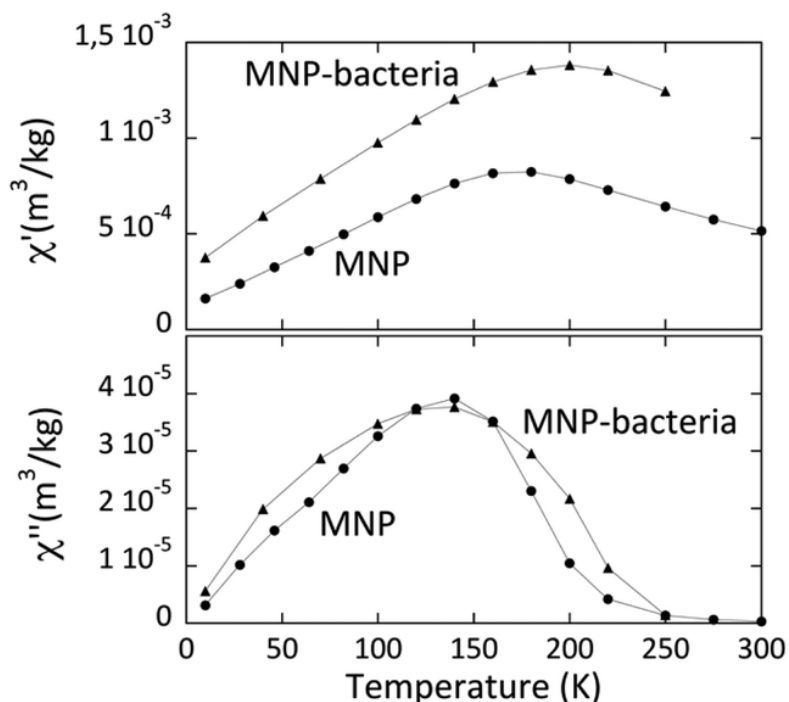


Figura 3. Dependencia con la temperatura de la susceptibilidad magnética dentro y fuera de fase de MNP (círculos) y MNP-bacteria (triángulos) por masa de la muestra.

La susceptibilidad fuera de fase llega a cero por encima de 250 K, lo que indica que estas muestras son superparamagnéticas por encima de esta temperatura. Se observan ligeras diferencias entre las dos muestras

atendiendo a la temperatura a la que se sitúa el máximo. Específicamente, los máximos $\chi'(T)$ se localizan a ~ 160 K y ~ 200 K para MNP y MNP-bacteria respectivamente. Este comportamiento está en consonancia con las variaciones esperadas en las interacciones magnéticas dipolares entre las nanopartículas, producidas por diferentes grados de agregación al comparar entre las nanopartículas aisladas (MNP) o adheridas a la superficie externa bacteriana (MNP-bacteria).^{16,17}

Un análisis más profundo de las interacciones interpartícula se llevó a cabo diluyendo las mismas muestras en agar, con la intención de reducir dichas interacciones y así caracterizarlas. De los resultados expuestos en la Figura 4 se puede observar que la dilución en agar resultó en el desplazamiento del máximo $\chi''(T)$ hacia temperaturas más bajas sólo en el caso de MNP, pero no para MNP-bacteria.

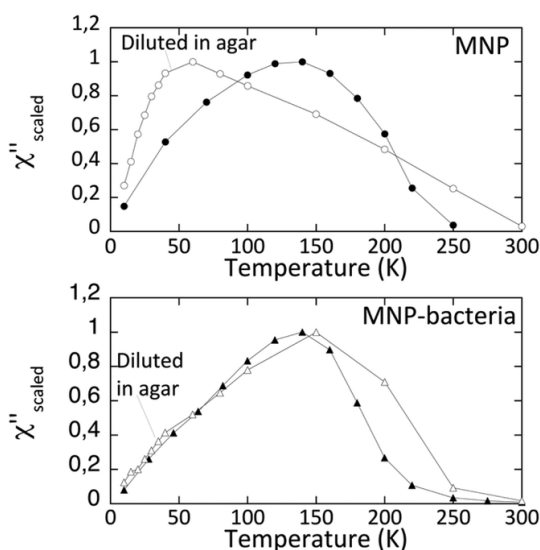


Figura 4. Dependencia con la temperatura de la susceptibilidad magnética dentro y fuera de fase de MNP y MNP-bacteria (negro) y sus correspondientes diluciones en agar (blanco) escaladas a sus máximos.

Este último hecho es lógico dado que la dilución en agar de MNP-bacteria reduce la distancia entre las bacterias pero mantiene las

distancias interpartícula sin cambios, ya que permanecen adheridas a la superficie bacteriana. Sin embargo en el caso de MNP, el máximo $\chi''(T)$ se desplaza desde 140 K en la muestra concentrada a aproximadamente 60 K para la diluida como consecuencia del aumento de distancia interpartícula.

La importancia de las interacciones interpartícula también ha sido evaluada a través de la determinación del factor preexponencial, τ_0 de la ecuación de Arrhenius. En este caso, para las muestras originales de MNP y MNP-bacteria los valores de τ_0 se encontraban fuera del rango de interacciones dipolares despreciables (10^{-9} - 10^{-12} s) situándose alrededor de 10^{-24} y 10^{-21} s respectivamente. Sin embargo, la dilución de MNP en agar sirvió para reducir las interacciones interpartícula, con lo que la muestra MNP diluida en agar presenta un valor de $\tau_0 = 1.6 \times 10^{-12}$ s, localizado dentro del límite de interacciones despreciables, lo que refleja de nuevo la disminución de las interacciones interpartícula por efecto de la dilución en el caso de MNP.

Los perfiles $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ de los diferentes órganos del TGI de las ratas tratadas presentan un patrón muy parecido a los de las muestras administradas (MNP y MNP-bacteria), ya que todos ellos presenta un único máximo para las componentes tanto dentro como fuera de fase (Figura 5). Destacan dos características diferentes muy interesantes. La primera, la localización de la temperatura del máximo $\chi''(T)$ de las muestras de ciego de los dos grupos de animales se localiza a temperaturas considerablemente más bajos (por debajo de 50 K) que el resto de los tejidos, los cuales presentan máximos entre 100 y 150 K (Tabla 1). La localización del máximo a temperaturas más bajas es indicativa de una transformación de las nanopartículas administradas que podría asociarse a una reducción del tamaño de partícula, a una reducción de las interacciones interpartícula, o ambas. La segunda característica interesante aparece en la muestra de ciego de los animales que recibieron el tratamiento con MNP, donde se observa una cola

paramagnética a bajas temperaturas en la componente $\chi'(T)$, lo que indica la presencia de especies de hierro no minerales.

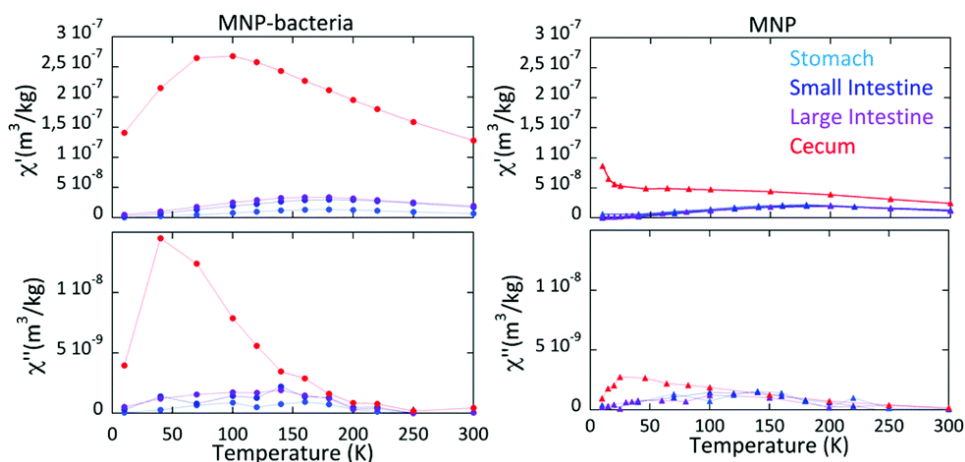


Figura 5. Dependencia con la temperatura de la susceptibilidad magnética dentro y fuera de fase por masa de tejido para los diferentes órganos de los grupos de animales tratados con MNP (derecha) y MNP-bacteria (izquierda).

Tabla 1. Temperatura de los máximos de las curvas $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ tras el tratamiento con MNP y MNP-bacteria para los diferente tejidos de las ratas.

Tejido	Temperatura (K) de máximos χ' y χ''			
	MNP		MNP-bacteria	
	χ'	χ''	χ'	χ''
Estómago	180	≈140	180	≈140
Intestino Delgado	180	≈140	180	≈140
Intestino Grueso	180	≈130	160-180	≈140
Ciego	50-100	30-50	70-100	<50

También vale la pena mencionar que la altura del máximo de la susceptibilidad fuera de fase puede usarse como un sustituto de la concentración de hierro en forma de una especie determinada.²⁰ En este estudio, en los animales de ambos grupos, tanto el intestino grueso como el delgado presentan una concentración similar de nanopartículas magnéticas de hierro mientras que el estómago parece ser el órgano con

una menor cantidad de partículas y el ciego el órgano que acumula la mayor cantidad.

Haciendo uso de los datos de susceptibilidad magnética se puede cuantificar la concentración de hierro en forma de nanopartícula en cada tejido siguiendo protocolos descritos previamente (Figura 6).^{17,21} Esta determinación cuantitativa de hierro puede llevarse a cabo dada la existencia de estándares, en este caso MNP y MNP-bacteria, con el mismo comportamiento magnético que el observado en la mayoría de las muestras de tejido. Aunque podemos cuantificar con un error relativamente bajo el contenido de hierro en el estómago, intestino delgado e intestino grueso, esto no es posible en el ciego, debido a las diferencias de temperatura a la que se sitúa el máximo en este tejido en comparación con los materiales administrados (MNP y MNP-bacteria). Para este órgano, la determinación de mg de nanopartículas de Fe por g de tejido seco no es tan rigurosa como para el resto de tejidos.

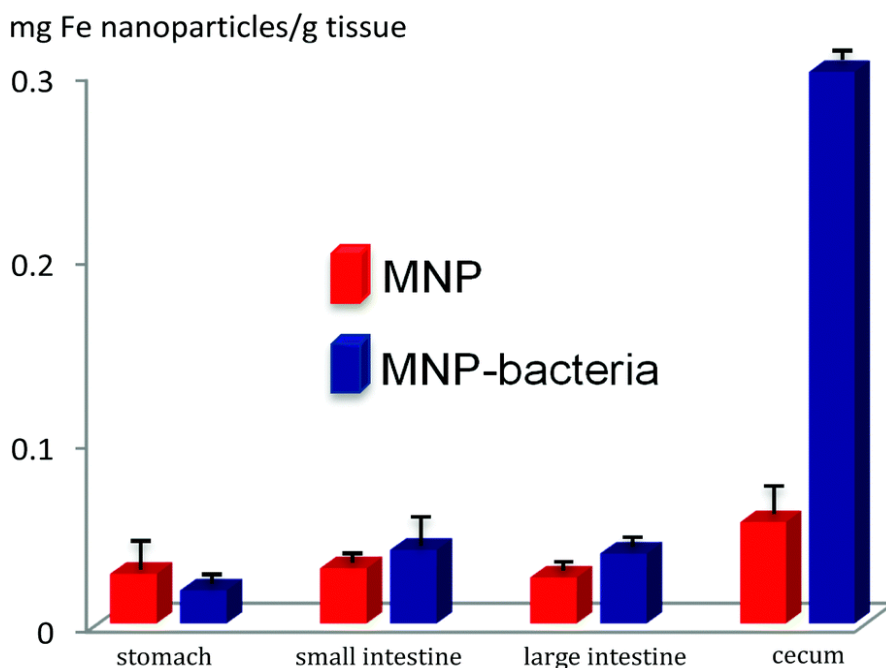


Figura 6. Concentración de hierro, en forma de nanopartículas magnéticas, en cada tejido, calculada a partir de medidas magnéticas. Barras de error, \pm sem.

La primera conclusión extraída de estos datos es que la cantidad de nanopartículas magnéticas en los tejidos intestinales (intestino delgado, intestino grueso y ciego) es mayor después de la administración de MNP-bacterias que tras administrar MNP. Al igual que en el análisis del contenido de hierro por ICP-OES, la diferencia es particularmente significativa en el ciego, donde los valores de la susceptibilidad magnética fuera de fase son cinco veces mayores. El único tejido donde la acumulación de nanopartículas es mayor cuando se administra MNP en vez de MNP-bacteria es precisamente el estómago, 0.027 contra 0.018 mg de Fe g⁻¹ de estómago para MNP y MNP-bacteria respectivamente, lo que supone otra evidencia de que las bacterias actúan como transportadores útiles para ayudar a las nanopartículas magnéticas a superar el medio del estómago y llegar a los intestinos.

Desde un punto de vista cualitativo, el patrón de biodistribución de nanopartículas de maghemita después de la ingestión de MNP y de MNP- bacteria parece similar a primera vista: las nanopartículas se distribuyen a lo largo del TGI y se acumulan específicamente en el ciego. Sin embargo, en un análisis más profundo, se observan algunas diferencias drásticas. En primer lugar, la acumulación de nanopartículas magnéticas en el ciego es más específica cuando se administraron MNP-bacteria, ya que los valores de $\chi''(T)$ para el ciego son diez veces mayores que para otros tejidos en el grupo de animales tratados con MNP-bacteria, mientras que esta diferencia solo es doble cuando se administraron MNP. En segundo lugar, los máximos de $\chi''(T)$ en el ciego (alrededor de 50 K y 30 K después de la administración de MNP-bacteria y MNP, respectivamente) se localizan a temperaturas más bajas con respecto a las muestras originales de MNP o MNP-bacteria (200 K y 160 K, respectivamente), y también están por debajo de la muestra de MNP diluida en agar, que presenta interacciones dipolares insignificantes. Este hecho manifiesta la existencia de un proceso de degradación de nanopartículas magnéticas. El hecho de que los máximos de

susceptibilidad fuera de fase estén por debajo del límite de no interacción determinado por el valor τ_0 para la dilución en agar de MNP, indica que además del proceso de desagregación de MNP y una posible liberación de partículas de MNP- bacteria, también se produce una reducción del tamaño de partícula como consecuencia del proceso de biodegradación. La reducción del tamaño de partícula daría lugar a una liberación de átomos de hierro libres, un hecho que concuerda con la cola paramagnética observada en $\chi'(T)$ a bajas temperaturas en la muestra de ciego de los animales que recibieron el tratamiento de MNP y que ha sido previamente observado en muestras de MNP degradadas artificialmente.¹⁸ Por el contrario, la ausencia de una cola paramagnética en la curva del ciego $\chi'(T)$ después de la administración de MNP- bacteria apunta a la existencia de una mayor acumulación de nanopartículas magnéticas menos degradadas.

Estas mismas conclusiones también pueden extraerse al comparar las relaciones entre concentraciones de hierro en forma de nanopartículas de maghemita (estimadas mediante mediciones SQUID) y hierro total (medido por ICP-OES), en cada tejido, después de la administración de MNP o MNP-bacteria (Tabla 2). Esta proporción es mayor en el estómago para MNP, lo que significa que las nanopartículas de maghemita se acumulan más en este órgano cuando se administran en forma de MNP que como MNP-bacteria. Por el contrario, los intestinos presentan mayores proporciones en el caso del tratamiento con MNP-bacteria, siendo esta diferencia significativamente más alta para el ciego, donde las MNP pueden haberse degradado más rápido o acumulado en una menor cantidad que MNP-bacteria.

***Biodistribución y biodegradación de nanoestructuras
magnéticas administradas oralmente***

Tabla 2. Comparación del contenido de hierro total (mg Fe por g muestra) en los tejidos del TGI (medido por ICP-OES) y hierro como nanopartículas de maghemita (obtenido por medidas de SQUID).

Tejido	Tratamiento	[Fe]maghemita	[Fe]total	[Fe]maghemita/[Fe]total
Estómago	Control	0.00	0.05	0.00
	MNP	0.03	0.09	0.33
	MNP-bacteria	0.02	0.08	0.25
Intestino delgado	Control	0.00	0.06	0.00
	MNP	0.03	0.07	0.43
	MNP-bacteria	0.04	0.08	0.50
Intestino grueso	Control	0.00	0.07	0.00
	MNP	0.03	0.06	0.50
	MNP-bacteria	0.04	0.07	0.60
Ciego	Control	0.00	0.13	0.00
	MNP	0.06	0.20	0.30
	MNP-bacteria	0.30	0.40	0.75

En vista de estos hallazgos y teniendo en cuenta que las nanopartículas pasan a través del TGI siguiendo el orden: estómago, intestino delgado, ciego y finalmente intestino grueso, es un hecho interesante que los máximos en las curvas de $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$ se localizan a temperaturas más bajas en el caso del ciego que en el tejido siguiente (intestino grueso). Podría postularse que una pequeña fracción de MNP-bacteria y MNP pasa a través de todo el TGI y probablemente se excreta a través de las heces, mientras que la mayoría, especialmente MNP-bacteria, superan el medio estomacal y se acumulan en el ciego.

Dado que la absorción de hierro tiene lugar en el intestino delgado, especialmente en el duodeno, los suplementos de hierro deben pasar por el estómago y alcanzar esta región. Nuestros hallazgos muestran que la concentración de nanopartículas de maghemita en el intestino delgado es mayor cuando se administran en forma de MNP-bacteria que como MNP. En consecuencia, MNP-bacteria debería ser más efectivo para el suministro de hierro que MNP. Para confirmar esto, se midieron los

niveles de hemoglobina y hierro en plasma de cuatro grupos de ratas: ratas sanas, deficientes en hierro y deficientes en hierro después de la administración de MNP o MNP- bacteria. Los resultados representados en la Figura 7 muestran una mejora en la homeostasis del hierro después del tratamiento con MNP-bacteria. De hecho, tanto el hierro en plasma como los niveles de hemoglobina se corrigieron hasta alcanzar valores saludables en las ratas tratadas con MNP- bacteria durante dos semanas, mientras que los animales que estaban bajo el tratamiento con MNP no alcanzaron los valores normales, transcurrido el mismo período de tiempo.

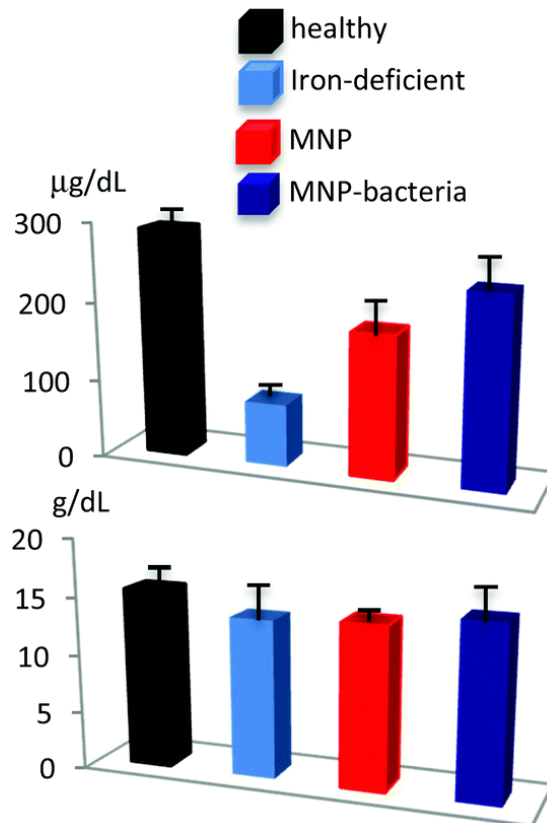


Figura 7. Hierro en plasma (arriba) y valores de hemoglobina (abajo) en las ratas de los diferentes grupos: sano, deficiente en hierro y tratados con MNP y MNP-bacteria. Barras de error, \pm sem.

3. Conclusiones.

El análisis colectivo de contenido en hierro y susceptibilidad magnética de los diferentes tejidos de TGI (estómago, intestino delgado e intestino grueso y ciego) revela diferentes patrones de biodistribución y biodegradación de las nanopartículas de maghemita dependiendo si se ingieren como simples MNP o como entidades MNP-bacteria.

Los resultados confirman que el empleo de bacterias probióticas es una exitosa estrategia para asistir a la nanopartículas a la hora de superar el medio estomacal y así conseguir su acumulación en el intestino, especialmente en ciego. Creemos que estos hallazgos tienen una amplia aplicabilidad en estudios de biodistribución y biodegradación de nanoestructuras magnéticas administradas oralmente y establecen un marco para su aplicación en medicina. Como ejemplo de ello, hemos ilustrado cómo la administración de MNP-bacteria a ratas deficientes en hierro corrige los niveles de hierro tras dos semanas de tratamiento.

4. Materiales y métodos.

4.1. Preparación de MNP y MNP-bacteria.

Las muestras de MNP y MNP-bacteria se prepararon siguiendo un protocolo previamente descrito.^{16, 18} Las nanopartículas de maghemita (MNP) fueron sintetizadas de acuerdo al método de Massart de coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) en una estequiometría 0.5.²² El pH se ajustó a 11 con NaOH 3 M y la fuerza iónica con NaNO₃ 1 M, el tamaño medio de las nanopartículas de magnetita resultantes fue de 10 nm. Tras la oxidación de la magnetita a maghemita con HClO₄ 1 M, se obtuvo un coloide de nanopartículas de maghemita estable a pH 2.

Para la preparación de la muestra de MNP-bacteria, un cultivo líquido de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 creció en un medio común, como MRS, a 37°C con agitación orbital durante 24 h. Las bacterias se

centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Después, una solución ácida (pH 2) de MNP (66.6 μ l, 0.95 M) se añadió a las bacterias en un baño de hielo y se mezcló. La mezcla fue diluida con 1 mL de agua destilada. Las bacterias cargadas de nanopartículas de maghemita en superficie (MNP-bacteria) se recolectaron por centrifugación a 100 g durante 20 minutos.

La caracterización de las muestras de MNP y MNP-bacteria se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello gotas de cada una de las muestras se depositaron sobre rejillas de Cu recubiertas de carbono (200 mallas) específicas para TEM. Las rejillas se secaron con papel de filtro y, en el caso de la muestra MNP-bacteria, luego se tiñó con acetato de uranilo al 1% para visualizar la membrana de la bacteria. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio electrónico de análisis Philips CM-20 HR que funcionaba a 200 keV.

Para la caracterización por HAADF-STEM (microscopía electrónica de barrido), mapa EDX (energía dispersada de Rayos X), HRTEM (microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) y estudios de difracción electrónica, la muestra MNP-bacteria se incluyó en resina epoxi. Para ello, primero se procedió a la fijación de la muestra usando glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato sódico 0.1 M a 4°C durante 4 h. Tras la fijación, la muestra se lavó 3 veces en tampón cacodilato sódico 0.1 M durante 15 minutos. Se añadió tetróxido de osmio al 0.1% en tampón cacodilato sódico 0.1 M y se dejó reposar durante 1 h, para teñir las estructuras orgánicas. Se eliminó el exceso de tetróxido de osmio lavando la muestra tres veces con tampón cacodilato sódico 0.1 M durante 15 minutos cada lavado. Luego, la deshidratación de la muestra se llevó a cabo a través de una serie de baños con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. Finalmente, la muestra se incluyó en resina epoxi, para lo que se dejó durante toda la noche a 4°C. Se obtuvieron los ultramicrocortes en un microtomo y se observaron en un microscopio FEI TITAN G2. Las imágenes de HRTEM y la difracción de electrones se obtuvieron utilizando el mismo microscopio.

4.2. Animales.

Este estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio” promulgada por el Instituto Nacional de Salud, y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada (España) (ref. nº CEEA-2010-286). Todos los estudios que incluyen la experimentación con animales se planifican de acuerdo con las directrices *ARRIVE* para la publicación de resultados derivados de estudios con animales.^{23, 24}

Ratas Wistar macho (180-200 g) suministradas por *Janvier (St Berthevin Cedex, Francia)* se alojaron individualmente en jaulas de Makrolon y se mantuvieron en una atmósfera con aire acondicionado con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con acceso libre a agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron asignados aleatoriamente a diferentes grupos experimentales (n = 4). Uno de ellos recibió solo la dieta estándar, mientras que los tres grupos restantes fueron alimentados con una dieta deficiente en hierro (TD.80396) proporcionada por *Harlan Laboratories (Madison, WI, EE. UU.)*. Dos de los grupos, de los tres deficientes en hierro, recibieron un suplemento de hierro diferente (1 mg por día por animal), mediante suspensiones de MNP o MNP-bacteria. Los suplementos se administraron diariamente por sonda oral. La ingesta de alimentos y agua se registró diariamente para todos los grupos. El peso corporal de las ratas se midió dos veces por semana. No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales entre los grupos a lo largo del experimento. Se tomaron muestras de sangre después de dos semanas de la vena porta hepática en un tubo heparinizado para realizar la analítica sanguínea. Luego, las ratas se sacrificaron y se aislaron el estómago, el intestino delgado, el ciego y el intestino grueso de cada animal, se pesaron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarlos a -80°C.

4.3. Análisis elemental.

Las muestras de tejidos de los animales tratados con MNP o MNP-bacteria se liofilizaron, se pesaron y se digirieron en ácido para análisis elemental mediante la adición de HNO₃ 65% (p/v) y calentando hasta 95°C durante 1 h, usando un baño seco. Después de esto, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Tras lo que se añadió H₂O₂ 30% (p/v) y se calentaron a 95°C durante 1 h. La determinación de la concentración de hierro se llevó a cabo mediante espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) en un dispositivo Perkin Elmer Optima 2100 DV.

4.4. Dilución en agar.

Para evaluar la influencia de las interacciones dipolares en la propiedades magnéticas de las partículas, se prepararon diluciones de MNP y MNP-bacteria al 2% (p/v) en agar. Para ello las muestras de MNP y MNP-bacteria se mezclaron con el agar todavía líquido (a unos 90°C). La mezcla se colocó rápidamente en un baño de ultrasonidos tibio que permitió la gelificación lenta del agar mientras los materiales se dispersaban por ultrasonidos. Los geles resultantes se liofilizaron durante 24 h en un liofilizador Telstar lyoquest.

4.5. Caracterización magnética de las muestras de tejido.

Las muestras de tejido, así como las muestras MNP-bacteria y MNP se liofilizaron y los polvos correspondientes se colocaron en cápsulas de gelatina para la caracterización magnética. Las mediciones se realizaron en un magnetómetro Quantum Design MPMS-XL SQUID equipado con una opción de susceptibilidad magnética de CA (corriente alterna). Las medidas de susceptibilidad de CA se realizaron con una amplitud de corriente alterna de 0,41 Oe, en el rango de temperatura entre 10 y 300 K y con una frecuencia de 11 Hz.

Las interacciones dipolares se verificaron calculando el parámetro τ_0 , que es el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius para el tiempo de relajación, $\tau = \tau_0 \exp(E_a / k_B T)$, donde k_B es la constante de

Boltzmann y E_a la barrera de energía de anisotropía de una sola partícula. Los cálculos se realizaron en muestras seleccionadas solo cuando el ruido experimental fue lo suficientemente bajo como para realizar un ajuste de los datos preciso. Este análisis se basa en la complementariedad de la información de relajación contenida en los datos de susceptibilidad magnética en fase y fuera de fase, y se ha descrito previamente.²⁰

5. Referencias.

-
- ¹ S. Laurent, L. Vander Elst and R. N. Muller, in *Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, ed. A. Merbach, L. Helm and E. Toth, 2nd edn, **2013**, pp. 427–447.
 - ² F. Liu, S. Laurent, H. Fattahi, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Nanomedicine*, **2011**, 6, 519–528.
 - ³ S. Laurent, J.-L. Bridot, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Future Med. Chem.*, **2010**, 2, 427–449.
 - ⁴ S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, **2009**, 110, 2574.
 - ⁵ S. J. J. Titinchi, M. P. Singh, H. S. Abbo and I. R. Green, *Adv. Healthcare Mater.*, **2014**, 3, 49–85.
 - ⁶ F. Canfarotta and S. A. Piletsky, *Adv. Healthcare Mater.*, **2014**, 3, 160–175.
 - ⁷ M. Colombo, S. Carregal-Romero, M. F. Casula, L. Gutiérrez, M. P. Morales, I. B. Bönhm, J. T. Heverhagen, D. Prospero and W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 4306–4334.
 - ⁸ Q. Pankhurst, N. Thanh, S. Jones and J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2009**, 42, 224001.
 - ⁹ J. Kolosnjaj-Tabi, L. Lartigue, Y. Javed, N. Luciani, T. Pellegrino, C. Wilhelm, D. Alloyeau and F. Gazeau, *Nano Today*, **2016**, 11(3), 280–284.
 - ¹⁰ S. Chamorro, L. Gutiérrez, M. P. Vaquero, D. Verdoy, G. Salas, Y. Luengo, A. Brenes and F. J. Teran, *Nanotechnology*, **2015**, 26, 205101.
 - ¹¹ P. Guardia, A. Riedinger, H. Kakwere, F. Gazeau and T. Pellegrino, in *Bio- and Bioinspired Nanomaterials*, ed. D. Ruiz-Molina, F. Novio and C. Roscini, **2015**, pp. 139–172.

- ¹² X. Liu, I. Marangon, G. Melinte, C. Wilhelm, C. Menard-Moyon, B. P. Pichon, O. Ersen, K. Aubertin, W. Baaziz, C. Pham-Huu, S. Begin-Colin, A. Bianco, F. Gazeau and D. Begin, *ACS Nano*, **2014**, *8*, 11290–11304.
- ¹³ World Cancer Report **2014**, World Health Organization, 2014. pp. chapter 1.1.
- ¹⁴ E. McLean, M. Cogswell, I. Egli, D. Wojdyla and B. De Benoist, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005, *Public Health Nutr.*, **2009**, *12*, 444–454.
- ¹⁵ R. Hoffman, E. Benz and S. Shattil, et al., Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload, in *Hematology*, Churchill Livingstone, Philadelphia-USA, Harcourt Brace & Co, New York, NY, USA, 3rd edn, **2000**, ch. 26.
- ¹⁶ M. Martín, F. Carmona, R. Cuesta, D. Rondón, N. Gálvez and J. M. Domínguez-Vera, *Adv. Funct. Mater.*, **2014**, *24*, 3489.
- ¹⁷ L. Gutiérrez, M. P. Morales and F. J. Lázaro, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 4456.
- ¹⁸ L. Gutiérrez, S. Romero, G. B. da Silva, R. Costo, M. D. Vargas, C. M. Ronconi, C. J. Serna, S. Veintemillas-Verdaguer and M. P. Morales, *Biomed. Tech.*, **2015**, *60*, 417–425.
- ¹⁹ F. Carmona, M. Martín, N. Galvez and J. M. Domínguez- Vera, *Inorg. Chem.*, **2014**, *53*, 8565.
- ²⁰ J. C. McGrath, G. B. Drummond, E. M. McLachlan, C. Kilkenny and C. L. Wainwright, *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *160*, 1573.
- ²¹ A. López, L. Gutiérrez and F. J. Lázaro, *Phys. Med. Biol.*, **2007**, *52*, 5043–5056.
- ²² R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, 1247–1248.
- ²³ L. Vayssieres, C. Chaneac, E. Tronc and J. P. Jolivet, *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, *205*, 205–212.
- ²⁴ C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson and D. G. Altman, *J. Pharmacol. Pharmacother.*, **2010**, *1*, 94.

CAPÍTULO 3.

BACTERIAS PORTADORAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO PARA EL TRATAMIENTO DE ANEMIA

1. Introducción.

La deficiencia en hierro, la causa más común de anemia, es el trastorno nutricional de mayor impacto en el mundo.¹ Además de afectar a un gran número de niños y mujeres en los países desarrollados, es la única deficiencia de nutrientes prevalente en los países industrializados.^{2,3,4,5,6}

El hierro tiene funciones vitales en el organismo, como llevar el O₂ desde los pulmones a los tejidos, transferir electrones para una gran variedad de reacciones redox o llevar a cabo reacciones enzimáticas oxidativas.⁷ La deficiencia de hierro provoca, por lo tanto, interferencias con estas funciones vitales y conduce al aumento de la morbilidad y la muerte.⁸

Aunque la importancia de la absorción de hierro en la salud humana se ha reconocido desde hace décadas, el mecanismo por el cual el cuerpo regula este proceso sigue sin estar claro. Lo que está claro es que si la pérdida de hierro no se compensa con la ingesta adecuada del metal a través de la dieta o mediante suplementos de este micronutriente, la situación puede desencadenar el desarrollo de anemia por deficiencia de hierro.⁹

Para aumentar la ingesta diaria de hierro, se han desarrollado numerosos suplementos basados en diferentes fórmulas químicas de hierro, muchas de las cuales están disponibles comercialmente.^{10,11,12} Es bien sabido que el malestar gastrointestinal es el principal efecto secundario de estos suplementos de hierro.¹³ El sulfato ferroso, por ejemplo, el suplemento de hierro más comúnmente usado debido a su bajo coste, puede causar dolor de estómago y náuseas.^{14,15,16} Así mismo, los suplementos a base de sales y complejos de hierro pueden sufrir un proceso de hidrólisis al pasar por el estómago, y el hierro liberado de esta

forma tiene baja biodisponibilidad y, además, puede ser inhibido por una variedad de componentes de la dieta.^{10-12,17}

En este contexto, las nanopartículas de óxido de hierro han surgido como prometedores suplementos de hierro, ya que pueden ser más bioactivos que las formas químicas clásicas y tener mejor acceso a los tejidos.^{18,19,20,21,22,23,24} Sin embargo, algunos trabajos han mostrado que nanopartículas de óxido de hierro grandes, sin recubrimiento, se agregan en condiciones fisiológicas y producen efectos tóxicos graves.^{25,26,27} Por lo tanto, es necesario considerar los peligros toxicológicos de las nanopartículas de hierro y establecer los parámetros (propiedades superficiales, carga, tamaño, forma y funcionalización superficial de las nanopartículas) que optimicen su eficacia como suplementos de hierro sin efectos secundarios.

El uso de un recubrimiento apropiado es esencial para superar el medio hostil del estómago y conducir a las nanopartículas de hierro al intestino, donde tiene lugar la absorción del metal.^{9,28} Recientemente hemos demostrado que las bacterias probióticas, *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacteria breve*, sirven como plataformas donde adherir pequeñas nanopartículas de óxido de hierro en sus superficies externas.^{29,30,31} Estos nuevos materiales son prometedores suplementos de hierro ya que las bacterias probióticas constituyen una parte de la microbiota natural y son capaces de sobrevivir a las condiciones estomacales y anidar en diferentes tejidos del tracto gastrointestinal.

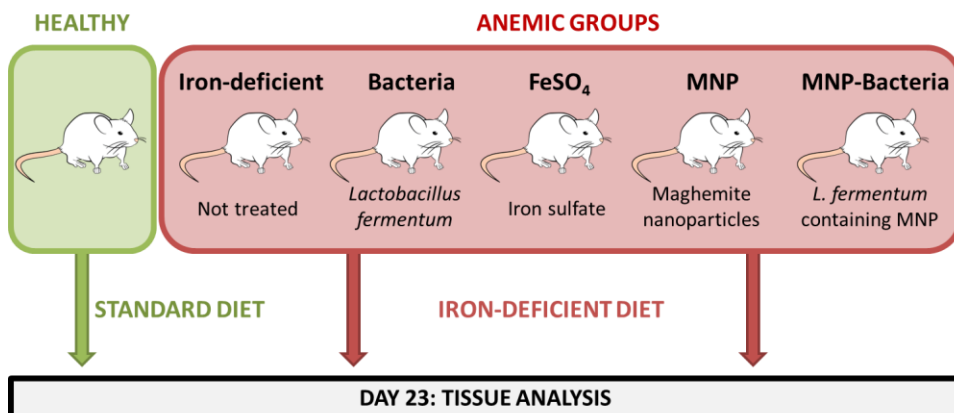
El objetivo del presente estudio fue investigar pequeñas nanopartículas de maghemita (tamaño promedio, 10 nm) no recubiertas (MNP), o incorporadas en *L. fermentum* (MNP-bacteria) como nuevos suplementos de hierro para tratar la deficiencia de hierro en ratas anémicas. No se observaron síntomas adversos o mortalidad de las ratas anémicas tras 23 días de administración oral de MNP o MNP-bacteria. Sin embargo, la eficacia de estos materiales para mitigar la anemia fue sensiblemente mayor cuando las nanopartículas se incorporaron a los

probióticos (MNP-bacteria) que cuando se usaron nanopartículas de óxido de hierro aisladas (MNP).

En este capítulo se ha llevado a cabo un completo set de experimentos, que incluye: analíticas sanguíneas de los animales, junto con un estudio de expresión génica de las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro; el análisis magnético de los diferentes tejidos gastrointestinales de rata después de la administración de MNP y MNP-bacteria; imagen por resonancia magnética (MRI) *in vitro* y estudios de microscopía electrónica, los dos realizados en la línea celular humana HT-29 después del tratamiento con MNP y MNP-bacteria. Los resultados señalaron que las bacterias con las nanopartículas (MNP-bacteria) son internalizadas por los enterocitos (HT-29), lo que supone el avance de una nueva ruta para asegurar la absorción de hierro. La restauración, en ratas anémicas, de niveles saludables en parámetros sanguíneos y la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro después de la administración de MNP-bacteria, confirmó la eficacia de este material como un nuevo fármaco para tratar la anemia por deficiencia en hierro.

2. Resultados y discusión.

Se indujo anemia en treinta ratas mediante una dieta deficiente en hierro. Una vez anémicos, los animales se repartieron en cinco grupos al azar: un grupo anémico no tratado, y cuatro grupos anémicos tratados con *L. fermentum*, sulfato de hierro, MNP o MNP-bacteria, los tres últimos a la misma dosis de hierro. Un grupo control de seis ratas sanas (no anémicas) se incluyó también en el estudio (Esquema 1). Los diferentes suplementos de hierro se administraron a las ratas una vez al día mediante sonda gástrica durante 23 días. El control de la ingesta de alimentos y el peso corporal no revelaron signos adversos, síntomas o mortalidad en los animales después de los 23 días de tratamiento.



Esquema 1. Tratamiento de los animales. Las ratas se repartieron al azar en seis grupos: un grupo control (sanos, no anémicos), un grupo anémico no tratado, y cuatro grupos anémicos tratados con: *L. fermentum*, sulfato ferroso, MNP o MNP-bacteria. Los últimos tres grupos a la misma dosis de hierro.

2.1. Estudio magnético del contenido luminal de los tejidos intestinales.

Dado que la absorción de hierro tiene lugar en sitios específicos del tracto gastrointestinal, principalmente en el intestino,^{9,28} nos centramos en analizar la presencia de nanopartículas de maghemita en el lumen de diferentes secciones del tracto gastrointestinal después de la administración de MNP o MNP-bacteria. Para ello, realizamos medidas magnéticas del contenido luminal liofilizado del intestino delgado, ciego y colon. En particular, estudiamos la dependencia de la susceptibilidad magnética de CA con la temperatura, tanto de la componente en fase ($\chi'(T)$) como fuera de fase ($\chi''(T)$) de estos tres tejidos, para cada uno de los tratamientos (MNP o MNP-bacteria) (Figura 1). El análisis de la dependencia de la susceptibilidad magnética con la temperatura es una técnica altamente sensible para la detección de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas en tejidos biológicos, así como para controlar procesos de degradación parcial o total de las mismas.^{32,33,34}

Bacterias portadoras de nanopartículas de óxido de hierro para el tratamiento de anemia

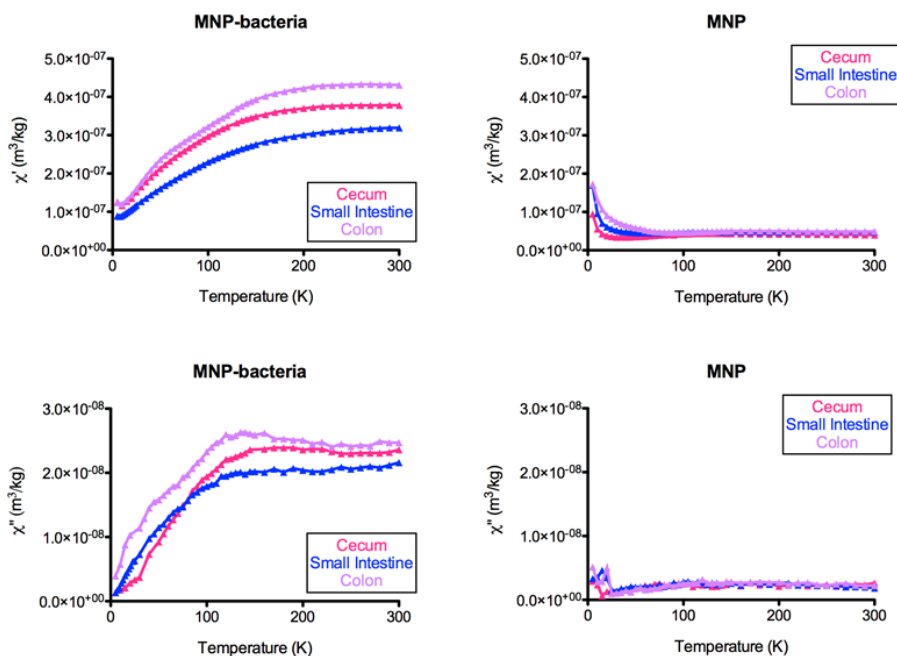


Figura 1. Dependencia de la susceptibilidad magnética de CA con la temperatura. Las componentes dentro (χ') y fuera de fase (χ'') del contenido luminal de las diferentes secciones del tracto gastrointestinal: ciego (rosa), colon (violeta) e intestino delgado (azul).

Como se observa en la Figura 1, las susceptibilidades magnéticas dentro ($\chi'(T)$) y fuera de fase ($\chi''(T)$) del lumen de todos los tejidos intestinales de los animales tratados con MNP-bacteria presentan un máximo, lo que indica la presencia de partículas superparamagnéticas. En cambio, el comportamiento magnético correspondiente al contenido luminal de los diferentes tejidos tras la administración de MNP no presentó ningún máximo en las curvas $\chi'(T)$ y $\chi''(T)$, lo que informó de la ausencia de nanopartículas de maghemita. Además, se observó una clara contribución paramagnética a baja temperatura en la susceptibilidad dentro de fase ($\chi'(T)$) en los tejidos de los animales tratados con MNP. Esta contribución corresponde a la presencia de cationes de hierro procedentes de la degradación de las nanopartículas de maghemita.

A partir de estos datos, se puede concluir que la incorporación de las nanopartículas de maghemita en el probiótico (MNP- bacteria) permite a las nanopartículas superar el medio estomacal y llegar al intestino de forma íntegra. Por el contrario, MNP sufre un proceso de biodegradación, probablemente en el estómago, lo que hace que la cantidad de nanopartículas de maghemita acumuladas en la luz intestinal, en este caso, sea insignificante.

2.2. Análisis del hierro en plasma y niveles de hemoglobina en sangre.

La anemia se caracteriza por una disminución de los niveles de hierro y hemoglobina (Hb) en sangre. Como se puede ver en la Figura 2, debido a la dieta deficiente en hierro, los niveles de Hb en sangre y hierro en plasma de las ratas anémicas fueron más bajos ($p < 0.05$) que los de las ratas sanas (grupo control), como era de esperar. El grupo tratado con MNP presentó un ligero aumento del hierro en plasma y prácticamente no hubo diferencias significativas en el nivel de Hb al compararlo con el grupo anémico ($p < 0.05$). Por el contrario, la administración de MNP-bacteria repuso los niveles fisiológicos óptimos de hierro plasmático y Hb, lo mismo que ocurrió al administrar sulfato ferroso, el suplemento de hierro más comúnmente usado en la actualidad.

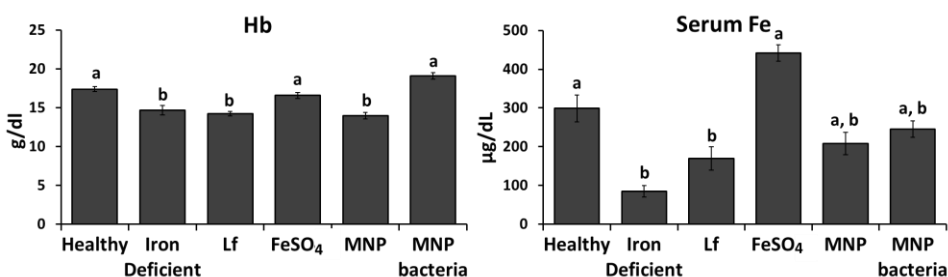


Figura 2. Valores de hierro en plasma y hemoglobina (Hb) en los seis grupos de animales: sanos, deficientes en hierro y tratados, de izquierda a derecha, con: *L. fermentum*, sulfato ferroso, MNP o MNP-bacteria. Barras de error, \pm sem (n=6). Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

2.3. Expresión de biomoléculas implicadas en la homeostasis del hierro.

El hierro ingresa en el intestino delgado principalmente como Fe (III), resultado de la oxidación de Fe (II) por los componentes del jugo gástrico del estómago. La proteína ferrirreductasa DcytB (Citocromo B Duodenal) está altamente expresada en los enterocitos duodenales y reduce Fe (III) a Fe (II). Tras la reducción, el Fe (II) atraviesa la membrana apical de los enterocitos mediante transportadores de metales divalentes, principalmente DMT1 (Transportador de Metales Divalentes-1). Un buen funcionamiento de este conjunto de proteínas es esencial para la absorción de hierro. La Figura 3 muestra los resultados del análisis de expresión génica de las proteínas DMT1 y DcytB en el intestino delgado de los diferentes grupos de animales. De acuerdo con sus funciones, la expresión de DcytB y DMT1 aumenta drásticamente en períodos de alta demanda corporal de hierro, como ocurre durante la anemia. La Figura 3 muestra que, de hecho, la expresión de DcytB y DMT1 aumentó en ratas anémicas con respecto a las del grupo control (ratas sanas). La administración de MNP-bacteria conduce a la restauración de los niveles saludables de ambas proteínas, lo que indica que la suplementación de hierro es efectiva. Sin embargo, la administración de sulfato de hierro o MNP no iguala los niveles de expresión de DcytB y DMT1 a los de las ratas sanas. Esto sugiere que la administración de sulfato de hierro o MNP, a esta dosis y en estas condiciones, no es eficiente a la hora de paliar la demanda de hierro causada por la anemia. Curiosamente, el efecto de la administración de MNP-bacteria sobre DcytB es similar al que se produce al administrar las bacterias probióticas sin nanopartículas de hierro (*L. fermentum*). Lo que concuerda con los hallazgos recientes, según los cuales algunos compuestos excretados por *L. fermentum* tienen actividad ferrirreductasa,³⁵ por lo que la bacteria probiótica podría hacer las funciones de DcytB y, por lo tanto, la expresión de esta proteína no aumenta en las ratas tratadas únicamente con *L. fermentum*.

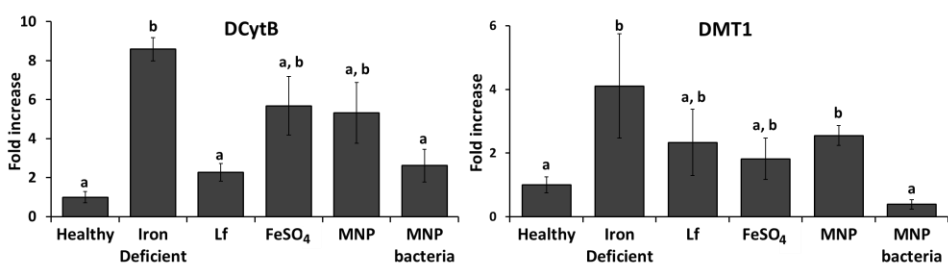


Figura 3. Expresión de mRNA de DcytB y DMT1 en el intestino delgado de los grupos de animales: sanos, deficientes en hierro y tratados, de izquierda a derecha, con: *L. fermentum*, sulfato ferroso, MNP o MNP-bacteria. Barras de error, \pm sem (n=6). Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, una vez dentro de los enterocitos, el Fe (II) es transportado al plasma por la proteína de membrana ferroportina, cuya actividad está regulada por la hormona hepcidina.³⁶ Esta hormona se expresa en el hígado y se encuentra sobreexpresada cuando las reservas de hierro hepático son altas e infraexpresada cuando decaen las reservas de hierro. Debido a que los niveles de hierro en el hígado son la referencia para la regulación del almacenamiento de hierro y por tanto para la absorción del mismo, la expresión de la hepcidina se correlaciona inversamente con la cantidad de hierro absorbido por el intestino. Del mismo modo, la disminución de la hepcidina se correlaciona con un aumento en la expresión duodenal de DcytB y DMT1.

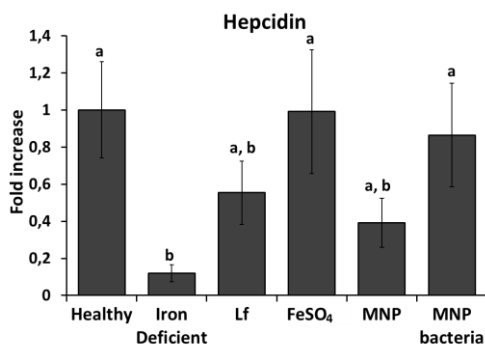


Figura 4. Expresión de mRNA de hepcidina en el hígado de los grupos de animales: sanos, deficientes en hierro y tratados, de izquierda a derecha, con: *L. fermentum*, sulfato ferroso, MNP o MNP-bacteria. Barras de error, \pm sem (n=6). Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En consonancia con lo anterior, la Figura 4 muestra cómo la expresión de hepcidina disminuye en ratas anémicas. Sin embargo, después de la administración de MNP-bacteria o sulfato de hierro los niveles de expresión de hepcidina aumentan con respecto a los de ratas anémicas, alcanzando valores correspondientes a los de ratas sanas. Algo que ocurre en menor medida en el caso de administrar MNP.

Tras el estudio magnético sobre la biodistribución, está claro que el tratamiento con MNP-bacteria permite la acumulación de nanopartículas de maghemita en regiones del intestino donde se produce la absorción de hierro. Además, el análisis colectivo de los parámetros sanguíneos y la expresión de mRNA de DcytB, DMT1 y hepcidina revela que MNP-bacteria es más efectivo para el tratamiento de la anemia, ya que restaura los niveles saludables de los parámetros sanguíneos y los niveles de expresión de las biomoléculas implicadas en la homeostasis del hierro. Lo que significa que la acumulación de nanopartículas de maghemita en el intestino parece un escenario ideal para garantizar una absorción de hierro adecuada. Sin embargo, no se puede inferir información de estos datos sobre el mecanismo por el cual la presencia de MNP-bacteria en el intestino asegura el paso de hierro a la sangre para remediar la anemia. Con el objetivo de explorar este mecanismo, realizamos un experimento de MRI *in vitro* y un estudio TEM para evaluar la internalización de nanopartículas de maghemita en la línea celular humana HT-29 tras su incubación con MNP o MNP- bacteria.

2.4. Internalización de nanopartículas de maghemita en enterocitos HT-29.

Comparamos el nivel de internalización de nanopartículas de maghemita en enterocitos HT-29 midiendo los tiempos de relajación transversal (T2) de los protones de agua tras incubar las células con MNP o MNP-bacteria. Después de la incubación durante 30 minutos, los pocillos se lavaron exhaustivamente con agua para eliminar cualquier material no internalizado en las células.

Como se evidencia en la Figura 5, la incubación de HT-29 con MNP-bacteria resultó en un fuerte efecto sobre la intensidad de señal de las imágenes de resonancia magnética ponderadas en T2. Por el contrario, MNP produjo un efecto insignificante, con valores de T2 cercanos a los de los controles, estos últimos sin material magnético (Figura 5). Los resultados evidencian la internalización de las nanopartículas de maghemita en los enterocitos solo en el caso de incubarlos con MNP-bacteria, lo que señala algún papel del probiótico para promover la internalización.

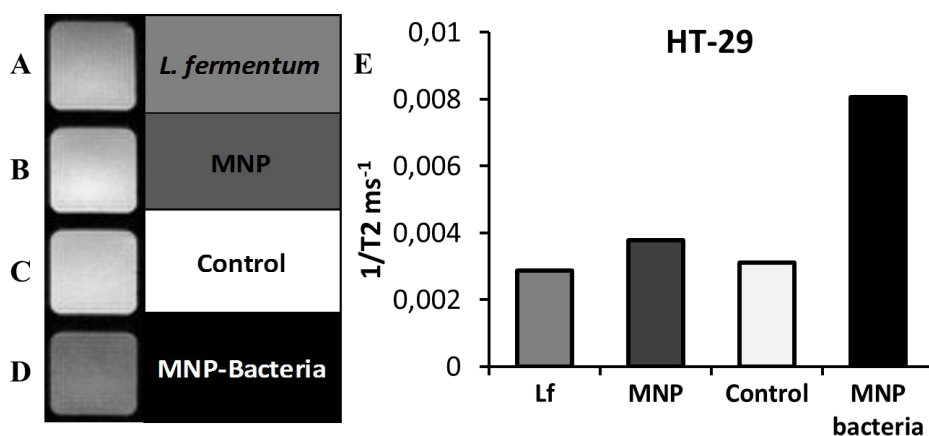


Figura 5. Imágenes de resonancia magnética ponderadas en T2 tras la incubación de los enterocitos (línea celular HT-29) con a) *L. fermentum*; b) MNP; c) células no tratadas (control) y d) MNP-bacteria. El contraste negativo (oscurecimiento) informa de la acumulación de material magnético en el interior celular. Los valores 1/T2 aparecen representados en (e).

Las imágenes TEM de las células HT-29 tratadas con MNP-bacteria mostraron inequívocamente la presencia de MNP-bacterias y nanopartículas de maghemita, localizadas intracelularmente en compartimentos endosomales / lisosomales (Figura 6). No se observó internalización de las nanopartículas de maghemita cuando las células se trataron con MNP. Estos datos dejan claro que el mecanismo de internalización de las nanopartículas de maghemita en el enterocito tiene lugar mediante la internalización de bacterias que portan nanopartículas (MNP-bacteria), lo que se observa claramente en la Figura 6 (flecha

blanca). La presencia de nanopartículas de maghemita en el interior celular sería consecuencia de la degradación de las MNP-bacterias en el interior del endosoma. Una vez liberadas de la bacteria, estas nanopartículas forman el gran agregado que muestra la Figura 6 (flecha negra).

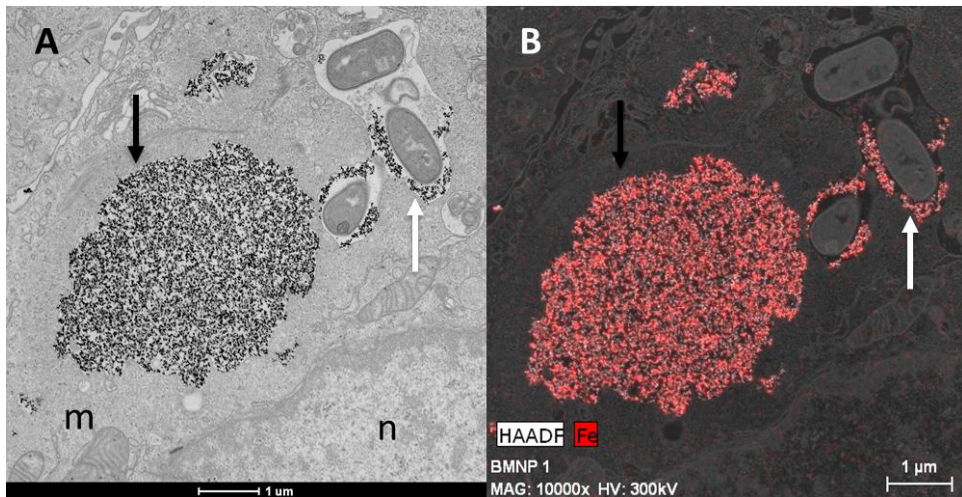


Figura 6. a) Típica micrografía TEM de una delgada sección de resina epoxi de la línea celular HT-29 incubada con MNP-bacteria donde se observa una gran acumulación de nanopartículas de maghemita (flecha negra) y MNP-bacteria (flecha blanca) en compartimentos endosomales/lisosomales de una célula HT-29 (m es una mitocondria y n el núcleo celular). b) Mapa composicional de EDX del hierro (rojo) presente en la imagen (a).

En este sentido, es interesante observar que en el trabajo previo reportado por Juillerat-Jeanneret *et al.*,³⁷ los autores concluyeron que nanopartículas de magnetita catiónicas del mismo tamaño que las utilizadas en el presente trabajo se internalizaron en células HT-29. Esta aparente contradicción se explica en términos de la existencia de un revestimiento de polivinilamina alrededor de las nanopartículas de magnetita, mientras que en nuestro trabajo usamos nanopartículas de maghemite sin recubrimiento (MNP).

3. Conclusiones.

El análisis conjunto de todos estos resultados confirma el papel crucial del revestimiento de nanopartículas para su internalización en enterocitos. En el presente trabajo, hemos utilizado un transportador vivo, la bacteria probiótica *L. fermentum*. Demostrando así que las nanopartículas de maghemita transportadas en esta bacteria probiótica (MNP- bacteria) tienen efectos positivos sensiblemente mejores sobre las ratas anémicas que los efectos producidos por las nanopartículas no recubiertas (MNP) o el suplemento estándar de sulfato de hierro. Estos resultados destacan el papel del probiótico como un eficiente portador oral de nanopartículas de maghemita, ya que permite superar el medio químico del estómago, conduciendo las nanopartículas de maghemita al intestino, donde se internalizan en enterocitos y aseguran la restauración de los parámetros sanguíneos saludables, mitigando por tanto la anemia por deficiencia en hierro.

4. Materiales y métodos.

4.1. Preparación de MNP y MNP-bacteria.

Las muestras de MNP y MNP-bacteria se prepararon siguiendo un protocolo previamente descrito.²⁹⁻³¹ Las nanopartículas de maghemita (MNP) fueron sintetizadas de acuerdo al método de Massart de coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) en una estequiometría 0.5.³⁸ El pH se ajustó a 11 con NaOH 3 M y la fuerza iónica con NaNO₃ 1 M, el tamaño medio de las nanopartículas de magnetita resultantes es de 10 nm. Tras la oxidación de la magnetita a maghemita con HClO₄ 1 M, se obtuvo un coloide de nanopartículas de maghemita estable a pH 2.

Para la preparación de la muestra de MNP-bacteria, un cultivo líquido de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 creció en un medio común, como MRS, a 37°C con agitación orbital durante 24 h. Las bacterias se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se lavaron con agua

destilada. Después, una solución ácida (pH 2) de MNP (66.6 μ L, 0.95 M) se añadió a las bacterias en un baño de hielo y se mezcló. La mezcla fue diluida con 1 mL de agua destilada. Las bacterias cargadas de nanopartículas de maghemita en superficie (MNP-bacteria) se recolectaron por centrifugación a 100 g durante 20 minutos.

La caracterización de las muestras de MNP y MNP-bacteria se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello gotas de cada una de las muestras se depositaron sobre rejillas de Cu recubiertas de carbono (200 mallas) específicas para TEM. Las rejillas se secaron con papel de filtro y, en el caso de la muestra MNP-bacteria, luego se tiñó con acetato de uranilo al 1% para visualizar la membrana de la bacteria. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio electrónico de análisis Philips CM-20 HR que funcionaba a 200 keV.

Para la caracterización por HAADF-STEM (microscopía electrónica de barrido), mapa EDX (energía dispersada de Rayos X), HRTEM (microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) y estudios de difracción electrónica, la muestra MNP-bacteria se incluyó en resina epoxi. Para ello, primero se procedió a la fijación de la muestra usando glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato sódico 0.1 M a 4°C durante 4 h. Tras la fijación, la muestra se lavó 3 veces en tampón cacodilato sódico 0.1 M durante 15 minutos. Se añadió tetróxido de osmio al 0.1% en tampón cacodilato sódico 0.1 M y se dejó reposar durante 1 h, para teñir las estructuras orgánicas. Se eliminó el exceso de tetróxido de osmio lavando la muestra por tres veces con tampón cacodilato sódico 0.1 M durante 15 minutos cada lavado. Luego, la deshidratación de la muestra se llevó a cabo a través de una serie de baños con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. Finalmente, la muestra se incluyó en resina epoxi, para lo que se dejó durante toda la noche a 4°C. Se obtuvieron los ultramicrocortes en un microtomo y se observaron en un microscopio FEI TITAN G2. Las imágenes de HRTEM y la difracción de electrones se obtuvieron utilizando el mismo microscopio.

4.2. Animales.

Este estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio” promulgada por el Instituto Nacional de Salud, y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada (España) (ref. nº CEEA-2010-286). Todos los estudios que incluyen la experimentación con animales se planifican de acuerdo con las directrices *ARRIVE* para la publicación de resultados derivados de estudios con animales.^{39,40,41}

Ratas Wistar macho (180-200 g) suministradas por *Janvier (St Berthevin Cedex, Francia)* se alojaron individualmente en jaulas de Makrolon y se mantuvieron en una atmósfera con aire acondicionado y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con acceso libre a agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos experimentales diferentes. Uno de ellos recibió solo la dieta estándar, mientras que el otro grupo fue alimentado con una dieta deficiente en hierro (TD.80396) proporcionada por *Harlan Laboratories (Madison, WI, EE. UU.)*. Se tomaron, semanalmente, muestras de sangre de la vena porta hepática para medir el contenido en hierro hasta la cuarta semana. En este momento, se había conseguido inducir la anemia por deficiencia en hierro y el grupo alimentado con la dieta deficiente en hierro se subdividió en 5 grupos. Tres grupos recibieron un suplemento de hierro (1 mg por día por animal) en forma de: solución de sulfato ferroso, suspensión de MNP o suspensión de MNP-bacteria respectivamente. Los dos grupos restantes fueron: el grupo anémico no tratado; y un grupo anémico tratado con *L. fermentum*. Todos los grupos fueron tratados diariamente mediante administración por sonda oral durante 23 días (Esquema 1). La ingesta de alimentos y agua se registró diariamente para todos los grupos (n = 6). El peso corporal de las ratas se midió dos veces por semana. No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales entre los grupos a lo largo del experimento.

4.3. Muestras biológicas.

Se tomaron muestras de sangre semanalmente de la vena porta hepática en un tubo heparinizado para realizar la analítica sanguínea. Después de 23 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y las diferentes partes del tracto gastrointestinal y el hígado fueron extraídos y pesados por separado. Para obtener el contenido luminal de los diferentes tejidos del tracto gastrointestinal: el intestino delgado, el ciego y el colon se vaciaron de su material luminal mediante lavados con suero fisiológico.

El material del lumen de intestino delgado, del ciego y del colon se congeló en nitrógeno líquido por separado, se liofilizó y se almacenó (-80°C). Finalmente, el lumen liofilizado de los diferentes tejidos se pulverizó y los polvos correspondientes se analizaron para su caracterización magnética.

4.4. Caracterización magnética del material luminal de los tejidos gastrointestinales.

El lumen de los diferentes tejidos del tracto gastrointestinal de los grupos tratados con MNP-bacteria y MNP, separados por grupo y tejido, se liofilizaron y los polvos correspondientes se colocaron en cápsulas de gelatina para la caracterización magnética. Las mediciones se realizaron en un magnetómetro Quantum Design MPMS-XL SQUID equipado con una opción de susceptibilidad magnética de CA (corriente alterna). Las medidas de susceptibilidad de CA se realizaron con una amplitud de corriente alterna de 0,41 Oe, en el rango de temperatura entre 10 y 300 K y con una frecuencia de 11 Hz.

4.5. Análisis de la expresión génica de DcytB, DMT1 y hepcidina.

La expresión de los marcadores de DcytB y de DMT1 se determinó en intestino delgado, y la expresión de hepcidina se determinó en hígado. El ARN total de las muestras de intestino delgado y de hígado se aisló

usando el kit TRI Reagent®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se midieron por medio de la relación de absorbancia a 260 y 280 en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nano Drop TM 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN (2 µg) utilizando cebadores oligo(dT) (Promega, Southampton, Reino Unido). Posteriormente, se tomaron 20 ng de ADN complementario para la amplificación y detección por PCR cuantitativa en tiempo real, la cual se llevó a cabo en placas de 48 pocillos empleando un sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) Con la mezcla maestra KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, EE. UU.) y cebadores específicos para cada gen (GAPDH: FW: CCATCACCATCTTCCAGGAG, RV: CCTGCTTACCACCTTCTTG; hepcidin: FW:CACAGCAGAACAGAAGGCATG, RV: CTTCTGCTGTAAATGCTGT; DMT1: FW: GTGTTGGATCCTGAAGAAAAGATTCC, RV: GGGATTTTTCATCAAAGTAGGTGGT; DCytB: FW: AGTGCAGCAAGTTCTTGATGAAAT, RV: CGTGGCAATCACTGTTCCAA). La expresión del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se midió para normalizar la expresión de ARN mensajero (mARN). La cuantificación relativa de mARN se calculó mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

4.6. Estadística.

Para el análisis estadístico se emplearon el software SPSS versión 20.0 (SPSS, Inc.) y GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Los datos se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias entre más de dos grupos se evaluaron usando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. Se establecieron diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

4.7. Línea celular HT-29.

Las células epiteliales humanas de adenocarcinoma colorrectal HT-29 fueron proporcionadas por el Centro de Instrumentación Científica (Universidad de Granada, España). La línea celular se cultivó adherida y se

mantuvo en medio McCoy 5a + glutamina 2 mM + piruvato de sodio 1 mM + 10% de suero bovino fetal (FBS) a 37 ° C en atmósfera al 5% de CO₂. Todos los experimentos se realizaron en placas de 12 pocillos. Las células se sembraron en las placas a una densidad de 5×10⁴ células por pocillo y se incubaron durante 48 h antes de los experimentos.

4.8. Estudio MRI *in vitro*.

Para los experimentos de MRI, las células HT-29 se trataron por separado con: MNP-bacterias (0,94 mM de Fe), MNP (0,94 mM de Fe) y *L. fermentum*. La placa se incubó a 37 ° C durante 30 minutos. Los pocillos se completaron hasta un volumen final de 2 mL con el medio de cultivo y se incluyó un pocillo blanco que contenía solo células. Tras la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con solución PBS 6,8. Finalmente, las células se tripsinizaron y se transfirieron a una placa de 12 pocillos adecuada para las medidas por MRI (©ibidi GmbH, Martinsried, Alemania). Los tiempos de relajación transversal, T₂, se midieron en un sistema Bruker Biospec de 9,4 T utilizando una secuencia de formación de imágenes CPMG de 128 ecos (Carl-Purcell-Meiboom-Gill) y los siguientes parámetros de adquisición: valores de TE de 7,5 ms a 960 ms, TR = 3000 ms, FOV = 6 cm, tamaño de matriz = 256x256, grosor de corte = 1 mm. Los valores T₂ se calcularon utilizando scripts automatizados escritos en IDL (Interactive Data Language, Research Systems Inc., Boulder, EE. UU.).

4.9. Estudio *in vitro* de la internalización de MNP-bacteria en enterocitos mediante TEM.

Después del mismo tratamiento que en el experimento de MRI, las células HT-29 se incluyeron en resina epoxi. La fijación se realizó mediante la adición de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio 0,1 M a 4°C durante 4 h. La muestra se lavó 3 veces en tampón cacodilato de sodio 0,1 M durante 15 minutos. Se añadió tetróxido de osmio al 0,1% en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y se dejó reposar durante 1 h. El tetróxido de osmio se lavó tres veces con tampón cacodilato de sodio 0,1 M durante 15 minutos cada lavado. Luego, la

deshidratación se llevó a cabo a través de una serie de etanol y óxido de propileno. Finalmente, la muestra se incrustó en resina epoxi y se dejó durante toda la noche a 4°C. Después de realizar ultramicrocortes, estos se observaron con un microscopio FEI TITAN G2.

5. Referencias.

- ¹ WHO, Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control, **2017**, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- ² M. Low, A. Farrell, B.A. Biggs, S.R. Pasricha, *Can. Med. Assoc. J.*, **2013**, 185, E791-E802.
- ³ M.E. Cogswell, A.C. Looker, C.M. Pfeiffer, J.D. Cook, D.A. Lacher, J.L. Beard, S.R. Lynch, L.M. Grummer-Strawn, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2009**, 89, 1334-1342.
- ⁴ G.A. Stevens, M.M. Finucane, L.M. De-Regil, C.J. Paciorek, S.R. Flaxman, F. Branca, J.P. Peña-Rosas, Z.A. Bhutta, M. Ezzati, *Lancet Glob. Health*, **2013**, 1, e16-25.
- ⁵ S.R. Pasricha, H. Drakesmith, J. Black, D. Hipgrave, B.A. Biggs, *Blood*, **2013**, 121, 2607-2617.
- ⁶ J.M. Powers, T.L. McCavit, G.R. Buchanan, *Pediatr. Blood Cancer*, **2015**, 62, 842-846.
- ⁷ R. Crichton, J.R. Boelaert, Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences, **2001**, John Wiley & Sons, New York, USA.
- ⁸ J. Fordy, D. Benton, *J. Hum. Nutr. Diet.*, **1994**, 7, 127-133.
- ⁹ M.E. Conrad, J.N. Umbreit, *Blood Cells Mol. Dis.*, **2002**, 29, 336-355.
- ¹⁰ INACG, WHO, UNICEF, Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia, eds. R.J. Stoltzfus and M.L. Dreyfuss, **1998**, ILSI Press, Washington, USA.
- ¹¹ L.H. Allen, *J. Nutr.*, **2002**, 132, 813S-819S.
- ¹² M. Alleyne, M.K. Horne, J.L. Miller, *Am. J. Med.*, **2008**, 121, 943-948.
- ¹³ A. Lopez, P. Cacoub, I.C. Macdougall, L. Peyrin-Biroulet, *Lancet*, **2016**, 387, 907-916.
- ¹⁴ G.M. Brittenham, Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload, in Hematology, 6th edn, eds. R. Hoffman, E. Benz, S. Shattil, B.

Furie, H. Cohen, L.E. Silberstein, P. McGlave, pp 437-449, Chapter 34, **2012**, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA.

¹⁵ E.C. Mimura, J.W. Breganó, J.B. Dichi, E.P. Gregório, I. Dichi, *Nutrition*, **2008**, 24, 663-668.

¹⁶ Z. Tolkien, L. Stecher, A.P. Mander, D.I.A. Pereira, J.J. Powell, *PLoS ONE*, **2015**, 10, e0117383.

¹⁷ R. Hurrell, I. Egli, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2010**, 91, 1461S-1467S.

¹⁸ D.I. Pereira, S.F. Bruggaber, N. Faria, L.K. Poots, M.A. Tagmount, M.F. Aslam, D.M. Frazer, C.D. Vulpe, G.J. Anderson, J.J. Powell, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2014**, 10, 1877-1886.

¹⁹ F.M. Hilty, A. Teleki, F. Krumeich, R. Büchel, R.F. Hurrell, S.E. Pratsinis, M.B. Zimmermann, *Nanotechnology*, **2009**, 20, 475101.

²⁰ M.A. Gastarena, A.G. Gil, A. Azqueta, M.P. Coronel, M. Gimeno, *Hum. Exp. Toxicol.*, **2003**, 22, 137-141.

²¹ N. Guldris, B. Argibay, J. Gallo, R. Iglesias-Rey, E. Carbó-Argibay, Y.V. Kolenko, F. Campos, T. Sobrino, L.M. Salonen, M. Bañobre-López, J. Castillo, J. Rivas, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, 28, 362-370.

²² M.R. Preiss, E. Cournoyer, K.L. Paquin, E.A. Vuono, K. Belanger, E. Walsh, N.G. Howlett, G.D. Bothun, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, 28, 2729-2736.

²³ F. Canfarotta, S.A. Piletsky, *Adv. Healthcare Mater.*, **2014**, 3, 160-175.

²⁴ V. Fernandes-Cardoso, A. Francesko, C. Ribeiro, M. Bañobre-López, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, *Adv. Healthcare Mater.*, **2018**, 7, 1700845.

²⁵ S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, *Toxicol. In Vitro*, **2005**, 19, 975-983.

²⁶ M. Mahmoudi, A. Simchi, A.S. Milani, P. Stroeve, *J. Colloid Interface Sci.*, **2009**, 336, 510-518.

²⁷ P. Guardia, A. Riedinger, H. Kakwere, F. Gazeau, T. Pellegrino, Magnetic Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Controlled Drug Delivery, in Bio- and Bioinspired Nanomaterials, eds. D. Ruiz-Molina, F. Novio, C. Roscini, pp 139-172, Chapter 6, **2014**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

²⁸ E.H. Morgan, P.S. Oates, *Blood Cells Mol. Dis.*, **2002**, 29, 384-399.

²⁹ M. Martín, F. Carmona, R. Cuesta, D. Rondón, N. Gálvez, J.M. Dominguez-Vera, *Adv. Funct. Mater.*, **2014**, 24, 3489-3493.

- ³⁰ M. Martín, A. Rodríguez-Nogales, V. Garcés, N. Gálvez, L. Gutiérrez, J. Gálvez, D. Rondón, M. Olivares, J.M. Dominguez-Vera, *Nanoscale*, **2016**, 8, 15041-15047.
- ³¹ M. Martín, V. Garcés, J.M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 95220-95226.
- ³² A. López, L. Gutiérrez, F.J. Lázaro, *Phys. Med. Biol.*, **2007**, 52, 5043-5046.
- ³³ L. Gutiérrez, M.P. Morales, F.J. Lázaro, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, 4456-4464.
- ³⁴ L. Gutiérrez, S. Romero, G.B. da Silva, R. Costo, M.D. Vargas, C.M. Ronconi, C.J. Serna, S. Veintemillas-Verdaguer, M.P. Morales, *Biomed. Tech.*, **2015**, 60, 417-425.
- ³⁵ A. González, N. Gálvez, J. Martín, F. Reyes, I. Pérez-Victoria, J.M. Dominguez-Vera, *Food Chem.*, **2017**, 228, 374-380.
- ³⁶ F. Dürrenberger, V. Abbate, Y. Ma, M.C. Arno, D. Jaiash, A. Parmar, V. Marshall, G.O. Latunde-Dada, T. Zimmermann, D. Senn, P. Altermatt, V. Manolova, R.C. Hider, S.S. Bansal, *Bioconjug. Chem.*, **2013**, 24, 1527-1532.
- ³⁷ B.H. Kenzaoui, M.R. Vilà, J.M. Miquel, F. Cengelli, L. Juillerat-Jeanneret, *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, 7, 1275-1286.
- ³⁸ R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, 1247-1248.
- ³⁹ J.C. McGrath, G.B. Drummond, E.M. McLachlan, C. Kilkenny, C.L. Wainwright, *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, 160, 1573-1576.
- ⁴⁰ L. Vayssieres, C. Chaneac, E. Tronc and J. P. Jolivet, *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, 205, 205-212.
- ⁴¹ C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson and D. G. Altman, *J. Pharmacol. Pharmacother.*, **2010**, 1, 94.

CAPÍTULO 4.
BACTERIAS MAGNETO-ÓPTICAS
ARTIFICIALES PARA APLICACIONES
BIOMÉDICAS.

1. Introducción.

La Nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en medicina.^{1,2} Esta novedosa área de investigación pretende explorar las ventajas del uso de nanopartículas en medicina, en lugar de compuestos químicos discretos tradicionales. Diagnóstico precoz, alta especificidad, no toxicidad y multifuncionalidad, son algunos de los términos que perfilan los retos en un futuro a corto-medio plazo y marcan el camino a seguir en esta área. La nanomedicina tiene por objetivo suministrar métodos más novedosos y mejorados de terapia y diagnosis haciendo uso de la nanoquímica³ y el mundo en expansión de la nanotecnología.⁴

En este contexto, la nanopartícula se puede visualizar como un soporte donde pueden combinarse distintas especies activas para diferentes fines o bien para llevar a cabo una acción sinérgica frente a un único problema. Asimismo, la incorporación de las nanopartículas sobre plataformas biocompatibles para su administración, puede alterar de forma favorable su mecanismo de actuación, pudiendo incrementarse su acumulación o especificidad en un tejido, ralentizar su metabolización y aumentar su resistencia a cambios fisiológicos, como el pH variable del cuerpo.⁵

Una de las mayores aspiraciones de la nanomedicina reside en el desarrollo de agentes teranósticos⁴ que combinan la función del diagnóstico y la terapia en la misma nanoformulación. Estos nanodispositivos traen consigo la idea de permitir monitorizar en tiempo real su acción terapéutica. El desarrollo de agentes teranósticos para la acción de ver-tratar-ver es muy atractivo, ya que evitan que el paciente tenga que esperar la evaluación posterior al tratamiento para determinar el resultado de este.⁶

El diagnóstico precoz y el tratamiento efectivo de dos afecciones gastrointestinales despierta especial interés por su prevalencia mundial y los pronósticos poco alentadores para el futuro. Estas dos afecciones son:

el conjunto denominado enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, *inflammatory bowel disease*) y el cáncer colorrectal.

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es el término genérico para un grupo de enfermedades gastrointestinales crónicas recurrentes que incluyen la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.^{7,8} El sello distintivo de la IBD es la inflamación crónica y descontrolada de la mucosa intestinal,⁹ que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal.

Mientras que la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se consideran afecciones distintas, pueden compartir muchos síntomas y manifestaciones clínicas, y ambas se caracterizan por ciclos de inflamación de la mucosa recidivantes y remitentes. En el caso de la colitis ulcerosa, esta inflamación se limita al colon, se extiende proximalmente desde el recto y es continua, en algunos casos afecta al colon completo (pancolitis). La inflamación de Crohn puede afectar cualquier región del tracto gastrointestinal, con el íleon terminal y el colon comúnmente afectados,¹⁰ y en este caso la inflamación es generalmente discontinua en la forma. Aunque la causa exacta de la IBD no está definida, se han sugerido ciertos factores que pueden desempeñar un papel importante en su desarrollo, como la genética, el microbioma, el estrés ambiental y la disfunción inmune.¹¹ Actualmente no hay cura para la IBD, y las estrategias terapéuticas van dirigidas a alcanzar y mantener la remisión de los episodios inflamatorios, siendo la primera opción el tratamiento por vía oral.

El éxito de las terapias para la IBD está determinado por la biodisponibilidad del fármaco en el colon, para lo que es clave desarrollar formulaciones capaces de alcanzar y liberar el fármaco específicamente en dicho órgano. La reducción del tamaño del fármaco, o de su *carrier*, a escala nanométrica puede mejorar su tiempo de permanencia en las regiones inflamadas del colon, mejorando así su acción (Figura 1). Esta mejora en la retención de nanofármacos es consecuencia de dos

condiciones que aparecen en la IBD. Por un lado, la mayor permeabilidad epitelial en las zonas inflamadas,^{12,13} donde las células inmunes se concentran y pueden captar más fácilmente partículas de tamaño nanométrico, que se acumulan en la región de inflamación.¹⁴ Por otro lado, en el tracto gastrointestinal las nanopartículas experimentan normalmente un proceso de internalización celular, ya sea por transporte paracelular o por endocitosis de las células epiteliales intestinales.¹⁵ En el caso de padecer IBD, son las células M, asociadas al tejido inmune del intestino, las más involucradas en la absorción de nanopartículas por transcitosis, siendo estas células las que más contribuyen a su acumulación (Figura 1).^{16,17,18}

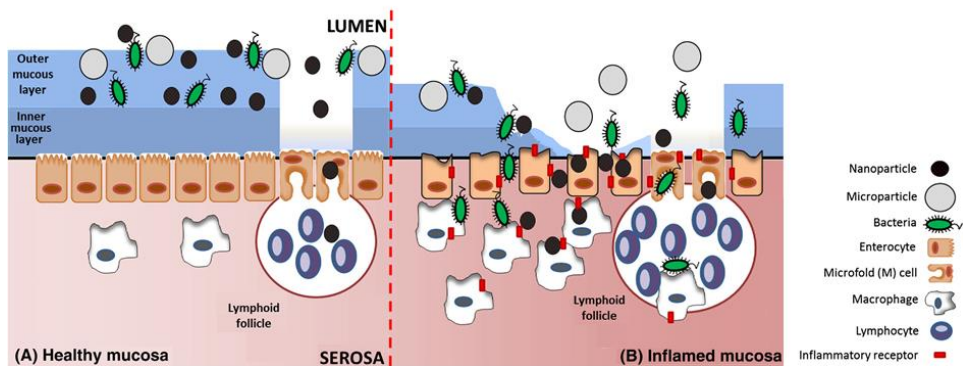


Figura 1. Diferencias en la retención de nanopartículas entre mucosa intestinal sana (A), y la mucosa inflamada típica de las IBDs. La acumulación de nanopartículas se ve favorecida en las regiones inflamadas de la mucosa intestinal tanto por la pérdida de la integridad del epitelio, como por la mayor presencia de células inmunes que pueden captar las partículas nanométricas.¹⁰

Otra afección gastrointestinal que reclama el interés de los investigadores es el cáncer colorrectal (CRC, *colorectal cancer*). El CRC es un grave problema de salud pública que presenta la tercera incidencia más alta entre todas las afecciones que afectan a la población de países desarrollados y en vías de desarrollo.¹⁹ Este cáncer es una de las razones principales del incremento de la morbilidad y la muerte en países occidentales.²⁰ Se manifiesta como una neoplasia maligna en la mucosa del colon o el recto,^{21,22} que se origina principalmente en el revestimiento

del intestino y puede migrar hacia la pared intestinal y las capas musculares de debajo del intestino si no se trata apropiadamente.²³ Generalmente, el CRC se desarrolla debido a los hábitos de vida y al aumento de la edad, y son pocos los casos en los que los trastornos genéticos fundamentales son la base.^{24,25} Existe una elevada variabilidad entre los tumores en este tipo de cáncer, debido a la alta heterogeneidad celular por diversas alteraciones genéticas y biológicas.²⁶ Esto último, dificulta la selección y la especificidad de los tratamientos.

La cirugía es el tratamiento más común para el CRC y a menudo se denomina resección quirúrgica. Esto supone una primera línea de defensa contra cualquier tipo de cáncer, especialmente si el tumor está bien definido.^{27,28} La extirpación quirúrgica suele combinarse con quimioterapia y radioterapia, con los consecuentes efectos secundarios que estas terapias producen en el paciente.²⁹ Aunque en los últimos años, varios tipos de nanopartículas en el rango de tamaño de 20-400 nm, cargadas con fármacos, han sido empleadas para la administración de quimioterápicos.³⁰ Los avances se han centrado sobre todo en el tratamiento de los cánceres de próstata,³¹ ovario,³² mama³³ y pulmón.³⁴ Mientras que, en el caso del CRC el desarrollo clínico de nanopartículas para tratarlo es limitado, a pesar de las cifras de mortalidad y morbilidad de este tipo de cáncer.

Comprometidos en mejorar el panorama actual referente al diagnóstico y tratamiento de estas dos patologías intestinales y siguiendo el camino marcado por nuestro trabajo previo, recogido en los capítulos anteriores, sabemos que los probióticos *Lactobacillus fermentum* superan vivos el medio digestivo y proliferan, colonizando la mucosa gástrica por adhesión al epitelio y permaneciendo de forma prolongada en el mismo. Por tanto, se trata de *carriers* ideales para hacer llegar nanopartículas funcionales al intestino. El hecho de que se adhieran a la mucosa intestinal portando nanopartículas facilita la obtención de imágenes que delineen la morfología del aparato digestivo, una situación ideal para el diagnóstico de IBD.³⁵ Además este tipo de bacterias poseen en sí

propiedades terapéuticas que pueden ser muy beneficiosas tras su acción de diagnóstico. Concretamente, *Lactobacillus fermentum*, debido a su carácter anaeróbico facultativo, tienen preferencia por anidar en el interior de tumores sólidos, donde debido al crecimiento descontrolado de las células tumorales, la concentración de O₂ es reducida.^{36,37} Una vez en el interior del tumor sólido podrían proliferar de forma óptima dificultando así el crecimiento del tumor. Además se han reportado propiedades anticancerígenas en esta especie.^{38,39} Por todo ello, estas bacterias probióticas pueden ser empleadas en tratamientos de tumores digestivos como ayuda de fármacos anticancerígenos estándar.

Con el objetivo de generar nuevos nanodispositivos útiles en nanomedicina, en este capítulo pretendemos combinar las propiedades magnéticas de nanopartículas de maghemita (MNP) con las propiedades ópticas de nanopartículas de oro (AuNPs), empleando las bacterias probióticas *Lactobacillus fermentum* como plataforma sobre la que se lleva a cabo esta combinación. Así, aprovechando la capacidad de *L. fermentum*, de adherir en su superficie nanopartículas metálicas (Ver Capítulos 2 y 3) hemos llevado a cabo la preparación de una batería de bacterias revestidas de nanopartículas de óxido de hierro y de nanopartículas de oro de diferente morfología (*rods* y *prismas*).

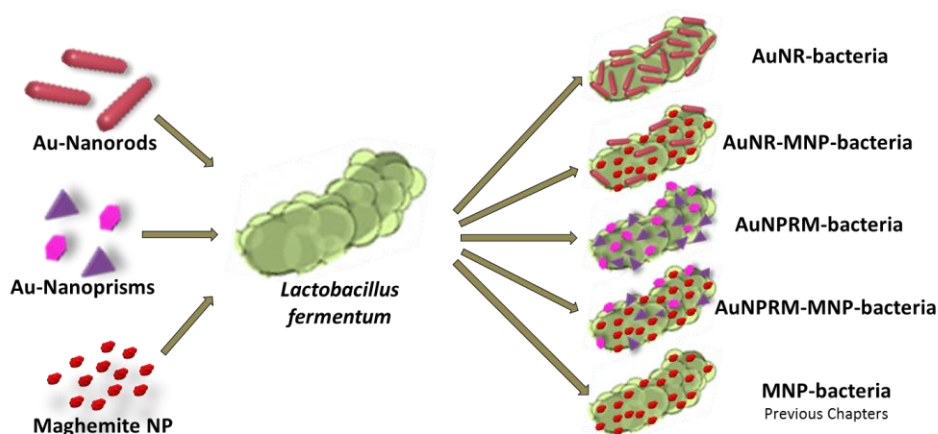
Generar bacterias rodeadas de nanopartículas metálicas supone disponer de *carriers*, de administración oral, con las propiedades de las nanopartículas que portan. Así que hemos evaluado la capacidad de *L. fermentum* rodeada de nanopartículas de maghemita (MNP-bacteria) para su uso como agente de contraste para resonancia magnética (MRI), solventando los inconvenientes del empleo de su *alter ego* natural, las bacterias magnetotácticas (ver Capítulo 1). Por otro lado, debíamos evaluar si las bacterias cubiertas de nanopartículas de oro (AuNPs) podrían emplearse para el tratamiento de ablación de tumores por hipertermia óptica. Además, de estudiar si el hecho de combinar ambos tipos de nanopartículas sobre la superficie de los probióticos supondría

disponer de un sistema útil para las dos aplicaciones de manera simultánea.

Para todo ello, hemos realizado un completo análisis que incluye un estudio mediante MRI para evaluar la eficacia de MNP-bacteria como agente de contraste para esta prueba diagnóstica, así como estudiado la eficacia de este sistema como agente hipertérmico para la ablación de tumores por hipertermia magnética. Además de esto, llevamos a cabo una caracterización mediante microscopía electrónica, que incluye TEM, HRTEM, HAADF-STEM y microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*), de las bacterias que incorporan la mezcla de AuNPs y de MNP. De estas últimas, también se ha evaluado su capacidad de generación de calor al ser expuestas a un láser infrarrojo, para determinar su posible utilidad en hipertermia óptica contra cáncer. Además de un estudio de hipertermia magnética para probar la generación de calor de estos sistemas heterobimetálicas AuNPs-MNP-bacteria al ser expuestos a la acción de un campo magnético alterno (AC) y evaluar su potencial uso en el tratamiento contra el cáncer mediante dicha terapia, comparando este potencial con el del sistema MNP-bacteria mencionado anteriormente.

2. Resultados y discusión.

Mediante la adición, individual o de forma combinada, de MNP y AuNPs a un cultivo bacteriano de *Lactobacillus fermentum*, hemos creado la batería de bacterias, con diferentes tipos de nanopartículas, que recoge el Esquema 1. En el caso de las AuNPs, se emplearon dos morfologías diferentes: *nanorods* (AuNRs) y *nanoprismas* (AuNPRMs), que se añadieron al cultivo de forma independiente o en combinación con MNP (ver Materiales y Métodos).



Esquema 1. Representación de la adición de diferentes tipos de nanopartículas metálicas sobre la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum*, para dar como resultado una batería de bacterias portando: *nanorods* de oro (AuNR-bacteria); *nanorods* y nanopartículas de maghemita (AuNR-MNP-bacteria); nanoprismas de oro (AuNPRM-bacteria); nanoprismas y nanopartículas de maghemita (AuNPRM-MNP-bacteria); y nanopartículas de maghemita únicamente (MNP-bacteria), representadas en este orden de arriba abajo a la derecha del esquema.

2.1.MNP-bacteria como agente de contraste MRI.

Para tomar imágenes MRI del intestino, administramos, a ratones, MNP-bacteria incorporadas en un hidrogel con un 98% de agua, que puede favorecer la conservación de las bacterias y facilita la administración directa a los animales. Seis ratones fueron analizados a través de MRI. Las imágenes se adquirieron 1 h después de la administración de MNP-bacteria, mediante sonda gástrica. Los ratones solo se alimentaron de un hidrogel nutriente 72 h antes de la administración de MNP-bacteria, para asegurar la limpieza del intestino y evitar artefactos durante la medida. La concentración óptima (ver sección Materiales y Métodos) fue el resultado de varios ensayos previos. En la Figura 2 se muestra la secuencia de imágenes de MRI ponderadas en T2. Se trata de planos axiales del animal a 1 mm de distancia desde la cabeza a la cola. Después de 1 h de haber administrado MNP-bacteria, pudimos observar que este agente de contraste se había diseminado a través de todo el intestino. La acumulación de MNP-bacteria a lo largo de todo el tracto gastrointestinal provoca el acortamiento de los tiempos de

relajación transversal de los tejidos en los que se encuentra, lo que se traduce en un descenso de señal, es decir contraste negativo, en secuencias ponderadas en T2, como la utilizada en esta imagen. De ahí el oscurecimiento de los tejidos de todo el tracto digestivo donde se encuentra MNP-bacteria (flechas blancas).

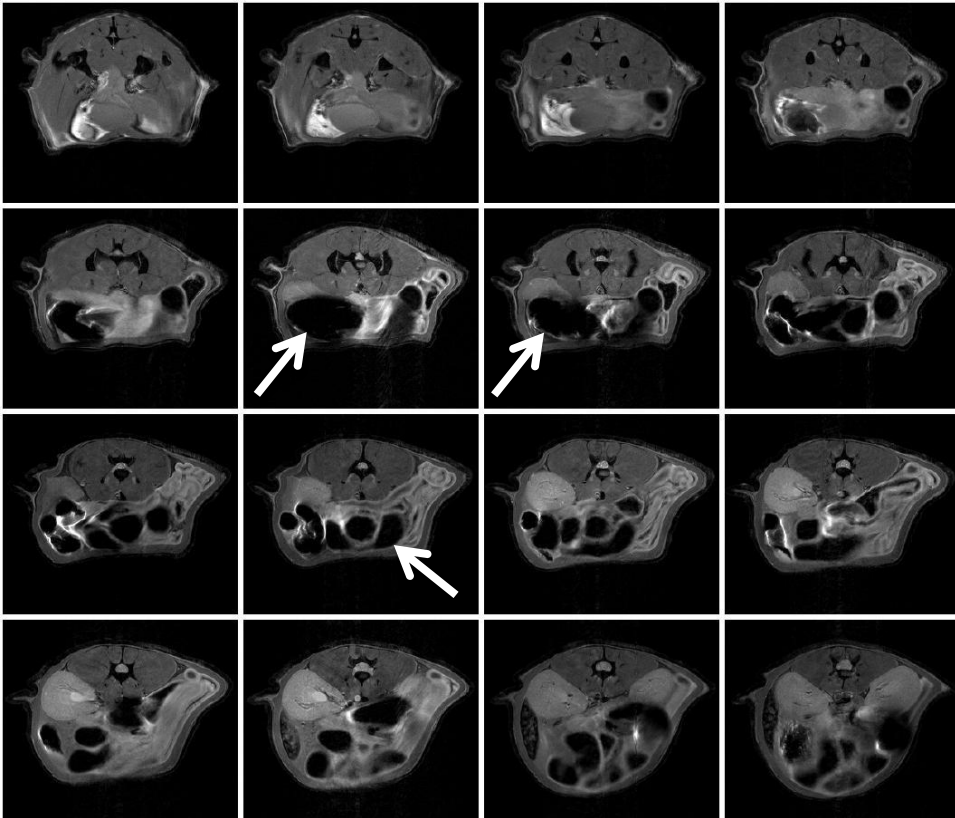


Figura 2. Secuencia de imágenes MRI ponderadas en T2 de planos axiales de un ratón desde la cabeza a la cola, siguiendo el orden de izquierda a derecha y de arriba abajo. El agente de contraste MNP-bacteria se distribuye por todo el aparato digestivo del ratón provocando el acortamiento de los tiempos de relajación transversal de los tejidos en los que se encuentra, lo que se traduce en un oscurecimiento de estos (flechas blancas).

En el equipo de MRI los ratones se colocaron en posición decúbito prono y la Figura 3 recoge una secuencia de imágenes que corresponden a planos coronales tomados a 1 mm de distancia, desde la parte dorsal a la ventral, después de 1h de la administración de MNP-bacteria. Es

evidente el oscurecimiento de los tejidos digestivos donde se localiza el agente de contraste T2 que estamos probando (flecha blanca).

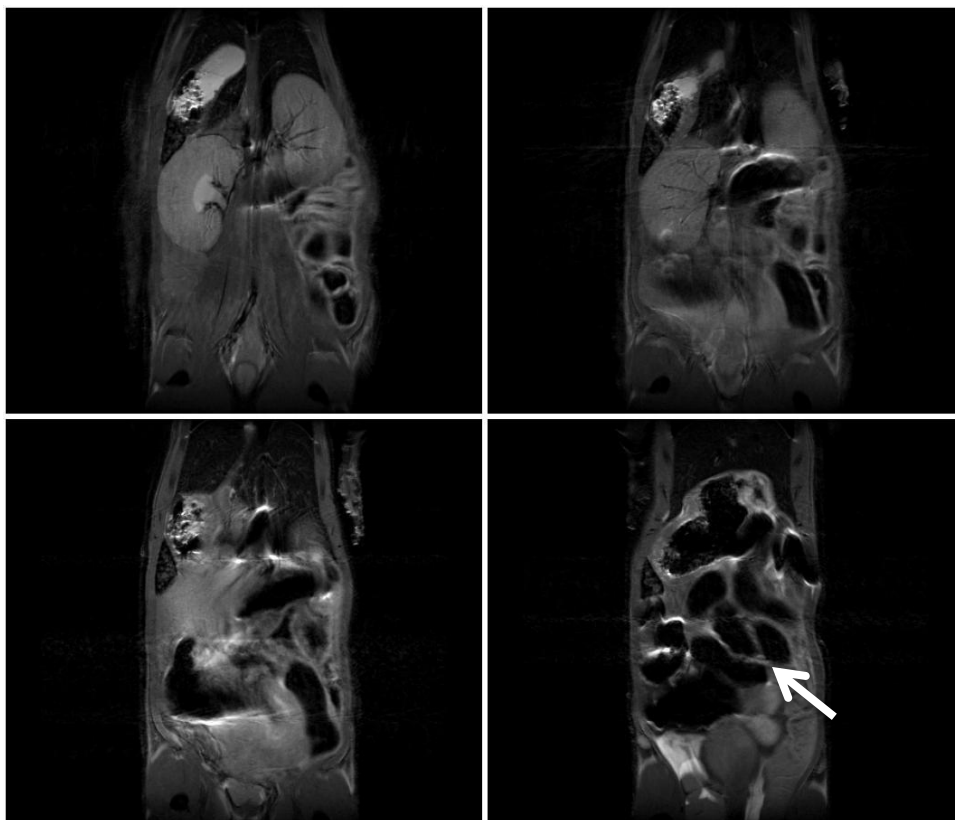


Figura 3. Secuencia de imágenes MRI ponderadas en T2 de planos coronales del ratón desde la zona dorsal a la zona ventral, ordenados de izquierda a derecha y de arriba abajo. La flecha blanca indica la presencia de MNP-bacteria en el intestino del animal, lo que contrasta la imagen con contraste negativo.

Estos resultados preliminares son positivos aunque se requiere un mayor número de ensayos y poder ser capaces de diferenciar rigurosamente las señales procedentes de las nanopartículas magnéticas

y del oxígeno, uno de los grandes inconvenientes en la MRI del aparato digestivo.

2.2. AuNPRM-bacteria para hipertermia óptica.

En una segunda etapa, probamos incorporar AuNPRMs a los probióticos (Figura 4).

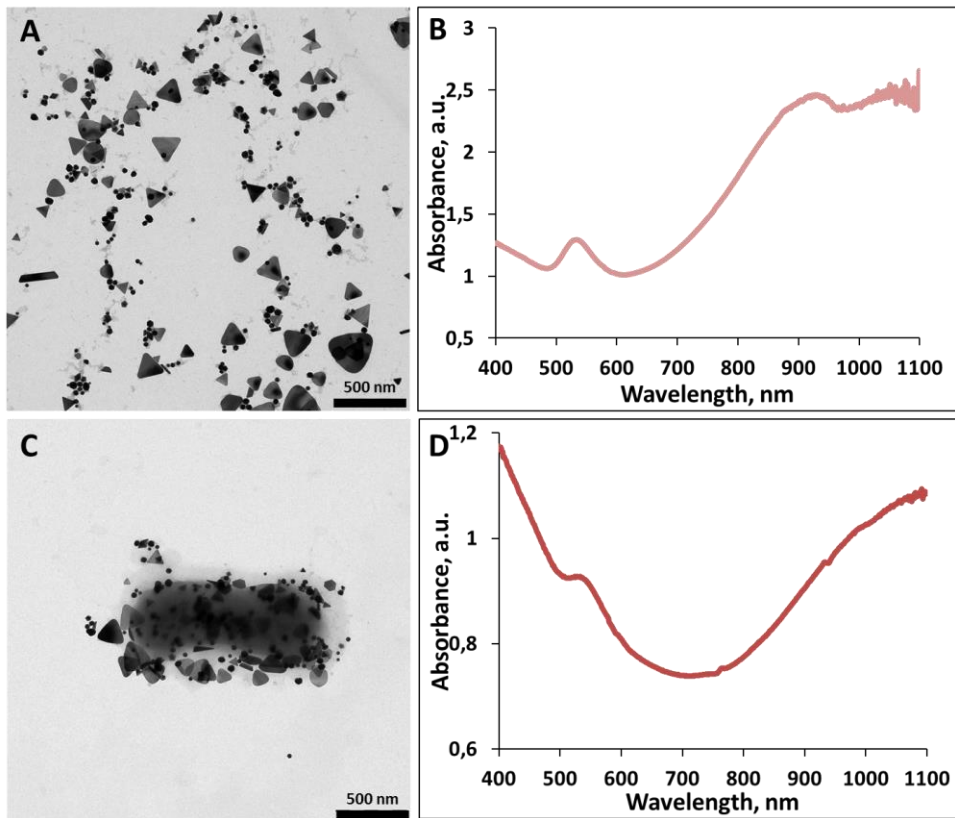


Figura 4. Imágenes TEM de A) AuNPRMs aislados y C) la muestra AuNPRM-bacterias, en la que pueden apreciarse las nanopartículas rodeando y adheridas a la superficie bacteriana. A la derecha de las imágenes se muestran los espectros de absorción UV-visible de cada una de las muestras B) AuNPRMs aislados y D) AuNPRM-bacterias. En el último se aprecia el desplazamiento de la segunda banda SPR hacia una λ mayor.

Tras incubar *Lactobacillus fermentum* con AuNPRs, llevamos a cabo una caracterización del sistema. Como se muestra en la Figura 4, por el espectro UV-visible de la mezcla AuNPRM-bacteria se puede deducir que

la morfología de las nanopartículas se mantiene y no existe un efecto de degradación de los nanoprismas al incorporarlos a las bacterias, aunque aparecen ciertas diferencias entre los espectros de los AuNPRMs aislados y la mezcla AuNPRM-bacteria. De tal modo que, la banda SPR situada en torno a 950 nm que presentan los AuNPRMs aislados, se desplaza a una λ aún mayor en el caso en el que los AuNPRMs están adheridos a la superficie bacteriana (Figura 4). Este hecho se debe al efecto de agregación de las nanopartículas que tiene lugar sobre la bacteria, el cual se confirmó mediante un estudio TEM de la muestra, que se presenta también en la Figura 4. Este fenómeno de desplazamiento de la banda SPR a λ mayores, debido a la agregación de las nanopartículas, es conocido y es de hecho una de las estrategias utilizadas para hacer que una de las absorciones SPR ocurra a menores energías. La importancia de este desplazamiento es crucial para la aplicaciones biomédicas que requieren internalización en el cuerpo de las nanopartículas de oro, puesto que solo a energías bajas es posible atravesar la piel y sangre y alcanzar el tejido donde se acumulan dichas nanopartículas.^{40,41}

Decidimos hacer uso de otras técnicas de microscopía electrónica para profundizar aún más en el conocimiento del sistema AuNPRMs-bacteria. La Figura 5 recoge los resultados obtenidos del análisis de la muestra mediante SEM.

Los resultados que obtuvimos mediante HRTEM, HAADF-STEM (*High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy*) y EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) se recogen en la Figura 6. Todas las imágenes de microscopía electrónica confirmaron inequívocamente la adhesión de AuNPRMs sobre la superficie del probiótico *L.fermentum*. La interacción electrostática entre la superficie de los AuNPRMs y los exopolisacáridos (EPS), que forman la matriz del biofilm de la bacteria probiótica, es la responsable de este fenómeno de adhesión superficial de los AuNPRMs. Dicha interacción también justifica el efecto de agregación de los AuNPRMs y el desplazamiento de su banda SPR característica a λ mayores, una vez adheridos a la superficie del

probiótico. Los análisis químicos mediante EDX confirmaron nuevamente la presencia de los AuNPRMs acumulados alrededor de las bacterias (Figura 6).

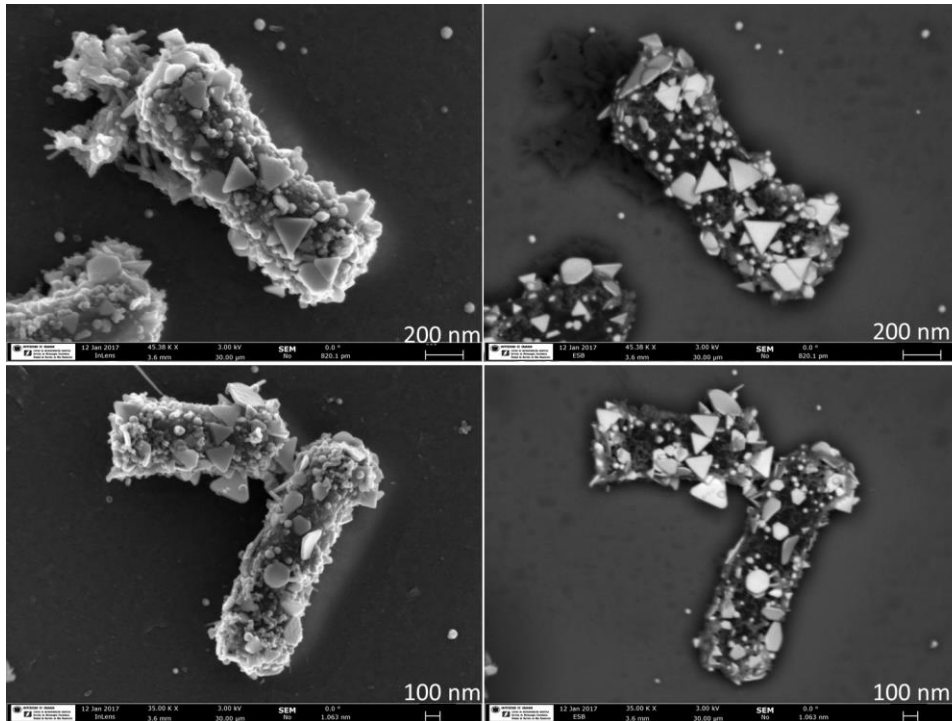


Figura 5. Imágenes SEM de AuNPRM-bacteria (izquierda) y sus correspondientes imágenes STEM con contraste por número atómico (derecha). El relieve de los prismas es distinguible. La especificidad de las nanopartículas por la superficie bacteriana es muy alta, encontrándose muy pocas nanopartículas libres en el medio.

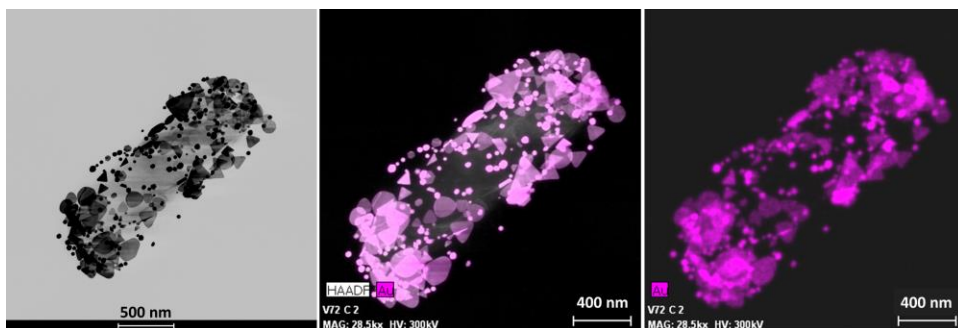


Figura 6. Imágenes HRTEM (izquierda), HAADF-STEM (centro) y análisis químico por EDX (derecha) de la muestra AuNPRM-bacteria. El oro aparece en rosa.

Tras la caracterización de la muestra AuNPRM-bacteria, llevamos a cabo un estudio para analizar su curva de calentamiento y evaluar su potencial uso para el tratamiento de tumores por hipertermia óptica. Así que, con el fin de analizar la generación de calor se irradió la muestra diluida en agua milliQ, durante 5 minutos con un láser a una λ de 1064 nm (NIR), cercano a la banda SPR de menor energía, y se registró la temperatura durante este tiempo. Los resultados los presentamos en la Figura 7.

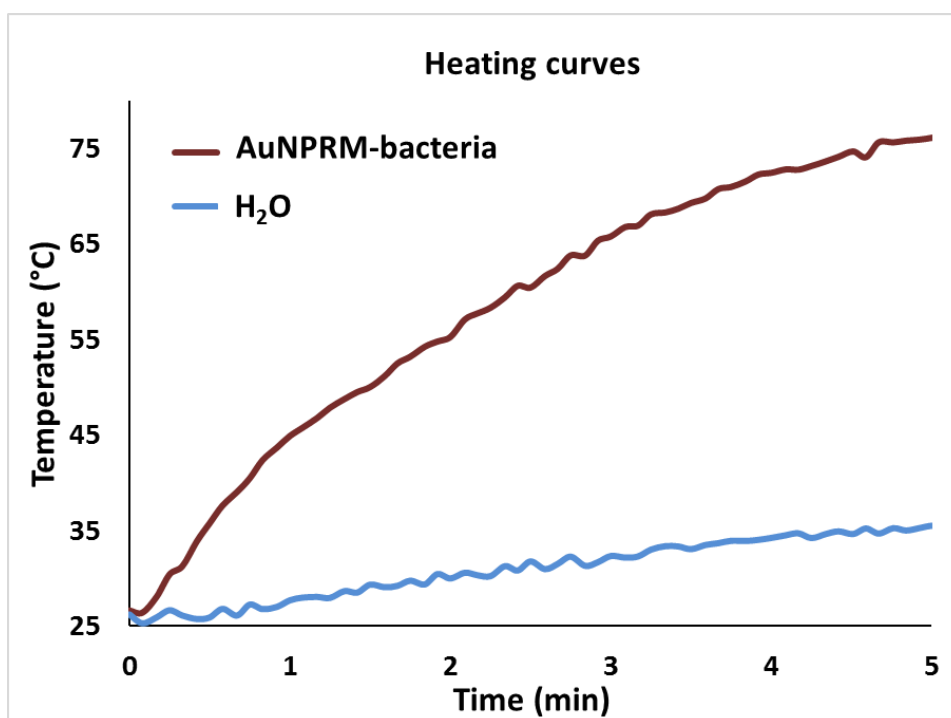


Figura 7. Curvas de calentamiento de la muestra AuNPRM-bacteria (roja) y de agua (azul). La elevación de temperatura resultado de la irradiación de la muestra AuNPRM-bacteria con un láser a 1064 nm es mucho mayor que la provocada por el agua. AuNPRM-bacteria incrementa la temperatura 50 °C tras 5 min de exposición al láser NIR.

Como se puede ver en el gráfico, la muestra AuNPRM-bacteria produjo un aumento de la temperatura muy considerable al compararlo con el agua que se empleó como control, alcanzando los 75 °C tras 5 min de exposición al láser, lo que supone un incremento de la temperatura de 50 °C en este tiempo. Esto pone de manifiesto las interesantes propiedades de este nuevo sistema, AuNPRMs-bacteria de cara a ser utilizados como agentes en hipertermia para el tratamiento de tumores sólidos digestivos por irradiación.

Ya que por su metabolismo el probiótico anida preferentemente en el centro de tumores sólidos, debido al ambiente pobre en O₂, una vez allí la irradiación con un láser en el NIR alcanzaría al sistema AuNPRMs-bacteria, calentándolo y provocando un efecto nocivo en las células tumorales circundantes.

El siguiente paso era intentar desarrollar un sistema mixto que incorporase tanto MNP como AuNPRMs, así que siguiendo el protocolo de adición de nanopartículas que hemos empleado en este y en los anteriores capítulos, incorporamos una mezcla de MNP y AuNPRMS sobre un cultivo bacteriano de *Lactobacillus fermentum*.

Las imágenes TEM de la muestra AuNPRM-MNP-bacteria que obtuvimos se muestran en la Figura 8, donde de nuevo se observa como los dos tipos de nanopartículas se asocian a la superficie bacteriana quedando embebidas en ella. Los resultados de TEM, HAADF-STEM y el análisis químico por EDX certifican la creación de bacterias probióticas que portan al mismo tiempo nanopartículas magnéticas (MNP) y nanopartículas con propiedades ópticas (AuNPRMs), con lo que adquieren las propiedades de las nanopartículas que portan.

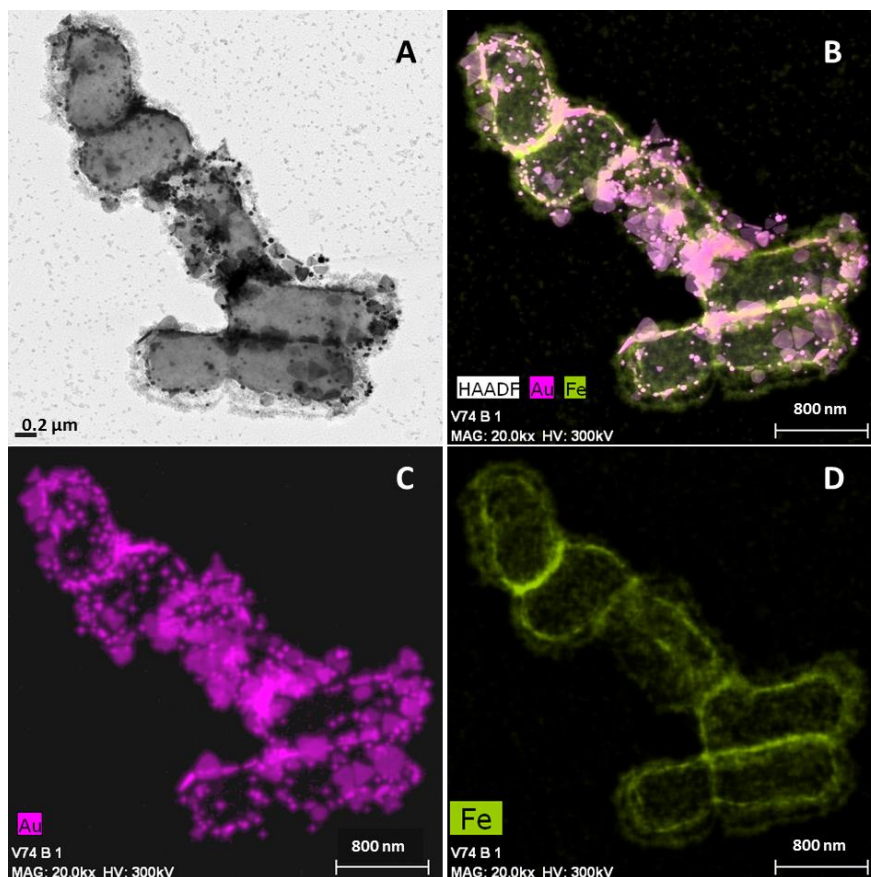


Figura 8. Imágenes TEM (A) de AuNPRM-MNP-bacteria, HAADF-STEM con los análisis EDX de oro (rosa) y hierro (verde) (B), y los análisis mediante EDX de oro (C) y hierro (D) de la misma muestra.

2.3. AuNR-MNP-bacteria, el probiótico magneto-óptico para hipertermia magneto-óptica.

En esta sección nos ocupa el estudio y la caracterización del sistema originado al añadir AuNRs y MNP a un cultivo de *L. fermentum*. En primer lugar, comprobamos la adhesión exitosa de AuNRs sobre la superficie bacteriana (Figura 9). El estudio de TEM confirmó la interacción entre las nanopartículas y las bacterias, lo cual también apoyó el análisis químico de la muestra por EDX, haciendo uso de HAADF-STEM.

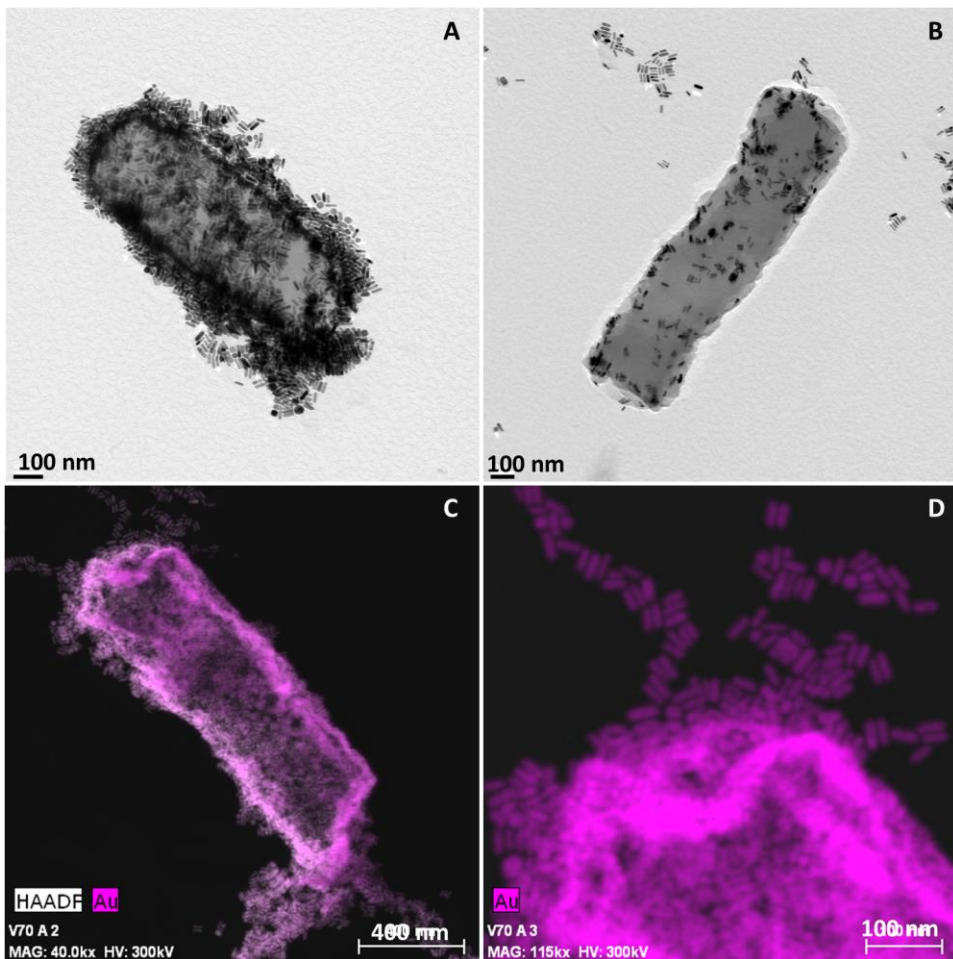


Figura 9. Imágenes TEM de AuNR-bacteria (A y B). Imagen HAADF-STEM con el mapa EDX de oro (rosa) (C) y una sección ampliada de C con la distribución por EDX del oro (rosa) (D).

Al añadir una mezcla de AuNRs y MNP al cultivo bacteriano observamos que se producía la adhesión a la superficie bacteriana de ambos tipos de nanopartículas (Figura 10). Antes de esto, analizamos el espectro de absorbancia UV-visible de la muestra AuNR-MNP-bacteria, y al compararlo con el espectro de los AuNRs aislados, comprobamos que en la muestra AuNR-MNP-bacteria la posición de la segunda banda SPR, del espectro, se encontraba a una λ mayor (920 nm) que en los AuNRs aislados (850 nm). La deposición de AuNRs, junto con MNP, sobre la

superficie de *L.fermentum* da lugar a un fenómeno de agregación de las nanopartículas que se traduce en el desplazamiento de esta banda SPR a una λ mayor en la muestra AuNR-MNP-bacteria (Figura 10).^{40,41}

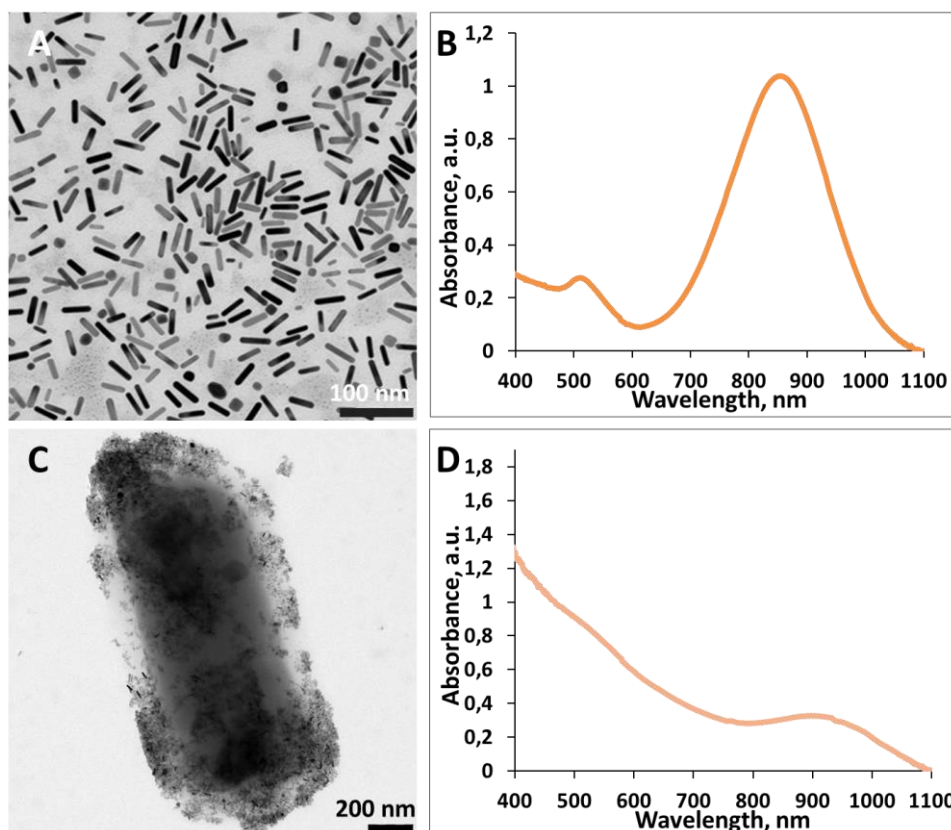


Figura 10. Imágenes TEM de A) AuNRs aislados y C) la muestra AuNR-MNP-bacterias, a la derecha de las imágenes se muestran los espectros de absorción UV-visible de cada una de las muestras B) AuNRs aislados y D) AuNR-MNP-bacterias, en este último es visible el desplazamiento de la segunda banda SPR hacia una mayor λ , en torno a 920 nm, respecto a la posición de esta banda en el caso de los AuNRs aislados que se sitúa a 850 nm.

Como en el caso de la muestra de la sección anterior (AuNPRM-bacteria), evaluamos la capacidad de generación de calor de las muestras AuNR-bacteria y AuNR-MNP-bacteria, al ser irradiados con un láser infrarrojo, para probar su potencial uso como agentes fototérmicos para hipertermia óptica de tumores. Como se muestra en la Figura 11, tras 5

minutos de irradiación de las dos muestras, AuNR-MNP-bacteria provoca un mayor aumento de la temperatura alcanzando los 72 °C tras 5 min de exposición al láser, lo que supone un incremento de la temperatura de 47 °C en este tiempo. Mientras que el incremento de la temperatura provocado por la muestra AuNR-bacteria no alcanzó los 20 °C.

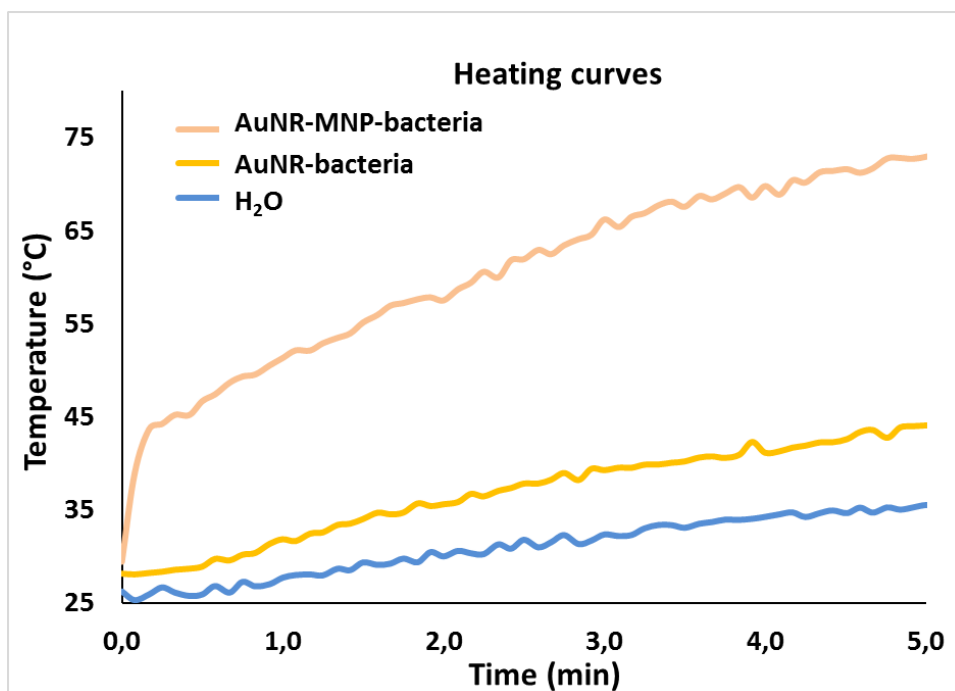


Figura 11. Curvas de calentamiento de la muestra AuNR-MNP-bacteria (salmón), AuNR-bacteria (amarillo) y de agua (azul). Es mayor incremento de la temperatura tiene lugar al irradiar la muestra AuNR-MNP-bacteria.

Esto creemos está justificado por el mayor efecto de agregación de los AuNRs en la muestra AuNR-MNP-bacteria, que en AuNR-bacteria. Un análisis más profundo de las muestras mediante TEM, reveló un menor grado de agregación de los AuNRs en la muestra AuNR-bacteria, con una menor cantidad de bacterias recubiertas en su totalidad por AuNRs y una distribución más heterogénea de las nanopartículas sobre la superficie bacteriana en esta muestra (Figura 12). Mientras que, en el caso de la muestra AuNR-MNP-bacteria, la distribución de los AuNRs en las

bacterias es muy homogénea y el efecto de agregación de estas nanopartículas está demostrado tanto por TEM como por espectroscopía UV-visible (Figura 10).

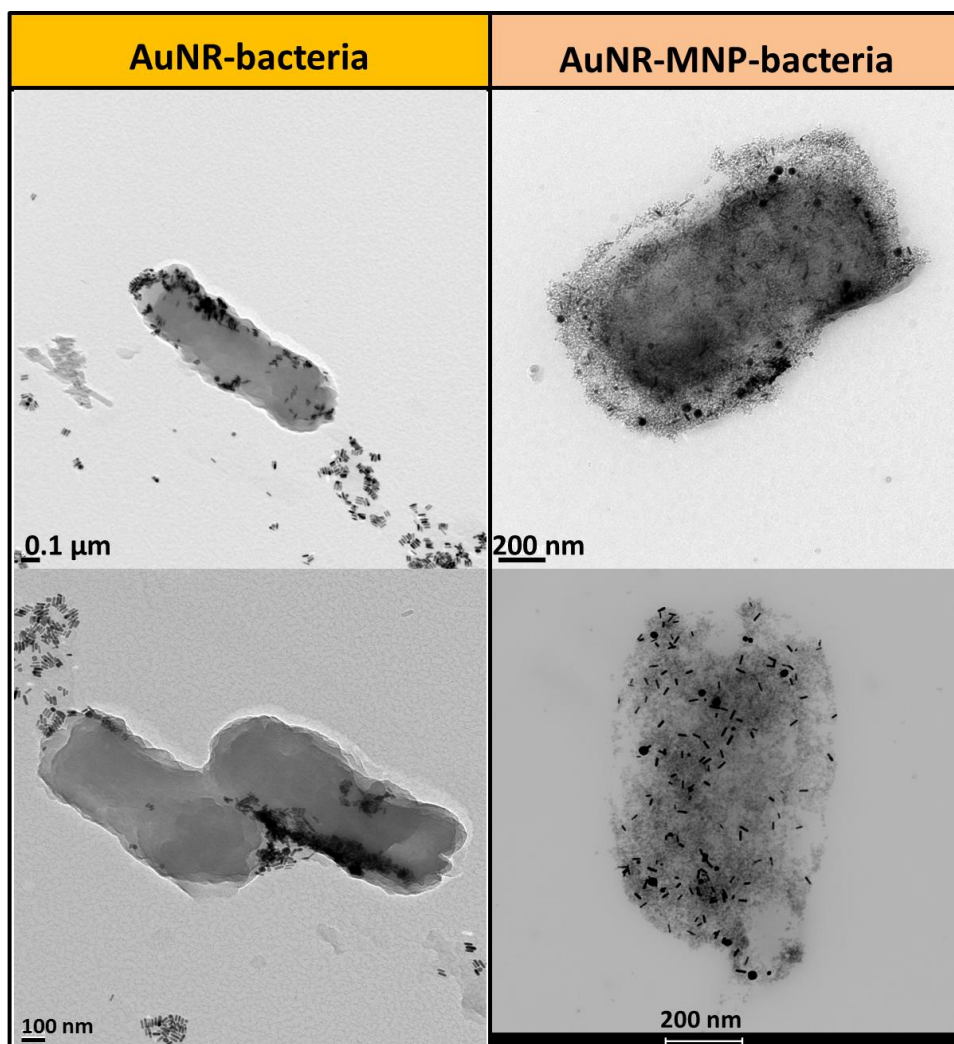


Figura 12. Imágenes TEM de AuNR-bacteria (derecha) y AuNR-MNP-bacteria (izquierda), donde se aprecian los diferentes patrones de distribución, adhesión y agregación de los AuNRs sobre la superficie bacteriana en las dos muestras. La gran mayoría de las bacterias en la muestra AuNR-bacteria presentaban pocos *nanorods* en superficie.

Las nanopartículas de maghemita pueden tener algún papel en la agregación de los AuNRs antes de la adhesión a la superficie bacteriana, envolviendo a los AuNRs y facilitando su incorporación a la bacteria. Como consecuencia de esto, en la muestra AuNR-MNP-bacteria, los AuNRs agregan más, se produce un desplazamiento en la segunda banda SPR de estos a una mayor λ , lo que mejora la absorción de la luz del láser en el NIR. Este incremento en la absorción de energía provoca que el incremento de la temperatura sea más rápido y efectivo en esta muestra que en AuNR-bacteria.

Por último, el análisis químico por EDX corroboró la presencia de hierro y oro en la superficie de las bacterias (Figura 13).

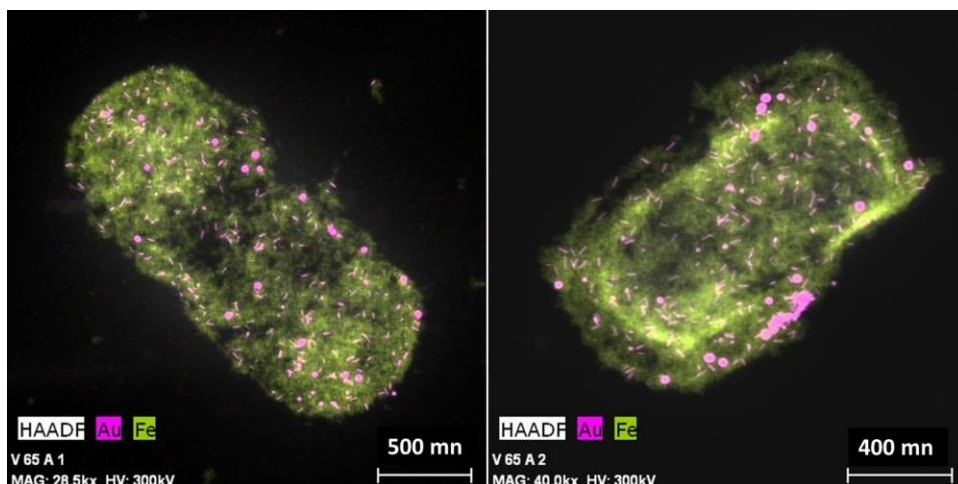


Figura 13. Imágenes HAADF-STEM con los mapas EDX de oro (rosa) y hierro (verde) de dos bacterias de la muestra AuNR-MNP-bacteria.

Las MNP, de óxido de hierro, y los AuNRs, que aportan el oro, se encuentran recubriendo toda la superficie bacteriana en un conglomerado que promueve la agregación de los AuNRs, mejorando sus propiedades ópticas y en consecuencia su capacidad de generar calor al ser irradiado por un láser infrarrojo.

Para comprobar la utilidad de la muestra AuNR-MNP-bacteria como un agente para hipertermia combinada (hipertermia óptica-hipertermia

magnética) hemos llevado a cabo la medida de su tasa de absorción específica (SAR, *Specific Absorption Rate*) al aplicar un campo magnético alterno, una medida que es crucial para determinar el potencial para hipertermia magnética de una muestra. La SAR se corresponde con la cantidad de energía/potencia absorbida por unidad de masa de la muestra,^{42,43} y en un sistema adiabático puede definirse como la cantidad de energía convertida en calor por unidad de tiempo y masa de la muestra.⁴⁴ Este parámetro es dependiente de la frecuencia e intensidad del campo magnético aplicado, así como del tamaño, la forma, la composición, el grado de aglomeración y el medio de dispersión de las nanopartículas.

Hemos comparado el valor de SAR del sistema heterobimetálico AuNR-MNP-bacteria con el del sistema MNP-bacteria. Con la intención de evaluar, en primer lugar, la capacidad de ambos sistemas como agentes para hipertermia magnética, y en segundo lugar, para determinar qué sistema es más efectivo para hipertermia magnética.

Para llevar a cabo las medidas de SAR, las muestras se diluyeron en agua. En el caso de coloides de nanopartículas dispersas en un medio fluido, la tasa de absorción específica se obtiene experimentalmente mediante la siguiente fórmula.⁴⁵

$$SAR = \frac{\rho_{H_2O} C_{pH_2O}}{m_{Fe_2O_3}} \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Hemos aplicado esta ecuación para determinar el SAR de nuestras suspensiones bacterianas cargadas de nanopartículas (AuNR-MNP-bacteria y MNP-bacteria). Donde ρ_{H_2O} y C_{pH_2O} , son la densidad (1000 g/L) y la capacidad calorífica (4,186 J/g K) del agua, $m_{Fe_2O_3}$ es la concentración de nanopartículas expresada en g/L y (dT/dt) la pendiente de la curva de temperatura vs tiempo. La amplitud del campo (H) y la frecuencia (f) para estas medidas se establecieron en 252 Gauss y 825 KHz respectivamente.

Los resultados que obtuvimos tras las medidas se presentan en la Figura 14.

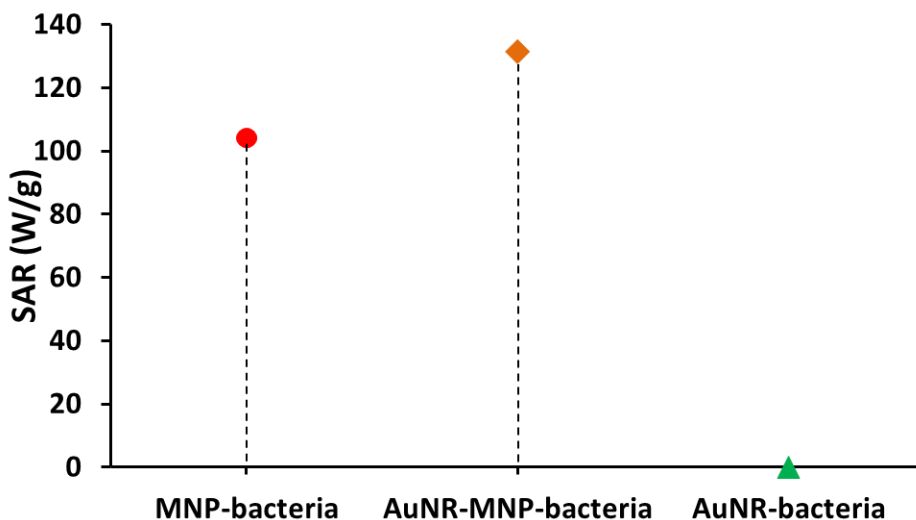


Figura 14. Representación de los valores de SAR en W/g de las muestras: MNP-bacteria (círculo rojo), AuNR-MNP-bacteria (rombo naranja) y AuNR-bacterias (triángulo verde). La mayor tasa de absorción específica la presenta la muestra AuNR-MNP-bacteria, lo que la sitúa como la mejor candidata para su aplicación en hipertermia magnética. Pues es la muestra que mayor potencia absorbe por unidad de masa, y por tanto la que más calienta.

Del gráfico podemos determinar que el valor más alto de SAR lo presenta la muestra AuNR-MNP-bacteria, alcanzado los 131.4 W/g. Valor que para la muestra MNP-bacteria fue 102.4 W/g. Estos valores se traducen en un incremento de la temperatura por unidad de tiempo de 0.062 °C/s y 0.03 °C/s para las muestras AuNR-MNP-bacteria y MNP-bacteria respectivamente al aplicarles el campo magnético alternado. Se realizó la medida de la muestra AuNR-bacteria como control sin nanopartículas magnéticas, y como era de esperar el valor para SAR fue 0. Esta última muestra no contiene MNP que le confiera propiedades magnéticas al sistema. Los resultados concuerdan con los valores observados en bibliografía para este tipo de nanopartículas magnéticas (MNP),^{46,47} con la diferencia de que la mayoría de estudios se llevan a

cabo con coloides de MNP aisladas en un fluido, y no con MNP adheridas a la superficie bacteriana como ocurre en nuestro estudio.

Estos resultados ponen de manifiesto que la muestra AuNR-MNP-bacteria absorbe más energía y genera más calor que MNP-bacteria, al exponer ambas muestras a la acción del mismo campo magnético alterno (AC). Por tanto, este sistema cuenta con potencial para su aplicación para hipertermia magnética de tumores. Lo cual, junto con los resultados previos obtenidos, sitúa este sistema mixto AuNR-MNP como una agente para la aplicación simultánea o combinada de ambos tipos de terapia por hipertermia, óptica y magnética. El probiótico conferiría al sistema la capacidad de superar el ambiente estomacal fuertemente ácido, y alcanzar el intestino donde poder ejercer las funciones mencionadas.

3. Conclusiones.

Hemos demostrado la posible aplicación de MNP-bacteria como agente de contraste para MRI. Observando el contraste negativo que produce al distribuirse y depositarse en el tejido intestinal de ratones. Resultados preliminares que creemos, es necesario profundizar en ellos y así optimizar este sistema para su uso en MRI.

De la batería de bacterias cargadas de nanopartículas metálicas que hemos creado, la muestra que solo porta AuNPRMs ha demostrado tener potencial para su uso como agente fototérmico para hipertermia óptica. Algo que comparte la muestra AuNR-MNP-bacteria, cuyo potencial para esta terapia también se ha demostrado. Con esta última muestra identificamos la posibilidad de incorporar los dos tipos de nanopartículas, MNP y AuNP, simultáneamente sobre la bacteria *L. fermentum* y por tanto, la posibilidad de combinar sus aplicaciones. Así hemos demostrado que el sistema AuNR-MNP-bacteria puede ser útil para ambos tipos de terapia por hipertermia óptica y magnética.

Todos estos resultados nos animan a continuar, en el futuro, profundizando en esta línea de investigación y desarrollar ensayos clínicos con modelos animales de CRC e IBDs. Sobre los que probar la efectividad terapéutica y diagnóstica de la batería de bacterias que hemos desarrollado.

4. Materiales y métodos.

4.1. Síntesis de MNP.

Las nanopartículas de maghemita (MNP) fueron sintetizadas de acuerdo al método de Massart de coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) en una estequiometría 0.5.⁴⁸ El pH se ajustó a 11 con NaOH 3 M y la fuerza iónica con NaNO₃ 1 M, el tamaño medio de las nanopartículas de magnetita resultantes es de 10 nm. Tras la oxidación de la magnetita a maghemita con HClO₄ 1 M, se obtuvo un coloide de nanopartículas de maghemita estable a pH 2.

4.2. Síntesis de AuNPs.

4.2.1. Síntesis de AuNRs.

Para la síntesis de *nanorods* de oro, se llevó a cabo un método mediado por semilla.⁴⁹

En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones, a temperatura ambiente: HAuCl₄ 1 mM, AgNO₃ 8 mM, Ácido Ascórbico 78.8 mM y NaBH₄ 10 mM. Esta última solución fue congelada tras su preparación.

Paralelamente, se prepararon disoluciones de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 0.2 M, (11-mercaptoundecil)-N, N,N-bromuro de trimetilamonio 92 mM, en agitación a 50 °C. Una vez preparadas, se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Todas ellas fueron elaboradas en agua Mili-Q ultrapure.

Para la síntesis de las semillas, se mezclaron 5 ml de CTAB 0.2 M, 2.5 ml de HAuCl_4 1 mM y 0.6 ml de la disolución fría de NaBH_4 10 mM. Esta mezcla se mantuvo a 25 °C, en agitación, durante 2 minutos. Cuando las semillas estuvieron formadas, el color de la mezcla cambió desde amarillo a un tono amarronado.

Para la síntesis de los *nanorods* se añadieron 5 ml de la disolución de CTAB 0.2 M en un matraz previamente colocado en un baño de aceite a 30°C, bajo agitación a 180 rpm. Posteriormente, se añadieron 5 ml de HAuCl_4 1mM, 70 uL de Ácido Ascórbico 78.8 mM y 100 μl de AgNO_3 8 mM, en este orden a la disolución de CTAB. La mezcla se completó con 160 μl de la disolución de semillas de oro y se mantuvo en agitación, a 30°C, durante 48 horas.

Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de CTAB, debido a su actividad antibacteriana,⁵⁰ y los *nanorods* se colectaron por centrifugación a 13000g durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, los *nanorods* se disolvieron en 1 ml de agua Mili-Q ultrapura y 1 ml de (11-mercaptoundecil)-N, N, N-bromuro de trimetilamonio 92 mM. De nuevo, se colectaron los *nanorods* por centrifugación a 13000g durante 10 minutos, resuspendiendo el sedimento en 1 ml de agua Mili-Q ultrapura.

4.2.2. Síntesis de AuNPRMs.

Se mezclaron 100 μl de HAuCl_4 2 mM y 120 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM (disolución fría), ambas disoluciones preparadas en agua Mili-Q ultrapura. Después de 9 minutos en agitación a 15 °C para la formación de las semillas, se añadieron otros 50 ml de la disolución fría de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM. La mezcla se mantuvo durante toda la noche en agitación a 15°C.⁵¹

4.3. Adhesión de las nanopartículas a la superficie de *Lactobacillus fermentum*.

4.3.1. Adhesión de MNP a la superficie bacteriana.

Para la preparación de la muestra de MNP-bacteria, un cultivo de *Lactobacillus fermentum* suministradas por la empresa Biosearch S.A., creció en un medio sintético, a 37°C con agitación orbital durante 24 h. El medio de crecimiento sintético está formado por (g L⁻¹): Na₂HPO₄ - 5.0; KH₂PO₄ - 6.0; citrato de triamonio - 2.0; sacarosa - 50.0; MgSO₄ - 1.0; y 10 ml de una solución de elementos traza (que consta de (g L⁻¹): MnSO₄ - 2,0, CoCl₂ - 1,0 y ZnCl₂ - 1,0 disueltos en solución de HCl 0,1 N). Se ajustó el pH inicial del medio a 6,7 y se esterilizó a 121 °C. Tras las 24 h de crecimiento, las bacterias se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Después, una solución ácida (pH 2) de MNP se añadió a las bacterias en un baño de hielo y se mezcló. La mezcla fue diluida con 1 ml de agua destilada. Las bacterias *L.fermentum* cargadas de nanopartículas de maghemita en superficie (MNP-beacteria) se recolectaron por centrifugación a 100 g durante 20 minutos.

La caracterización de MNP-bacteria se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello una gota de la muestra se depositó sobre una rejillas de Cu recubiertas de carbono (200 mallas) específicas para TEM. La rejilla se secó con papel de filtro. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio electrónico de análisis Philips CM-20 HR que funcionaba a 200 keV. Para la caracterización por HAADF-STEM (microscopía electrónica de barrido), mapa EDX (energía dispersada de Rayos X) y HRTEM (microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) la rejilla se observó en un microscopio FEI TITAN G2.

4.3.2. Adhesión de AuNPs a la superficie bacteriana.

Se procedió de la misma manera que en el caso de la incorporación de MNP al cultivo del *Lactobacillus fermentum*. Un cultivo inicial del probiótico creció en medio de cultivo a 37 °C 24 h. Este cultivo se

centrifugó a 3000g durante 10 minutos, al pellet de bacterias se le añadieron 2ml de un coloide con cada una de las morfologías de AuNPs, previamente sintetizadas: AuNRs y AuNPRMs. En el caso de TEM, la caracterización de las muestras se llevó de igual manera que MNP-bacteria. Además, estas muestras se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-visible.

Para la caracterización por SEM de la muestra AuNPRM-bacteria es necesario deshidratar y secar la muestra, además de darle un recubrimiento metálico que haga que la muestra sea conductora y disperse los electrones del haz incidente. Para ello, primero se procedió a la fijación de la muestra usando glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato sódico 0.1 M a 4°C durante 4 h. Tras la fijación, la muestra se lavó 3 veces en tampón cacodilato sódico 0.1 M durante 15 minutos. Luego, la deshidratación de la muestra se llevó a cabo a través de una serie de baños con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. La muestra se depositó en un portamuestras de SEM sobre una superficie de sílice y el proceso de secado se llevó a cabo en una unidad de punto crítico para SEM POLARON CPD 7501. El metalizado de la muestra se llevó a cabo de una unidad de evaporación con carbón HITACHI. La preparación de las muestras para SEM se realizó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

4.3.3. Adhesión simultánea de MNP y AuNPs sobre *Lactobacillus fermentum*.

Para incorporar ambos tipos de nanopartículas, MNP y AuNPs, sobre la superficie bacteriana, en primer lugar mezclamos los dos tipos de nanopartículas y tras homogeneizar la mezcla mediante agitación, se la añadimos al cultivo de bacterias siguiendo el mismo protocolo que el apartado 3.3.2. de este capítulo.

Para ver la preparación de las muestras para TEM volver al apartado 3.3.1. de este capítulo.

4.4. MRI.

El estudio MRI se ha llevado a cabo de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio” promulgada por el Instituto Nacional de Salud, y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada (España) (ref. nº CEEA-2010-286). Todos los estudios que incluyen la experimentación con animales se planifican de acuerdo con las directrices *ARRIVE* para la publicación de resultados derivados de estudios con animales.^{52, 53, 54}

Seis ratones macho fueron alimentados con un hidrogel nutriente, 98% de agua, durante 72h antes de administrar el agente de contraste. MNP-bacteria fue administrado a los animales mediante sonda gástrica a una concentración 20 mM en hierro. Después de una hora, los animales se sedaron y los tiempos de relajación transversal, T2, se midieron en un sistema Bruker Biospec de 9,4 T utilizando una secuencia de formación de imágenes CPMG de 128 ecos (Carl-Purcell-Meiboom-Gill) y los siguientes parámetros de adquisición: valores de TE de 7,5 ms a 960 ms, TR = 3000 ms, FOV = 6 cm, tamaño de matriz = 256x256, grosor de corte = 1 mm. Los valores T2 se calcularon utilizando scripts automatizados escritos en IDL (Interactive Data Language, Research Systems Inc., Boulder, EE. UU.).

4.5. Obtención de las curvas de calentamiento.

Para analizar la producción de calor de las muestras y obtener sus curvas de calentamiento, se diluyeron en agua milliQ hasta que la absorbancia a 1064 nm fue de 0,58 DO/ml. Tras esto, 300 µl de cada muestra se depositaron en pocillos en una placa de 96 pocillos. Cada muestra se irradió durante 5 minutos mientras se registraba la temperatura de la muestra para comparar el calentamiento de cada una. La irradiación se realizó usando un láser de 3 W de 1064 nm a una potencia de salida de 1200 mW sobre la muestra.

4.6. Hipertermia magnética.

Las medidas de hipertermia magnética a la frecuencia (f) de 825 kHz y a la intensidad de campo (H) de 20,12 kA m⁻¹ se llevaron a cabo en un equipo

comercial (DM100, nB Nanoscale Biomagnetics, Zaragoza, España). Se determinó primero la concentración de las muestras diluidas, estableciéndose en 1.97 g/L para AuNR-MNP-bacteria y 1.29 g/L para MNP-bacteria. Las medidas para SAR se realizaron con un generador de señal (señal de entrada de 7,2 Vpp) conectado a un amplificador lineal HAS 4014. La inductancia fue proporcionada por un circuito magnético con ferritas MnZn con un hueco de 13 mm. La muestra se insertó en cubetas de plástico colocadas en el hueco de la ferrita y se usó una segunda cubeta que contenía H₂O como referencia para medir el calor producido por el núcleo de la ferrita. Las temperaturas de la muestra y de la cubeta de referencia se midieron con un sensor de temperatura de GaAs (Neoptix Reflex, Ville de Québec, QC, Canadá) sumergido en la muestra y conectado a fibras ópticas T1 con una precisión de temperatura de $\pm 0,2$ K (tasa de adquisición de 1 Hz). El valor de SAR (W/g) se calculó posteriormente mediante la Ecuación 1. Los valores de SAR con respecto a la masa de muestra se obtuvieron a partir de la derivada de una ecuación de segundo orden ajustada a las curvas T (t).

5. Referencias.

-
- ¹ Prasad PN. Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering, **2012**, Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA.
 - ² Elsabahy M, Heo GS, Lim SM, Sun G, Wooley KL. *Chem. Rev.* **2015**, 115(19), 10967.
 - ³ Ozin GA. *Adv. Mater.* **1992**, 4 (10), 612.
 - ⁴ Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 2826.
 - ⁵ A. Wicki, D. Witzigmannb, V. Balasubramianc, J. Huwylerb, *J. Control. Release*, **2015**, 200, 138.
 - ⁶ Devadasu VR, Bhardwaj V, Kumar MN. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1686.
 - ⁷ Podolsky DK. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347(6), 417.
 - ⁸ Hanauer, SB. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, 12, S3.
 - ⁹ Papadakis KA, Targan SR. *Annu. Rev. Med.* **2000**, 51, 289.
 - ¹⁰ Hua S, Marks E, Schneider JJ, Keely S. *Nanomedicine.* **2015**, 11(5), 1117.
 - ¹¹ Sartor RB. *Gastroenterology.* **2010**, 139(6), 1816.
 - ¹² Xiao B, Merlin D. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2012**, 9(11), 1393.
 - ¹³ Collnot EM, Ali H, Lehr CM. *J. Control Release.* **2012**, 161(2), 235.

- ¹⁴ Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315(1), 196.
- ¹⁵ Garcés V, Rodríguez-Nogales A, González A, Gálvez N, Rodríguez-Cabezas ME, García-Martin ML, Gutiérrez L, Rondón D, Olivares M, Gálvez J, Domínguez-Vera JM. *Bioconjugate Chem.* 2018. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00245.
- ¹⁶ Hillyer JF, Albrecht RM. *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90(12), 1927.
- ¹⁷ des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, Preat V, Schneider YJ, Artursson P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 25(4-5), 455.
- ¹⁸ Pichai MV, Ferguson LR. *World J. Gastroenterol.* **2012**, 18(23), 2895.
- ¹⁹ da Paz MC, Santos Mde F, Santos CM, et al. *Int. J. Nanomedicine.* **2012**, 7, 5271.
- ²⁰ Arvelo F, Sojo F, Cotte C. *Ecancermedicalscience.* **2015**, 9, 520.
- ²¹ Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, 65(2), 87.
- ²² Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, 65(1), 5.
- ²³ Datta K, Suman S, Kumar S, Fornace AJ Jr. *J. Cancer.* **2016**, 7(2), 174.
- ²⁴ Bours MJ, Beijer S, Winkels RM, et al. *Br. J. Nutr.* **2015**, 114(2), 286.
- ²⁵ Gulbake A, Jain A, Jain A, Jain A, Jain SK. *World J. Gastroenterol.* **2016**, 22(2), 582.
- ²⁶ Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. *Annu. Rev. Med.* **2015**, 66, 83.
- ²⁷ Chu E. *Clin. Colorectal Cancer.* **2012**, 11, 1.
- ²⁸ Lee SW. *Clin. Colon Rectal Surg.* **2009**, 22, 218.
- ²⁹ Chabner BA, Roberts TG Jr. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, 5(1), 65.
- ³⁰ Deeken JF, Slack R, Weiss GJ et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, 71(3), 627.
- ³¹ Hoang B, Ernsting MJ, Murakami M, Undzys E, Li SD. *Int. J. Pharm.* **2014**. 471(1), 224.
- ³² Vilos C, Morales FA, Solar PA et al. *Biomaterials.* **2013**, 34(16), 4098.
- ³³ Cao B, Yang M, Zhu Y, Qu X, Mao C. *Adv. Mater.* **2014**. 26(27), 4627.
- ³⁴ Emami J, Pourmashhadi A, Sadeghi H, Varshosaz J, Hamishehkar H. *Pharm. Dev. Technol.* **2014**, 19(7), 1.
- ³⁵ Lu TKT et al. Probiotics organisms for diagnosis, monitoring, and treatment of inflammatory bowel disease, U.S., Patent, No, 2017/0360850 A1, 2017-12-21.
- ³⁶ Maenosono S, Saita S. *IEEE Trans. Magn.* **2006**, 42, 1638.

- ³⁷ Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2161.
- ³⁸ Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P. *Biotechnol. Lett.* **2009**, 31(4), 571.
- ³⁹ Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoui-Jamali MA, Prakash S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101(5), 1999.
- ⁴⁰ Reguera J, Langer J, Jimenez de Aberasturi D, Liz-Marzan LM. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 3866.
- ⁴¹ Ghosh SK, Pal T. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4797.
- ⁴² Hergt R, Dutz S, Mueller R, Zeisberger M, *J. Phys. Condens. Matter.* **2006**, 18, S2919.
- ⁴³ Ma M, Wu Y, Zhou J, Sun Y, Zhang Y, Gu N, *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, 268, 33.
- ⁴⁴ Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M, Gazeau F, Manna L, Pellegrino T. *ACS Nano.* **2012**, 6(4), 3080.
- ⁴⁵ Wang SY, Huang S, Borca-Tasciuc DA, *IEEE Trans. Magn.* **2013**, 49, 255.
- ⁴⁶ Das R, Rinaldi-Montes N, Alonso J, Amghouz Z, Garaio E, García JA, Gorria P, Blanco JA, Phan MH, Srikanth H. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, 8(38), 25162.
- ⁴⁷ Goya GF, Lima E Jr, Arelaro AD, Torres T, Rechenberg HR, Rossi L, Marquina C, Ibarra MR, *IEEE Trans. Magn.* **2008**, 44(11), 4444.
- ⁴⁸ R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, 1247–1248.
- ⁴⁹ Jans H, Huo Q, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41(7), 2849.
- ⁵⁰ Dykman L, Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41(6), 2256.
- ⁵¹ Pelaz B, Grazu V, Ibarra A, Magen C, del Pino P, de la Fuente JM. *Langmuir.* **2012**, 28, 8965.
- ⁵² J.C. McGrath, G.B. Drummond, E.M. McLachlan, C. Kilkenny, C.L. Wainwright, *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, 160, 1573-1576.
- ⁵³ L. Vayssieres, C. Chaneac, E. Tronc and J. P. Jolivet, *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, 205, 205–212.
- ⁵⁴ C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson and D. G. Altman, *J. Pharmacol. Pharmacother.*, **2010**, 1, 94.

CAPÍTULO 5.

YOGUR MAGNÉTICO Y YOGUR DORADO

1. Introducción.

Un alimento se fermenta si "ha estado sujeto a la acción de microorganismos o enzimas, de modo que cambios bioquímicos deseables provoquen una modificación significativa del alimento".¹ La importancia de los alimentos fermentados en la dieta humana ha sido inmensa, ya que la materia prima perecedera se conserva y además el crecimiento microbiano a menudo enriquece los alimentos con vitaminas y otros ingredientes saludables.

En las fermentaciones lácticas, los microorganismos que llevan a cabo la fermentación son bacterias que generan ácido láctico como producto principal al final del proceso. Este diverso grupo de bacterias a menudo se denomina colectivamente bacterias ácido lácticas (LAB, *lactic acid bacteria*), e incluye los siguientes géneros bacterianos: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Camobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.²

La gran variedad de alimentos obtenidos mediante fermentaciones lácticas se debe principalmente a que la acidificación de los alimentos por el ácido láctico (y ácido acético) resultante de la fermentación, inhibe el desarrollo de muchos organismos patógenos.³

El yogur, en concreto, se prepara introduciendo un fermento en leche. El fermento puede definirse como una preparación microbiana de un gran número de células de al menos un microorganismo, el cual es añadido a una materia prima para producir un alimento fermentado, acelerando y dirigiendo su proceso de fermentación.⁴ La materia prima en el caso del yogur es la leche, que es fermentada mediante control de la temperatura (42-43°C). El fermento metaboliza los azúcares de la leche hasta producir ácido láctico. La acumulación de este ácido provoca un descenso del pH (pH 4-5), que conlleva la desnaturalización de las

proteínas de la leche,⁵ las cuales coagulan formando una masa denominada cuajada.

Los beneficios en la salud derivados del consumo de yogur están demostrados y se relacionan con la presencia de bacterias vivas en este alimento fermentado, cosa que en alimentos fermentados tratados posteriormente con calor no ocurre.^{6, 7, 8} Por lo tanto, los fermentos de yogur cumplen claramente los requisitos actuales para ser considerados probióticos, al menos por su efecto beneficioso sobre la digestión de lactosa in vivo.⁹ Aunque, se ha demostrado además que algunos fermentos de yogur inducen otros beneficios para la salud, como reducir la pesadez de estómago, la duración de la diarrea aguda¹⁰ o prevenir trastornos alérgicos.¹¹

Aprovechando las propiedades saludables del yogur y la presencia de probióticos vivos en el mismo, se puede hacer uso de ello y emplearlo como un vehículo para la administración oral de fármacos, moléculas bioactivas y nanopartículas metálicas con aplicaciones biomédicas.^{12,13,14}

En los capítulos 2 y 3 se ha descrito la posibilidad de incorporar nanopartículas de óxido de hierro (maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a la superficie de bacterias probióticas,¹⁵ y hemos demostrado como este sistema supera la barrera estomacal y alcanza el intestino, restableciendo niveles de hierro saludables en ratas anémicas.¹⁶

Por otra parte, además de poder usarse los microorganismos como plataformas donde “depositar” nanopartículas, es también conocido su empleo para sintetizar nanopartículas metálicas, especialmente oro y plata, que puedan ser empleadas en diversas aplicaciones biomédicas.¹⁷

Con estos antecedentes nos planteamos si las bacterias probióticas del yogur podrían actuar como una plataforma para el depósito de nanopartículas metálicas sintetizadas artificialmente, así como, biorreactores capaces de reducir iones metálicos para sintetizar en su superficie nanopartículas de metal, como por ejemplo nanopartículas de

oro. Esta alternativa de emplear microorganismos, como son las bacterias probióticas del yogur, para la biosíntesis de nanopartículas metálicas es un claro ejemplo de química verde que evita el empleo de químicos tóxicos, elevadas presiones y altas temperaturas.¹⁸

Combinando la capacidad de las bacterias probióticas de anidar en los diferentes tejidos del tracto gastrointestinal y las propiedades ópticas y magnéticas de las nanopartículas de oro y de óxido de hierro, respectivamente, convertirían a este nuevo sistema en un candidato óptimo para aplicaciones biomédicas, con la ventaja añadida de su administración como alimento oral.^{19,20,21} La idea por tanto es conferirle a un alimento tan genuino como el yogur propiedades físicas de las nanopartículas que puedan ser aplicables en el campo de la biomedicina, como fármacos de diagnóstico y/o terapia.

En este capítulo se evalúa, por un lado, la capacidad de las bacterias probióticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* (fermento), conocidas por su capacidad de fermentar la leche y producir yogur, de adherir en su superficie diferentes tipos de nanopartículas metálicas. Más concretamente, se ha llevado a cabo el estudio de la adhesión a la superficie de dichas bacterias, de nanopartículas de óxido de hierro, tipo maghemita (MNP), así como nanopartículas de oro (AuNPs) de diferentes morfologías: nanoesferas (AuNSs), *nanorods* (AuNRs) y nanoprismas (AuNPRMs). Posteriormente se evaluaron los efectos de la adhesión de estas nanopartículas a la capacidad fermentativa de estas dos bacterias.

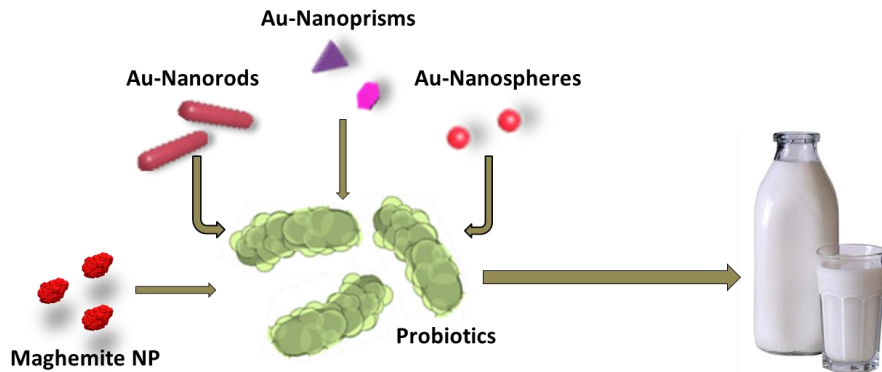
Por otro lado, se analiza y discute la capacidad de estas dos especies bacterianas para llevar a cabo la biosíntesis directa de AuNPs a partir de una sal de este metal, y estudiar cómo afecta esta biosíntesis a la capacidad de producir yogur del fermento formado por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Para ello, se ha realizado una caracterización del sistema mediante espectrofotometría UV-visible y

microscopía electrónica de transmisión (TEM), así como un estudio de la viabilidad celular mediante microscopía láser confocal (CLSM).

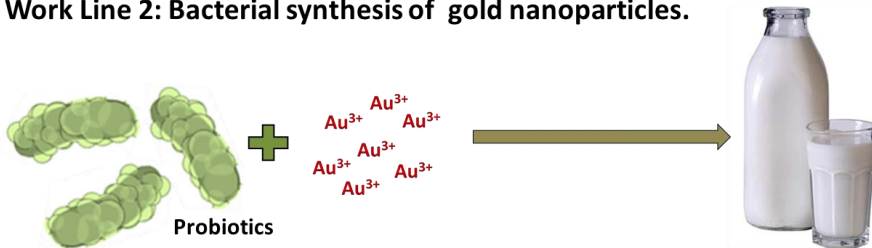
2. Resultados y discusión.

Se llevaron a cabo dos líneas de trabajo bien diferenciadas (Esquema 1).

Work Line 1: Grafting nanoparticles to Ferment Bacteria.



Work Line 2: Bacterial synthesis of gold nanoparticles.



Esquema 1. Líneas de trabajo del estudio. La línea 1 consiste en la adición de diferentes tipos de nanopartículas metálicas a los probióticos que constituyen el fermento. La línea 2 se basa en poner en contacto el mismo fermento (formado por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*) con iones $Au(III)$. El paso final en ambas líneas de trabajo es evaluar la acción fermentativa del fermento en leche.

La primera consistió en la adición, individual y por separado, de MNP y AuNPs a un cultivo bacteriano compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, las dos cepas que forman el

fermento. En el caso de las AuNPs, se emplearon tres morfologías diferentes: nanoesferas (AuNSs), *nanorods* (AuNRs) y nanoprismas (AuNPRMs), que se añadieron al cultivo de forma independiente, nunca en combinación. La segunda línea de trabajo consistió en la adición, a un cultivo del mismo fermento, de una sal de oro trihidratada ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 mM) como fuente del ión Au (III) para formar directamente AuNPs.

Tras estos procesos, el paso común en ambas líneas de trabajo fue poner en contacto el fermento tratado, con un volumen determinado de leche para evaluar la acción fermentativa de las bacterias, y observar si eran capaces de producir yogur.

2.1. Yogur magnético.

2.1.1. Adhesión de las nanopartículas de maghemita a la superficie bacteriana.

Siguiendo nuestros hallazgos previos en cuanto a la incorporación de nanopartículas de maghemita de 10 nm (MNP) (capítulos 2, 3 y 4) sobre la superficie de las bacterias probióticas *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacteria breve*,¹⁵ procedimos a realizar el mismo protocolo de adición de MNP sobre un cultivo del fermento compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Para confirmar la incorporación de MNP en el fermento se llevó a cabo un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) tras incubar las MNP con el fermento. Como se observa en la Figura 1, las nanopartículas magnéticas se encuentran rodeando las bacterias por completo, en lo que creemos un sistema muy parecido al que se obtuvo en nuestro estudio previo con *Lactobacillus fermentum*.¹⁵ Las MNP se adhieren en el biofilm bacteriano de las dos cepas que forman el fermento (MNP-fermento).^{22,23}

Las imágenes de TEM permiten la diferenciación de ambas especies bacterianas. De hecho, La adhesión de MNP se produce, tanto en *Lactobacillus*, como en *Streptococcus*, lo que puede verse gracias a la

diferente morfología de ambas especies. Los *Lactobacillus* son bacilos alargados (2-5 μm), mientras que los *Streptococcus* son más pequeños (0.7-0.9 μm) y crecen formando cadenas en las que cada bacteria es un eslabón.

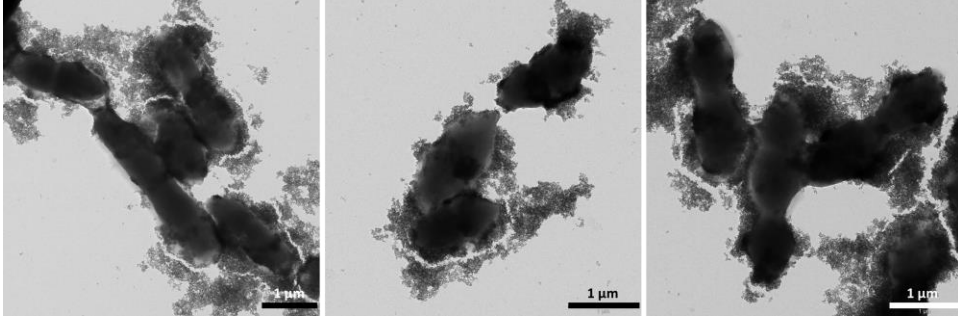


Figura 1. Micrografías TEM de diferentes zonas de la muestra MNP-fermento. Las MNP se asocian a las superficies de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*.

El análisis químico mediante EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) del fermento con las nanopartículas de maghemita confirmó la presencia de hierro alrededor del sistema MNP-fermento (Figura 2).

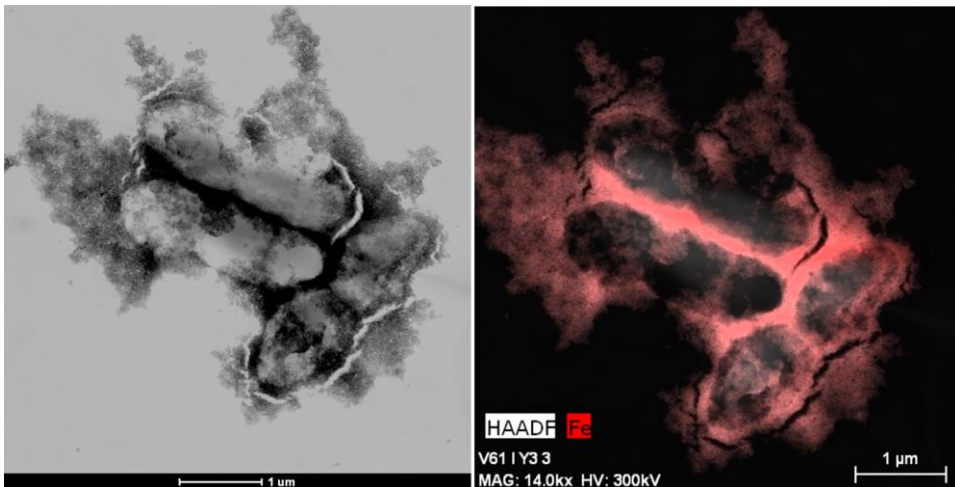


Figura 2. Imagen HAADF-STEM de la muestra MNP-fermento con el mapa composicional de EDX del hierro (rojo) correspondiente.

La gran cantidad de MNP que rodeaban la pared de las bacterias se visualizó también mediante HAADF-STEM (High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy). El mapa composicional de EDX indica claramente que las nanopartículas de hierro (en rojo) se incorporaron a la región bacteriana externa, incrustándose en sus EPS.

2.1.2. Acción fermentativa del MNP-fermento. Producción de yogur magnético.

Una vez incorporadas las MNP al fermento, era necesario evaluar la viabilidad del mismo. Para ello, decidimos que una prueba lógica y sencilla para evaluar cualitativamente la viabilidad de un fermento productor de yogur era determinar su acción fermentativa en leche. De manera, que si la capacidad fermentativa se mantiene intacta y el MNP-fermento es capaz de producir yogur, esto sería indicativo de que las cepas que lo forman se mantienen vivas y activas una vez incorporadas las nanopartículas.

En un primer intento y siguiendo el método clásico de preparación de yogur, introdujimos el MNP-fermento en un volumen determinado de leche atemperada a 40-42 °C. Tras 8 h de incubación se forma yogur, con pH 4.5, indicativo de que la fermentación ha llegado a término, y unas propiedades organolépticas, a simple vista, muy parecidas a un yogur control producido por el fermento sin MNP (Figura 3).

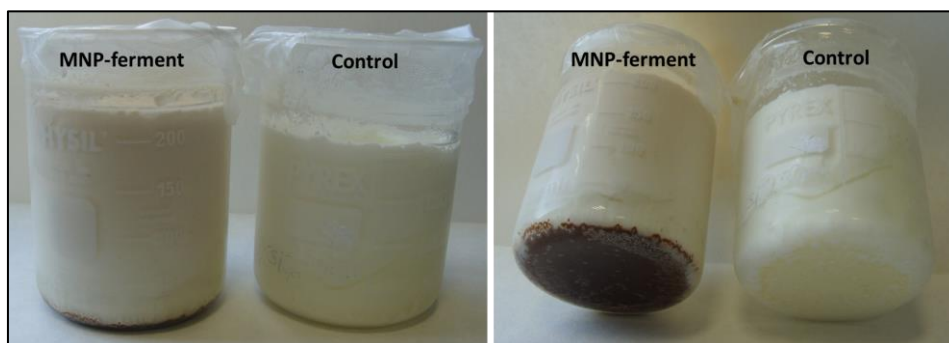


Figura 3. Los yogures producidos con el fermento puro (Control) y con el fermento cargado de nanopartículas de maghemita (MNP-fermento).

La formación de yogur certifica la viabilidad de las dos cepas que forman el fermento, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* después de la deposición de MNP. Esto tiene su explicación en la Figura 4,²⁴ en la que puede observarse el comportamiento habitual de las diferentes poblaciones de LAB que se van sucediendo en el transcurso de una fermentación láctica espontánea.

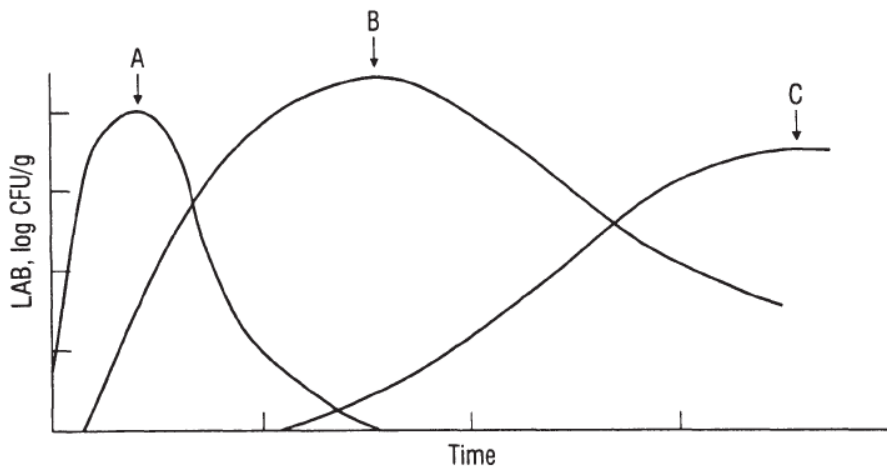


Figura 4. Diagrama generalizado que representa las diferentes poblaciones de bacterias ácido lácticas que se suceden en el transcurso de una fermentación láctica espontánea típica. A, B y C se corresponden con diferentes tipos de bacterias ácido lácticas, clasificadas en función de sus curvas de crecimiento.

Las LAB tipo A son muy importantes de cara a "preparar el escenario" de la fermentación, por medio de la disminución inicial del pH y, a veces, por crear condiciones más anaerobias (mediante la producción de CO₂), aunque presentan baja tolerancia a los ácidos. En fermentaciones de leche (por ejemplo, queso o yogur), *Lactococcus lactis* o *Streptococcus thermophilus* pueden representar LAB de tipo A. Mientras que, *Lactobacillus delbriickii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus helveticus* corresponderían a los tipos B o C, más tolerantes a los ácidos y por ello protagonistas de la etapa final de la fermentación.²⁵ En este último grupo se incluiría *Lactobacillus acidophilus*, lo cual demuestra que para que la fermentación llegue a término (pH 4.5) es necesaria la maquinaria metabólica de las dos cepas que forman el fermento empleado en este estudio.

Es conocida la presencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* en alimentos lácteos fermentados,²⁶ así como la capacidad de estas bacterias de adherir nanopartículas de maghemita en su superficie (MNP-bacteria).¹⁵ Por lo tanto, pensamos que una forma de enriquecer el yogur magnético que hemos producido, tanto en probióticos como en nanopartículas magnéticas, era incorporar a la leche MNP-bacteria junto con el MNP-fermento y observar si en estas condiciones se formaba el yogur. La adición de ambos sistemas (MNP-bacteria + MNP-fermento), conduce a la formación de yogur como se observa en la figura 5. Se puede ver claramente que las nanopartículas magnéticas están en el fondo del yogur.

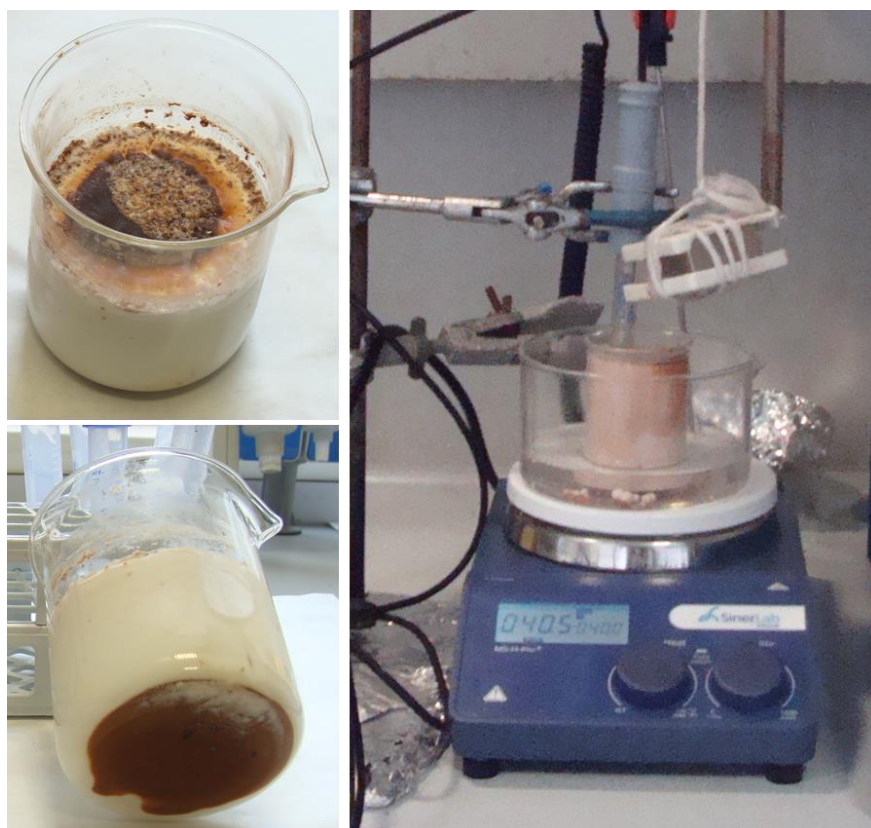


Figura 5. Imágenes (izquierda) del yogur magnético que se obtuvo a partir de MNP-fermento y una adición extra del probiótico *L. fermentum* portando MNP. A la izquierda se muestra el método de obtención del mismo.

Con la intención de conseguir un reparto más homogéneo del material magnético (MNP-fermento y MNP-bacteria) en el yogur, colocamos un imán de 1.2 T sobre el recipiente donde se llevó a cabo la fermentación (Figura 5).

Observando estos resultados, la forma de homogeneizar el material magnético en el yogur fue agitación mecánica. Obteniendo un yogur con consistencia líquida que se mueve atraído hacia un imán de 1.2 T (Figura 6).

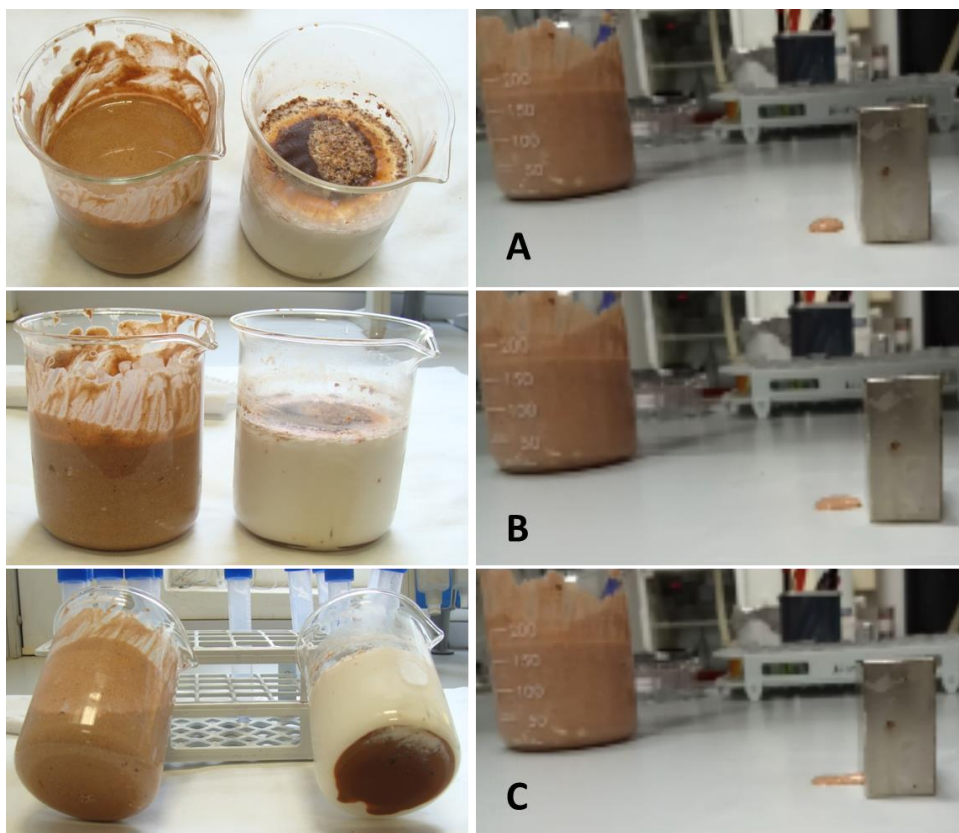


Figura 6. La columna derecha muestra el yogur magnético sin y con agitación mecánica, tras lo que adquirió una consistencia líquida. La columna derecha recoge una secuencia en el tiempo en la que una gota del yogur magnético líquido se mueve atraído a un imán de 1.2 T. A=0 s, B= 10 s y C=20 s.

En definitiva, estos resultados ponen de manifiesto que es posible hacer un yogur magnético que podría ser utilizado como agente de contraste de MRI del aparato digestivo y/o para un tratamiento de cáncer por hipertermia magnética.

2.2. Yogur dorado (yogAur).

2.2.1. Adhesión de AuNPs a la superficie bacteriana y producción de yogur dorado.

De la misma manera que en el caso de la adhesión de MNP, se procedió a analizar la adhesión de AuNPs de diferentes morfologías, previamente sintetizadas (ver experimental), a la superficie del fermento del yogur, para evaluar, más tarde, su acción fermentativa.

La Figura 7 muestra las imágenes de TEM y los espectros UV-visibles del fermento, una vez adheridas cada una de las diferentes AuNPs. Dicha figura está dividida en tres filas, correspondiente al tratamiento del fermento con cada una de las morfologías: nanoesferas (AuNSs), *nanorods* (AuNRs) y nanoprismas (AuNPRMs).

Los resultados del estudio TEM (Figura 7) muestran una clara adhesión de las diferentes AuNPs a la superficie de las bacterias del fermento. La especificidad de las AuNPs por la superficie de las bacterias es muy alta, observándose pocas nanopartículas no adheridas al EPS de la bacteria, es decir, libres en el medio. Además, la adhesión no afecta a la morfología de las AuNPs, la cual se mantiene una vez adheridas, confirmado mediante las imágenes TEM y los espectros de absorción UV-visible de los fermentos cargados con las diferentes AuNPs (Figura 6). Así, el espectro UV-vis del sistema AuNSs-fermento presenta una única banda SPR (*Surface Plasmon Resonance*) a 530 nm, típica de nanopartículas de oro esféricas de un tamaño medio de 13 nm. En cambio, los espectros, tanto de AuNRs-fermento, como de AuNPRMs-fermento se desdoblaron en dos bandas debido a la pérdida de simetría esférica, la primera situada en torno a 530 nm (SPR transversal), y el segundo pico a una longitud de onda mayor (SPR longitudinal), de 900 nm para los prismas y 1100 nm en

el caso de los *rods*.²⁷ De esta manera, el fermento adquiere las propiedades ópticas de las AuNPs que porta.

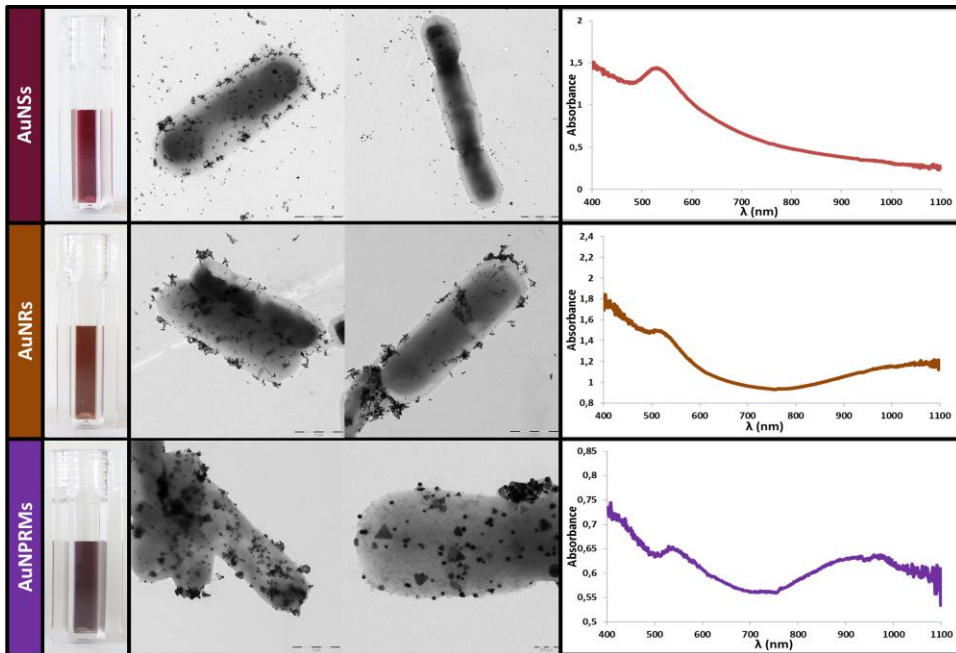


Figura 7. La primera imagen de cada fila corresponde a un coloide de AuNPs, a lo que le siguen dos micrografías TEM de las bacterias del fermento con AuNPs de esa misma morfología, adheridas a su superficie. Y por último, al final de cada fila se muestra el espectro UV-visible de la muestra del fermento con AuNSs (primera fila), el fermento con AuNRs (segunda fila) y el fermento con AuNPRMs (tercera fila).

Una vez comprobada la adhesión de las AuNPs al fermento del yogur, era el momento de determinar la viabilidad del mismo, por lo que decidimos proceder de la misma manera que en el caso del yogur magnético. Así que, introdujimos en la leche el fermento con cada una de las AuNPs, y observamos si producían o no yogur. Los resultados que obtuvimos están representados en la Figura 8.

Las bacterias del fermento mantuvieron activas su capacidad metabólica y su acción fermentativa, produciendo yogur después de 8-9 h de incubación en leche. Los yogures, producidos por el fermento portando AuNSs, AuNRs y AuNPRMs, presentaron la coloración

característica de la morfología de AuNPs que incluían (Figura 8). El pH de los yogures de oro se situó entre 4.2-4.5.

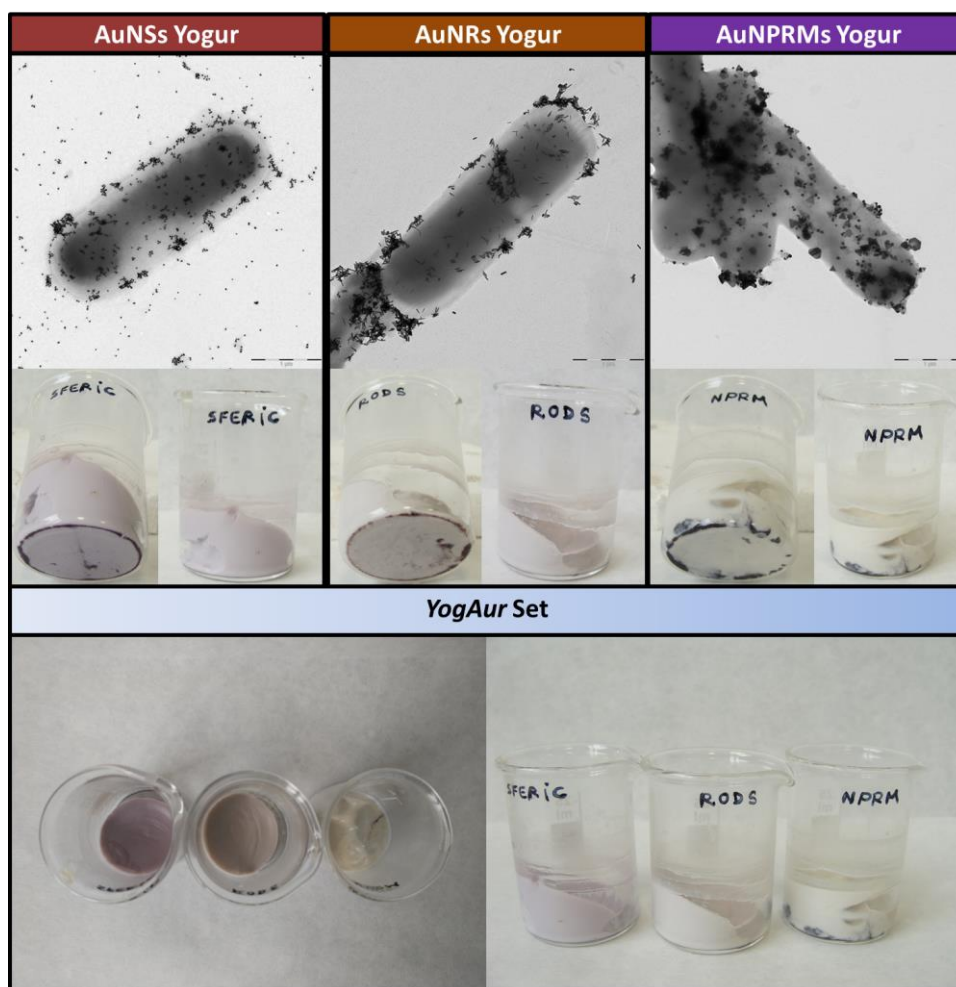


Figura 8. Imágenes TEM de AuNSs-fermento, AuNRs-fermento y AuNPRMs-fermento. Fotografías de los yogures que produjeron cada uno de los fermentos portando las diferentes morfologías de AuNPs.

De esta manera conseguimos incorporar AuNPs de diferentes morfologías en un alimento fermentado como es el yogur, incluyéndolas previamente sobre la superficie de las bacterias encargadas de fermentar la leche. Obteniendo finalmente un nuevo tipo de yogur, al que hemos denominado yogur dorado *YogAur*.

2.2.2. Síntesis biogénica de AuNPs mediada por el fermento del yogur.

La biosíntesis de nanopartículas metálicas empleando microorganismos ha ido ganando fuerza en las últimas décadas por las atractivas ventajas que presenta frente a la síntesis tradicional de estos materiales.¹⁷ Observando los resultados obtenidos en la incorporación de AuNPs al fermento del yogur, decidimos evaluar la capacidad de las bacterias que lo forman, de sintetizar nanopartículas de este metal noble. Para lo que pusimos en contacto el fermento del yogur con una solución de una sal de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 mM), que aporta los iones Au(III) que tienen que ser reducidos a Au^0 para formar las AuNPs (Esquema 1).

Diseñamos una batería de experimentos en los que incubamos distintos cultivos del fermento bacteriano con la sal de oro y en los que modificamos: temperatura, agitación y tiempo de incubación.

Para controlar la formación de AuNPs llevamos a cabo un seguimiento mediante espectroscopía de absorción UV-visible de las diferentes muestras. Mediante lo cual determinamos que las mejores condiciones para la biosíntesis de AuNPs consistían en cultivar el fermento durante 24 h a 37 °C en contacto con la sal de oro. La Figura 9 presenta los resultados del estudio de esta muestra mediante TEM y su espectro UV-visible. La banda SPR en torno a 540 nm indica la presencia de AuNPs, lo que se confirmó con las imágenes TEM, en las que se aprecia como la morfología de las nanopartículas es principalmente esférica. El máximo de la banda SPR de las AuNSs sintetizadas siguiendo métodos tradicionales está más definido y se sitúa a 530 nm, comparativamente al máximo de la banda SPR que presentan las AuNPs biosintetizadas por el fermento, lo que puede deberse al efecto de agregación que tiene lugar, en este último caso, sobre la superficie bacteriana. La formación de las AuNPs puede apreciarse a simple vista, ya que a medida que las bacterias van reduciendo los iones Au(III) y sintetizan las AuNPs, el color del cultivo cambia y aparece un color rosado típico de esta morfología esférica.

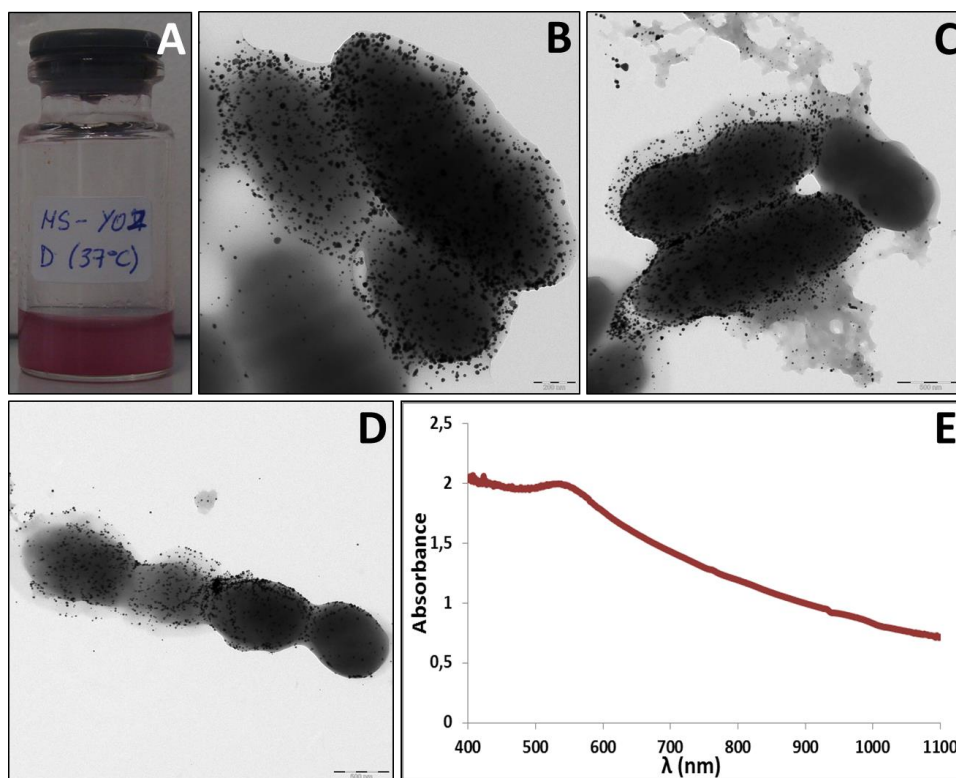


Figura 9. (A) Cultivo del fermento de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* tras 24 h de incubación con la sal de oro a 37°C. (B,Cy D) Imágenes TEM de las AuNPs biosintetizadas por el fermento y adheridad a su superficie. La imagen D muestra la forma cacaractística de crecimiento de los *Streptococos* formando una cadenas. (E) Espectro UV-visible de la muestra con la banda SPR característica de nanoesferas de oro en torno a 500 nm.

El fermento del yogur es, según esto, capaz de reducir los iones Au(III) hasta forman AuNPs que se depositan sobre la superficie bacteriana. El mecanismo mediante el cual tiene lugar la biosíntesis es desconocido. Es posible que esta reducción se lleve a cabo por los componentes del lipopolisacárido superficial de las bacterias, actuado la pared celular como un sitio de nucleación y crecimiento de las AuNPs. Otra posibilidad es que la reducción de los iones Au (III) se produzca por un reductor excretado al medio por la bacteria, probablemente como parte de un mecanismo de defensa. De manera que, la reducción se llevaría a cabo en el medio próximo a la bacteria y, posteriormente, tendría lugar la

adhesión y el crecimiento de las nanopartículas sobre la superficie bacteriana.

En este caso, al probar la acción fermentativa de las bacterias cargadas de AuNPs biógenas, observamos que el fermento no producía yogur al añadirlo a la leche. Lo que parecía indicar que la adición de los iones Au(III) afectaba la capacidad metabólica de las bacterias del fermento, y en definitiva, a la viabilidad del mismo.

Wang et al. demostraron en 2011 que los iones Au(III) presentan actividad antimicrobiana a una concentración de $1\mu\text{M}$,²⁸ lo que supone una concentración 1000 veces menor que la que empleamos en este estudio. También está demostrado el efecto tóxico de los iones Au (III) sobre los géneros bacterianos *Escherichia*, *Staphilococcus* y *Salmonella*.²⁹ El estudio de viabilidad bacteriana mediante microscopía láser confocal (Figura 9) confirmó nuestras sospechas de que la presencia de iones Au(III) en el medio de cultivo compromete la viabilidad del fermento, haciendo que la viabilidad disminuya considerablemente respecto a un cultivo control no tratado (Figura 10).

Se llevó a cabo la cuantificación de la proliferación del fermento en contacto con Au (III) mediante un test estándar de viabilidad bacteriana vivas/muertas con los fluoróforos SYTO9 (verde)/yoduro de propidio (rojo), contando el número de bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas) en tres réplicas, usando el software Image-J. La relación vivas/muertas se utilizó para cuantificar la proliferación del fermento por comparación con un cultivo control que no estuvo en contacto con Au (III).

Según las imágenes de la Figura 10, todas las bacterias se marcan con el fluoróforo verde (SYTO 9®). En cambio, las bacterias no viables están marcadas con el fluoróforo rojo (yoduro de propidio), de manera que las bacterias marcadas con ambas fluoróforos se consideran no viables. Mediante el software de análisis de imagen Image J®, para conteo celular, determinamos que la tasa de viabilidad del fermento incubado con los

iones Au(III) no alcanzó el 9%, mientras que un cultivo control no tratado presentó una viabilidad del 98.2%.

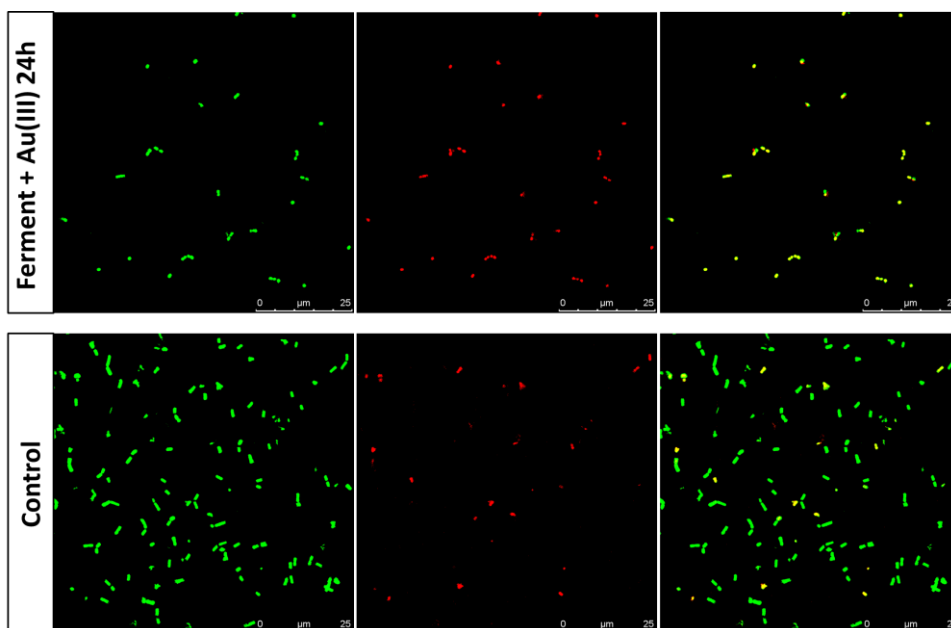


Figura 10. Imágenes de microscopía láser confocal. De izquierda a derecha: Fluorescencia de SYTO9®(todas las células), fluorescencia de yoduro de propidio (células no viables) y superposición de ambas imágenes. El trio de imágenes superior, corresponde al estudio de viabilidad del fermento incubado 24h con iones Au (III). El trío inferior corresponde a un cultivo control del fermento no tratado.

Ante la elevada tasa de muerte celular provocada por la incubación del fermento con iones Au (III), probamos a reducir el tiempo de contacto entre el fermento y el Au(III), a 2 h. Tras esto, analizamos la muestra tanto por TEM, como por espectroscopia de absorción UV-visible. Los resultados se recogen en la Figura 11.

Al igual que en la primera prueba, en la que el tiempo de contacto entre el fermento y los iones Au(III) fue de 24 h, en este caso, tras 2 h de incubación con oro, las bacterias fueron capaces de biosintetizar AuNPs. Además, al incorporar el AuNPs-fermento a la leche, produjo yogur

(Figura 11), con lo que su capacidad fermentativa se mantuvo tras la biosíntesis de AuNPs.

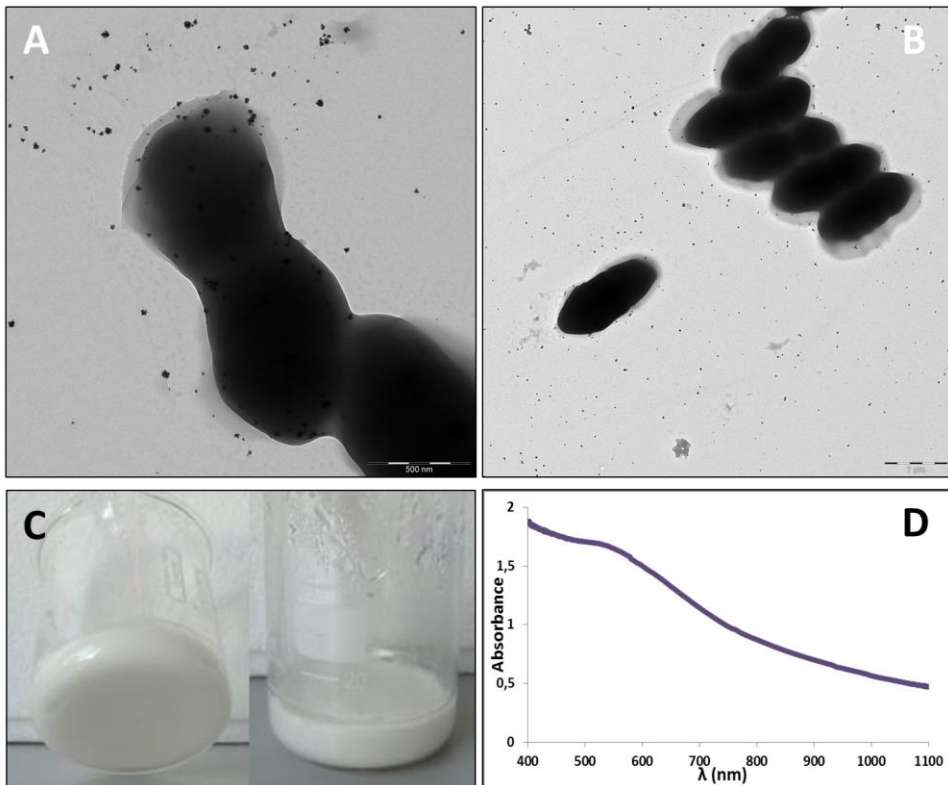


Figura 11. (A, B y C) Imágenes TEM de las AuNPs biosintetizadas por el fermento y adheridas a su superficie tras 24 h de incubación con la sal de oro a 37°C. (D) Espectro UV-visible de la muestra con la banda SPR característica de nanoesferas de oro en torno a 500 nm.

De hecho, el estudio de la viabilidad del fermento en este caso dio como resultado un aumento de la viabilidad, que fue cinco veces mayor que la del cultivo incubado 24 h con la sal de oro. Concretamente, en este caso se alcanzó una tasa de viabilidad del 42.8%. El cultivo control para este ensayo presentó una tasa de viabilidad del 93.7% (Figura 12).

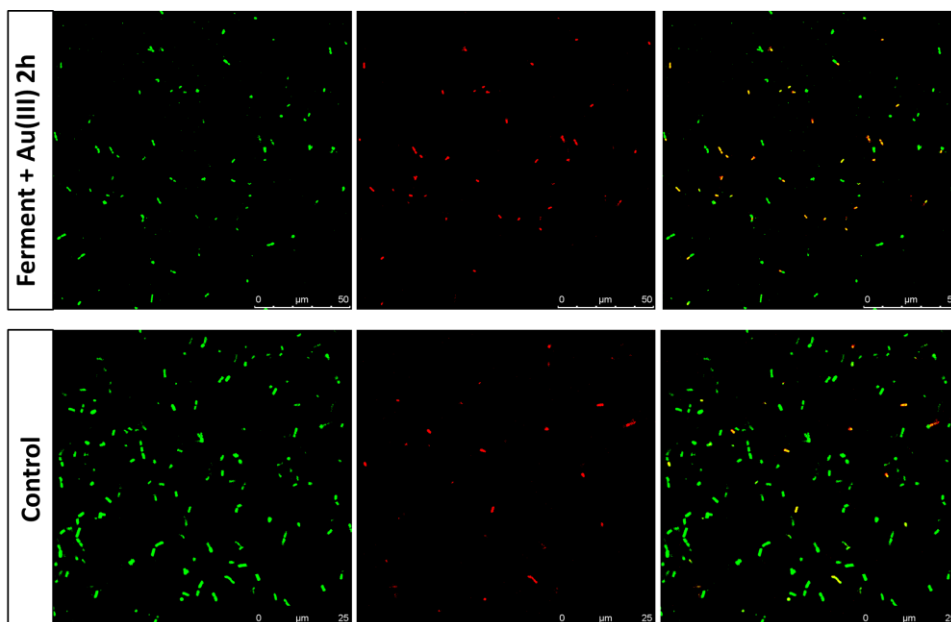


Figura 12. Imágenes de microscopía láser confocal. De izquierda a derecha: Fluorescencia de SYTO9®(todas las células), fluorescencia de yoduro de propidio (células no viables) y superposición de ambas imágenes. El trio de imágenes superior, corresponde al estudio de viabilidad del fermento incubado 2h con iones Au (III). El trio inferior corresponde a un cultivo control del fermento no tratado

Hemos obtenido por tanto un yogur, cuyo fermento, formado por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, es capaz de biosintetizar AuNPs y fermentar la leche para producir yogur. De esta forma, hemos creado un alimento que puede servir como fórmula de administración de las nanopartículas de oro para su uso en aplicaciones biomédicas, como la hipertermia térmica, así como, convertirse en un reclamo comercial para los consumidores de cocina de vanguardia. En este sentido, desde que en 2016, la FSA (*Food Standards Agency, UK*) reevaluara la seguridad del oro como aditivo culinario, concluyendo ningún efecto sistémico dañino por parte de este metal,¹⁷ ha aumentado su uso en alta cocina. Esto supondría una oportunidad de generar beneficios para inversores en este sector, ofreciendo al cliente un producto glamuroso que aporta las propiedades saludables del yogur.

3. Conclusiones.

El fermento estudiado, formado por las especies bacterianas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, presenta la capacidad de adherir MNP en su superficie bacteriana, y tras esto, mantener su capacidad fermentativa para producir un yogur magnético.

Por otra parte, es posible enriquecer la mezcla MNP-fermento con probióticos como *Lactobacillus fermentum*, los cuales, a su vez, portan más MNP incrustadas en su EPS. Se obtiene de esta manera un yogur magnético que tras agitación mecánica para homogeneizar el material magnético que contiene y adquirir una consistencia de yogur líquido, se ve atraído hacia un imán de 1.2 T. Este yogur magnético puede ser útil para todas las aplicaciones biomédicas que se han asociado con las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro: agentes de contraste para MRI, tratamiento de hipertermia magnética o suplemento de hierro para mitigar la anemia por deficiencia en hierro.

Además de MNP, el fermento es capaz de incorporar AuNPs de diferentes morfologías en la superficie bacteriana. Asimismo las bacterias del fermento son capaces de reducir los iones Au (III) hasta Au⁰ y dar lugar a la síntesis directa de nanopartículas de oro mediante un proceso rápido. Tras los procesos de incorporación de AuNPs y de biogénesis de estas, las bacterias mantienen su acción fermentativa activa y son capaces de producir un yogur, al que hemos denominado yogur dorado, que podría ser comercializado bajo el nombre de *YogAur*.

YogAur podría ser empleado como un sistema de administración oral para pacientes con patologías gastrointestinales en las que las AuNPs puedan ser útiles como agentes anticancerígenos o antimicrobiano mediante hipertermia óptica o bien, como producto culinario para amantes de alta cocina que se vean atraídos por este sofisticado y glamuroso alimento que incorpora oro.

4. Materiales y métodos.

4.1. Síntesis de MNP.

Las nanopartículas de maghemita (MNP) fueron sintetizadas de acuerdo al método de Massart de coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) en una estequiometría 0.5.³⁰ El pH se ajustó a 11 con NaOH 3 M y la fuerza iónica con NaNO₃ 1 M, el tamaño medio de las nanopartículas de magnetita resultantes es de 10 nm. Tras la oxidación de la magnetita a maghemita con HClO₄ 1 M, se obtuvo un coloide de nanopartículas de maghemita estable a pH 2.

4.2. Síntesis de AuNPs.

4.2.1. Síntesis de AuNSs.

Siguiendo un protocolo previamente descrito,³¹ se prepararon 5 ml de una solución de HAuCl₄ 1.0 mM en agua y se calentaron a ebullición en una placa calefactora con agitación. Después de que la solución comenzó a hervir, se añadieron 500 µl de una solución de Na₃C₆H₅O₇ 38.8 mM en agua. La mezcla se hirvió y se agitó continuamente durante aproximadamente 10 minutos hasta que apareció un color rojo intenso. Tras esto, la solución se enfrió a temperatura ambiente. Los AuNSs se caracterizaron por espectroscopía UV-vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

4.2.2. Síntesis de AuNRs.

Para la síntesis de *nanorods* de oro, se llevó a cabo un método mediado por semilla.³²

En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones, a temperatura ambiente: HAuCl₄ 1 mM, AgNO₃ 8 mM, Ácido Ascórbico 78.8 mM y NaBH₄ 10 mM. Esta última solución fue congelada tras su preparación.

Paralelamente, se prepararon disoluciones de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 0.2 M, (11-mercaptoundecil)-N, N,N-bromuro de

trimetilamonio 92 mM, en agitación a 50 °C. Una vez preparadas, se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Todas ellas fueron elaboradas en agua Mili-Q ultrapure.

Para la síntesis de las semillas, se mezclaron 5 ml de CTAB 0.2 M, 2.5 ml de HAuCl_4 1 mM y 0.6 ml de la disolución fría de NaBH_4 10 mM. Esta mezcla se mantuvo a 25 °C, en agitación, durante 2 minutos. Cuando las semillas estuvieron formadas, el color de la mezcla cambió desde amarillo a un tono amarronado.

Para la síntesis de los *nanorods* se añadieron 5 ml de la disolución de CTAB 0.2 M en un matraz previamente colocado en un baño de aceite a 30°C, bajo agitación a 180 rpm. Posteriormente, se añadieron 5 ml de HAuCl_4 1mM, 70 μL de Ácido Ascórbico 78.8 mM y 100 μl de AgNO_3 8 mM, en este orden a la disolución de CTAB. La mezcla se completó con 160 μl de la disolución de semillas de oro y se mantuvo en agitación, a 30°C, durante 48 horas.

Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de CTAB, debido a su actividad antibacteriana,³³ y los *nanorods* se colectaron por centrifugación a 13000g durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, los *nanorods* se disolvieron en 1 ml de agua Mili-Q ultrapura y 1 ml de (11-mercaptoundecil)-N, N, N-bromuro de trimetilamonio 92 mM. De nuevo, se colectaron los *nanorods* por centrifugación a 13000g durante 10 minutos, resuspendiendo el sedimento en 1 ml de agua Mili-Q ultrapura.

4.2.3. Síntesis de AuNPRMs.

Se mezclaron 100 μl de HAuCl_4 2 mM y 120 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM (disolución fría), ambas disoluciones preparadas en agua Mili-Q ultrapura. Después de 9 minutos en agitación a 15 °C para la formación de las semillas, se añadieron otros 50 ml de la disolución fría de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM. La mezcla se mantuvo durante toda la noche en agitación a 15°C.³⁴

4.3. Adhesión de las nanopartículas a la superficie de las bacterias del fermento.

4.3.1. Adhesión de MNP a la superficie bacteriana.

Para la preparación de la muestra de MNP-fermento, un cultivo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* suministradas por la empresa Biosearch S.A., creció en un medio sintético, a 37°C con agitación orbital durante 24 h. El medio de crecimiento sintético está formado por (g L⁻¹): Na₂HPO₄ - 5.0; KH₂PO₄ - 6.0; citrato de triamonio - 2.0; sacarosa - 50.0; MgSO₄ - 1.0; y 10 ml de una solución de elementos traza (que consta de (g L⁻¹): MnSO₄ - 2,0, CoCl₂ - 1,0 y ZnCl₂ - 1,0 disueltos en solución de HCl 0,1 N). Se ajustó el pH inicial del medio a 6,7 y se esterilizó a 121 °C. Tras las 24 h de crecimiento, las bacterias se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Después, una solución ácida (pH 2) de MNP se añadió a las bacterias en un baño de hielo y se mezcló. La mezcla fue diluida con 1 ml de agua destilada. Las bacterias del fermento cargadas de nanopartículas de maghemita en superficie (MNP-fermento) se recolectaron por centrifugación a 100 g durante 20 minutos.

La caracterización de MNP-fermento se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello una gota de la muestra se depositó sobre una rejilla de Cu recubiertas de carbono (200 mallas) específicas para TEM. La rejilla se secó con papel de filtro. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio electrónico de análisis Philips CM-20 HR que funcionaba a 200 keV. Para la caracterización por HAADF-STEM (microscopía electrónica de barrido), mapa EDX (energía dispersada de Rayos X) y HRTEM (microscopía electrónica de transmisión de alta resolución) la rejilla se observó en un microscopio FEI TITAN G2.

4.3.2. Adhesión de AuNPs a la superficie bacteriana.

Se procedió de la misma manera que en el caso de la incorporación de MNP al cultivo del fermento. Un cultivo inicial con 0.0771 g del

fermento se incubó en 10 ml de medio de cultivo a 37 °C 24 h. Este cultivo inicial se dividió en tres partes que se centrifugaron a 3000g durante 10 minutos, a cada uno de los pellets de bacterias se le añadieron 2ml de un coloide con cada una de las morfologías de AuNPs, previamente sintetizadas: AuNSs, AuNRs y AuNPRMs. En el caso de TEM, la caracterización de las muestras se llevó de igual manera que MNP-fermento. Además, estas muestras se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-visible.

4.4. Síntesis biógena de AuNPs mediada por las bacterias del fermento.

Tras 24 h de crecimiento de las bacterias del fermento en el medio sintético a 37 °C, se añadió una solución acuosa de hidrotetracloruro de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1mM) a una concentración final 0.25 mM. Las condiciones que seleccionamos para su incubación fueron: 37°C y sin agitación. El tiempo inicial de incubación de las bacterias del fermento con la sal de oro fue 24h, pero tras comprobar que después las bacterias eran incapaces de fermentar leche, el tiempo de incubación se redujo a 2 h. La caracterización de estas muestras también se llevó a cabo mediante TEM y espectrofotometría UV-visible.

4.5. Estudio de la viabilidad bacteriana por microscopía láser confocal (CLSM).

Para evaluar la viabilidad de las bacterias se empleó el kit “LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability” (ThermoFisher), el cual emplea dos fluoróforos: SYTO9® (verde) y yoduro de propidio (rojo). Ambos se intercalan en el DNA bacteriano, pero se diferencian en la facilidad para atravesar la membrana plasmática. Mientras que SYTO9® penetra en las bacterias por difusión pasiva marcando todas las bacterias viables y no viables, el yoduro de propidio solo puede penetrar en las bacterias cuya membrana está muy degradada, es decir, bacterias no viables. Una vez las bacterias se tiñeron con el kit, una gota del cultivo se depositó sobre

un portaobjetos recubierto con poli-L-lisina y se observó en un microscopio láser confocal Leica DMI6000.

Para determinar la proporción de bacterias viables empleamos la siguiente fórmula.

$$V = \frac{A}{N} \times 100$$

Donde, $A = N - D$

V es la viabilidad del cultivo bacteriano expresada en %, A es el número de bacterias viables (*alive*) y N el número de bacterias totales. Para calcular A , al número total de bacterias N se le sustraen las que están marcadas con el yoduro de propidio (D , death).

4.6. Producción del yogur.

Finalmente, cada uno de las preparaciones bacterianas portando los diferentes tipos de nanopartículas metálicas, que hemos desarrollado en este estudio, se añadieron a leche Puleva Fresca® atemperada a 40-42 °C (7mg fermento/ ml de leche). El control del avance de la fermentación se llevó a cabo midiendo el pH de manera continua. Se situó el final de la fermentación a un pH 4.2-4.5.

5. Referencias.

¹ Campbell-Platt G. *Fermented Foods of the World*. Butterworths, London, England **1987**.

² Schleifer KH, Ludwig W. *Syst. Appl. Microbiol.* **1995**, 18, 461.

³ Steinkraus KH, editor. *Handbook of Indigenous Fermented Food*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, New York, USA **1996**.

⁴ Leroy F, Vuyst LD. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 67.

⁵ Yildiz F, editor. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press, Boca Raton, USA **2010**.

- ⁶ Rizkalla SW, Luo J, Kabir M, Chevalier A, Pacher N, Slama G. *Am J Clin Nutr.* **2000**, 72, 1474.
- ⁷ Labayen I, Forga L, González A, Lenoir I, Martínez AJ. *Aliment Pharmacol Ther.* **2001**, 15, 543.
- ⁸ Pelletier X, Laure-Boussuge S, Donazzolo Y. *Eur J Clin Nutr.* **2001**, 55, 509.
- ⁹ Sanders ME, Walker DC, Walker KM, Aoyama K, Klaenhammer TR. *J. Dairy. Sci.* **1996**, 79, 943.
- ¹⁰ Boudraa G, Benbouabdellah M, Hachelaf W, Boisset M, Desjeux JF, Touhami M. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **2001**, 33, 307.
- ¹¹ Meydani SN, Ha WK. *Am J Clin Nutr.* **2000**, 71, 861–872.
- ¹² German JB. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, 99, 1271S.
- ¹³ Urbanska AM, Bhatena J, Prakash S. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, 85, 884.
- ¹⁴ Harel M. Microparticles for oral delivery, U.S., Patent, No, 2008/004.4481 A1, 2008-02-21.
- ¹⁵ Martín M, Carmona F, Cuesta R, Rondón D, Gálvez N, Dominguez-Vera JM. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24, 3489.
- ¹⁶ Garcés V, Rodríguez-Nogales A, González A, Gálvez N, Rodríguez-Cabezas ME, García-Martin ML, Gutiérrez L, Rondón D, Olivares M, Gálvez J, Domínguez-Vera JM. *Bioconjugate Chem.* **2018**. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00245.
- ¹⁷ Bansal V, Bharde A, Ramanathan R, Bhargava SK. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, 179-182, 150.
- ¹⁸ Ramanathan R et al. *Langmuir.* **2011**, 27, 714.
- ¹⁹ Sene S, Marcos-Almaraz MT, Menguy N, Scola J, Volatron J, Rouland R, Grenèche JM, Miraux S, Menet C, Guillou N, Gazeau F, Serre C, Horcajada P, Steunou N. *Chem.* **2017**, 3, 303.
- ²⁰ Kolosnjaj-Tabi J, Marangon I, Nicolas-Boluda A, Silva AKA, Gazeau F. *Pharmacol. Res.* **2017**, 126, 123.
- ²¹ Kolosnjaj-Tabi J, Javed Y, Lartigue L, Volatron J, Elgrabli D, Marangon I, Pugliese G, Caron B, Figuerola A, Luciani N, Pellegrino T, Alloyeau D, Gazeau F. *ACS NANO.* **2015**, 9, 7925.
- ²² Aslim B, Beyatli Y, Yuksekdog ZN. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, 41, 973.
- ²³ Robijn GW, Gutiérrez Gallego R, van den Berg DJC, Haas H, Kamerling JP, Vliegthart JFG. *Carbohydr. Res.* **1996**, 226, 203.

- ²⁴ Axelsson L, Ahrné S. Lactic Acid Bacteria. In Priest and FG, Goodfellow M, editors. Applied Microbial Systematics, Kluwer Academic Publishers, **2000**.
- ²⁵ Davis JG. The microbiology of yoghurt. In Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, editors. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press, London, England **1975**.
- ²⁶ Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. *Br. J. Nutr.* **2003**, 90, 449.
- ²⁷ Ghosh SK, Pal T. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4797.
- ²⁸ Wang S, Lawson R, Ray PC, Yu H. *Toxicol. Ind. Health.* **2011**, 27, 547.
- ²⁹ Shareena Dasari T P, Zhang Y, Yu H. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, 4, 1.
- ³⁰ R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, 1247–1248.
- ³¹ Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2739.
- ³² Jans H, Huo Q, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41(7), 2849.
- ³³ Dykman L, Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41(6), 2256.
- ³⁴ Pelaz B, Grazu V, Ibarra A, Magen C, del Pino P, de la Fuente JM. *Langmuir.* **2012**, 28, 8965.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES

El trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. A través de un estudio de biodistribución del probiótico *Lactobacillus fermentum* con nanopartículas de maghemita (MNP-bacteria) en el aparato digestivo de ratas, hemos demostrado que efectivamente este probiótico es un “carrier” ideal para transportar y acumular nanopartículas de maghemita en el intestino, superando el medio químico estomacal. A diferencia de MNP-bacteria, la administración de MNP no permite llegar al intestino puesto que las nanopartículas son mayoritariamente degradadas a nivel estomacal.

2. El ensayo en ratas anémicas ha demostrado que MNP-bacteria es un excelente suplemento de hierro, capaz de restablecer los parámetros de hierro de ratas anémicas a niveles fisiológicos sanos. En concreto, MNP-bacteria restablece los niveles de hierro y hemoglobina en sangre, los niveles de las proteínas DMT1 y ferroportina en enterocitos de intestino y los niveles de hepcidina, la hormona que controla la excreción de hierro del enterocito.

3. Es posible incorporar simultáneamente nanopartículas de maghemita y oro al *Lactobacillus fermentum*, obteniéndose así bacterias con propiedades magnéticas y ópticas. Además, hemos demostrado que esto es posible tanto para nanopartículas de oro esféricas, como rods o prismas.

4. Los estudios de hipertermia magnética y óptica han demostrado que los sistemas en los que el *Lactobacillus fermentum* contiene nanopartículas de maghemita y nanorods o nanoprismas de oro, generan tasas de absorción específica de más de 130 W/g tras exposición a campos magnéticos alternos (hipertermia magnética), y temperaturas de calentamiento del orden de 50 – 70 °C tras irradiación con láser a 1064 nm, longitud de onda cercana a la de la banda SPR de las AuNP (hipertermia óptica).

5. Estudios mediante MRI y TEM han demostrado la internalización de nanopartículas de maghemita en células cancerígenas de colon (HT-29) cuando se incuban estas células con MNP-bacteria. Dicha internalización no tiene lugar cuando en vez de MNP-bacteria se incuban MNP. Esto pone de manifiesto que la presencia del probiótico facilita y promueve la internalización de las nanopartículas que porta. Además, hemos podido demostrar por primera vez que es posible la internalización completa de MNP-bacteria al enterocito, lo que nos permite concluir que *Lactobacillus fermentum* es un nuevo agente de internalización celular.

6. El análisis conjunto de las conclusiones de los dos puntos anteriores permite sugerir que MNP-bacteria puede ser un nuevo fármaco oral para el tratamiento de cáncer de colon.

7. El método desarrollado para la incorporación de nanopartículas al *Lactobacillus fermentum*, es extensible a otros probióticos de tanto impacto en alimentación, como son los responsables de la fermentación de la leche para producir yogur. Además hemos demostrado que la incorporación de nanopartículas de maghemita y de oro a los probióticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, no impide que puedan fermentar leche y producir yogur. De esta forma hemos desarrollado dos nuevos productos: yogur magnético y yogur dorado, que pudieran ser utilizados, al igual que MNP-bacteria, como suplementos de hierro para anémica, como fármacos anticancerígenos por hipertermia, o bien como nuevos ingredientes alimentarios en la novel food.

