

Nanotecnología vs Tuberculosis

Antonio Javier Sánchez Díaz

Resumen— La tuberculosis, enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Aunque actualmente existen métodos de detección y tratamiento de la tuberculosis, estos presentan diversos problemas como escasa solubilidad del fármaco, baja absorción y en muchas ocasiones los tratamientos resultan costosos. La nanotecnología ofrece la oportunidad de mejorar notablemente los métodos de detección, tratamiento y lucha contra cepas multirresistentes. En este artículo se discuten diferentes métodos de detección, en los que se mejoran el tiempo de detección y costes frente a los tradicionales, así como el uso de nanopartículas como adyuvantes de vacunas mejorando la inmunogenicidad de las mismas, diferentes métodos de tratamiento mejorando los actuales y novedosos tratamientos contra cepas multirresistentes.

Palabras Claves— Tuberculosis, nanopartículas, cepas multirresistentes.

1. INTRODUCCIÓN

LA tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium Tuberculosis*, que afecta principalmente a los pulmones y se trasmite de persona a persona a través de pequeñas gotas que son generadas en el aparato respiratorio.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Sólo en 2015, se calcula que 10,4 millones de personas padecieron tuberculosis y, de entre ellas, 1,8 millones murieron por causa directa de esta enfermedad[1]. Aunque existen tratamientos tradicionales, estos presentan problemas como la baja solubilidad y escasa absorción del fármaco. Además, hoy en día, el uso excesivo de antibióticos ha dado lugar a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos.

Debido a los elevados casos de muerte por tuberculosis y a la aparición de cepas multiresistentes, la OMS tiene como objetivo acabar con esta epidemia para el 2030. En esta labor para erradicar la epidemia de la tuberculosis, la nanotecnología ofrece un amplio espectro de posibilidades. Este artículo pretende dar una visión global de las aplicaciones que tiene la nanotecnología en la lucha contra la tuberculosis.

La nanotecnología es una ciencia que ha abierto las puertas al desarrollo de nuevas tecnologías para afrontar nuevos retos. Entre sus muchas aplicaciones, la nanotecnología se está usando para combatir a *Mycobacterium tuberculosis* a tres niveles diferentes: detección, uso como adyuvantes en vacunas y tratamiento.

2. USO DE NANOPARTÍCULAS PARA LA DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS

Los métodos actuales para la detección de la tuberculosis se realizan a través de la prueba cutánea de la tuberculina, tinción del esputo o cultivos de micobacterias procedentes del esputo del paciente. La tinción de esputo por el método de Ziehl-Neelsen detecta a *Mycobacterium Tu-*

berculosis en pocos minutos, pero con una sensibilidad muy baja (30-35%). Los métodos de cultivo en medio sólido suelen tardar en torno de 4 a 8 semanas para confirmar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Si el cultivo se hace en medio líquido el tiempo es de 9-16 días[2]. Todos los métodos son lentos y la mayoría necesitan personal cualificado y materiales costosos. Teniendo en cuenta que la gran parte de los casos de tuberculosis se da en zonas con bajos recursos económicos donde no hay este tipo de medios, la nanotecnología ofrece una mayor sensibilidad, especificidad, reduciendo el coste, el tiempo y la necesidad de tener técnicos cualificados. El campo de la nanotecnología se centra en la preparación de Kits de diagnóstico de la tuberculosis que están actualmente en desarrollo.

2.1. Detección de la tuberculosis mediante un inmunosensor formado por nanopartículas

La detección de la tuberculosis se produce gracias a la formación de un inmunosensor construido por una monocapa de nanopartículas (NPs) oro sobre la cual se une un anticuerpo seguido de un bloqueo con albúmina de suero bovino. Este anticuerpo va dirigido contra el antígeno CFP-10, secretado en las primeras fases de infección por tuberculosis [3]. Una vez que se añade la muestra del paciente y se permite la unión antígeno-anticuerpo, se añaden las NPs de óxido de níquel (NiO). Estas NPs de (30nm de diámetro) están unidas a su vez a un segundo anticuerpo mediante la unión selectiva entre la superficie de la misma y un grupo de histidina pegado al anticuerpo. Este tipo de unión permite la inmovilización orientada y reversible del anticuerpo sobre la superficie de la NP. Este anticuerpo (junto con la NP) se unirá al antígeno formando una estructura tipo sándwich (Figura 1), mejorando la señal del plasmón de superficie de la monocapa de oro. El plasmón de superficie, que consiste en la oscilación colectiva de los electrones de conducción de la NP que, al ser iluminado con una luz de longitud de onda adecuada, amplifica su señal en varios órdenes de magnitud. El plasmón de superficie se puede medir con espectroscopía por resonancia de plasmones superficiales

(SPR)[4]. Este inmunosensor es simple y sensible, con un límite de detección de $0,1\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (es decir, requiere una pequeña cantidad de muestra para su análisis).

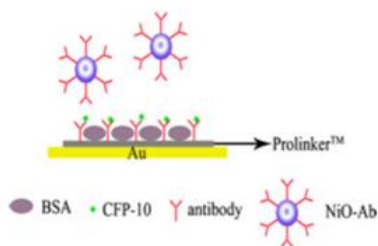


Fig. 1. Representación esquemática de la configuración del sensor. Imagen tomada de referencia [4].

2.2. Nanopartículas de oro sin modificar para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*

Este método reduce costes, tiempo y la necesidad de tener técnicos especializados, a la vez que proporciona alta sensibilidad y especificidad. La muestra se somete a una digestión enzimática de ADN específica de *Mycobacterium Tuberculosis*, si hay presencia de ADN este se corta, se introduce en un tampón de hibridación y se produce la hibridación con oligonucleótidos diana complementarios al ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*. Tras la adición de nanopartículas de oro (AuNPs) cargadas negativamente, se agregan debido a la interacción con los cationes presentes en el tampón de hibridación. Este fenómeno es medible gracias al desplazamiento del plasmón de superficie, desplazando absorbancia de las AuNPs de 520nm a 600nm, produciéndose un cambio visual de color de rojo a azul. En ausencia de la diana de ADN, los oligonucleótidos quedan libres y las bases nitrogenadas se unen a la superficie de las AuNPs exponiendo el esqueleto de fosfato cargado negativamente. Esto provoca una repulsión entre las AuNPs impidiendo el cambio de color. Así pues, si hay ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra, la solución se vuelve azul y si no hay presencia de ADN la solución permanece roja[2].

3. USO DE NANOPARTÍCULAS COMO ADYUVANTES DE VACUNAS

Los adyuvantes son sustancias sin propiedades antigénicas específicas que se administran en las vacunas para aumentar la inmunogenicidad y la eficacia de las mismas. Las sales de aluminio se han usado mucho como adyuvantes tradicionales y se consideran inocuas. El hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) mejora el proceso de captación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígenos en el sitio de la inyección. El $\text{Al}(\text{OH})_3$ activa el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos y secreta un agente proinflamatorio por parte de los macrófagos mejorando la respuesta inmune.

Se ha demostrado que la administración de las NPs de $\text{Al}(\text{OH})_3$ junto con el antígeno poseen una capacidad mayor para estimular una respuesta celular y humoral en comparación con el uso de aluminio tradicional.

Esta capacidad de respuesta se debe a que las NPs de

$\text{Al}(\text{OH})_3$ junto con el antígeno poseen un tamaño de 195nm, lo que permite ser absorbidas por los macrófagos mediante un proceso llamado fagocitosis y endocitosis, en lugar de procesos de macropinocitosis, que es el mecanismo predominante en las vacunas tradicionales. Por este método se consigue secretar niveles más altos de interferón- γ y una mayor respuesta inmune[5].

4. USO DE NANOPARTÍCULAS DIRECTAMENTE CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Las NPs pueden actuar sobre *Mycobacterium tuberculosis*, debido a su gran versatilidad, tanto por medio de la encapsulación de fármacos como por el efecto directo de las propias NPs.

Se ha demostrado que las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) tiene una potente actividad antimicrobiana, pero a su vez, muestra actividad citotóxica en las células monocíticas THP1. Para solventar la alta citotoxicidad de las NPs de ZnO, se mezcló con NPs de Ag, ya que las NPs de Ag poseen una baja citotoxicidad y capacidad de inhibir el crecimiento de agentes microbianos (proporción 8ZnO/2Ag). Este mezcla, adquiere una potente actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* y por el contrario, no tiene ningún efecto sobre las célula THP1, resultando en la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* respetando a las células del paciente[6].

También se puede combatir la tuberculosis mediante la encapsulación de fármacos usando NPs. La Rifampicina (RIF) es un potente fármaco antituberculoso que actúa como inhibidor de ARN polimerasa bacteriana inhibiendo el proceso de transcripción al nivel de iniciación. El problema es que la RIF es un fármaco que posee escasa solubilidad en medio acuoso. La nanotecnología ofrece la posibilidad de mejorar esa escasa solubilidad gracias a revestimientos de polímeros hidrofílicos como el quitosano (CS). El quitosano es un polímero catiónico biodegradable, con baja toxicidad, propiedades mucoadhesivas y con capacidad de penetración de moléculas grandes a través de las mucosas. Las NPs de CS se preparan mediante tecnología de gelificación iónica y después se usan para atrapar la RIF. Para mejorar las propiedades de CS-RIF se añadió a esta unión otro polímero llamado polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y soluble en agua. La unión PEG con CS-RIF cambia el carácter y la superficie de la NP aumentando ligeramente el tamaño y la encapsulación del fármaco. Este conjunto alcanza un tamaño de 210-300nm con un potencial Zeta de 34,1mV mostrando buena estabilidad[7].

Un método novedoso y respetuoso con el medio ambiente para biofabricar NPs de óxido de Zinc (ZnO) por reducción de iones de Zinc es utilizar extracto de hoja de *L. acidissima*, usada en medicina tradicional durante siglos debido a su efecto antimicrobiano entre otras propiedades. El método de biosíntesis de estas nanopartículas a partir de una planta medicinal puede usarse como método respetuoso con el medio ambiente. La solución de NPs de ZnO inhibe el crecimiento de bacterias debido a que las NPs de ZnO inician una reacción de peroxidación de

lípidos que posteriormente causan daño al ADN y afecta a la cadena de transporte de electrones[8].

5. USO DE NANOPARTÍCULAS CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

El uso indebido de fármacos a lo largo de los años han conducido a la aparición de cepas multirresistentes a fármacos usados normalmente contra la tuberculosis. Esto supone la necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos que sean más eficaces que los actuales y que minimicen los efectos secundarios. Una vez más la nanotecnología es una herramienta eficaz para solucionar este problema.

La etionamida (ETH) es un importante fármaco antituberculoso de segunda línea usado en pacientes que son infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes. La necesidad de mejorar su absorción, solubilidad y eficacia, minimizando sus efectos secundarios, plantea el desarrollo de nuevas estrategias. La ETH puede ser encapsulada en NPs y así mejorar sus propiedades. La carga de ETH en NPs de silicio poroso térmicamente carbonizado aumenta su solubilidad, permeabilidad a diferentes valores de pH y aumentando su liberación controlada. La naturaleza de la sinergia de las nanopartículas cargadas con ETH permite el debilitamiento de la pared celular bacteriana mejorando la penetración conjugada[9]. Otro método novedoso para la lucha contra cepas multirresistentes es el uso de las conocidas NPs de Ag. En este método las NPs de Ag se sintetizan biológicamente a través de *R. stolonifer* usando AgNO_3 . La reducción de los iones ocurre a través de agentes reductores liberados en la solución de hongos. La reductasa dependiente de NADH es el principal factor responsable de los procesos de biosíntesis. La reductasa gana los electrones de la NADH y lo oxida a NAD^+ , oxidándose ella misma por la reducción simultánea de los iones metálicos. Se ha comprobado que las NPs de Ag inhiben el crecimiento de muchas cepas resistentes a fármacos gracias a la afinidad de la plata hacia el azufre y el fósforo presente en los microorganismos. También tiene afinidad por los restos de fósforo en la molécula de ADN o por los azufres de las proteínas, lo que conlleva a la inactivación de la replicación del ADN y a la inactivación enzimática[10].

6. CONCLUSIONES

La tuberculosis sigue siendo una de las mayores causas de muerte en el mundo, que se da sobre todo los países subdesarrollados. Los métodos de detecciones y tratamiento actuales resultan costosos y en muchos casos requieren de un personal cualificado. La nanotecnología ofrece la posibilidad de reducir los costes y tiempo de detección de la tuberculosis aprovechando el plasmón de superficie intrínseco de determinadas NPs metálicas y a la formación de sencillos Kits de inmunodetección. La nanotecnología también soluciona los problemas actuales de los tratamientos gracias a la encapsulación de fármacos en

NPs, mejorando la absorción y solubilidad de los tratamientos tradicionales o métodos de tratamiento aprovechando las cualidades de las NPs, así como novedosos métodos de síntesis de NPs respetuosos con el medio ambiente. Además, la nanotecnología ofrece la posibilidad de luchar contra la aparición de cepas multirresistentes y abre la posibilidad al desarrollo de futuras vacunas. En definitiva, el campo de la nanotecnología ofrece mejores opciones de lucha contra la tuberculosis que los tratamientos actuales.

REFERENCIAS

- [1] "OMS | Tuberculosis," WHO, 2017.
- [2] M. M. Hussain, T. M. Samir, and H. M. E. Azzazy, "Unmodified gold nanoparticles for direct and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex," *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 7, pp. 633-637, 2013.
- [3] A.-R. Shin *et al.*, "Improved Sensitivity of Diagnosis of Tuberculosis in Patients in Korea via a Cocktail Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Containing the Abundantly Expressed Antigens of the K Strain of *Mycobacterium tuberculosis*," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1788-1795, Dec. 2008.
- [4] H. Chen *et al.*, "Sensitive detection of tuberculosis using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance," *Microchim. Acta*, vol. 180, no. 5-6, pp. 431-436, Apr. 2013.
- [5] Y. Amini, B. Moradi, and M. Fasihi-Ramandi, "Aluminum hydroxide nanoparticles show strong activity to stimulate Th-1 immune response against tuberculosis," *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, pp. 1-5, Sep. 2016.
- [6] A. R. Jafari *et al.*, "Mixed metal oxide nanoparticles inhibit growth of *Mycobacterium tuberculosis* into THP-1 cells," *International Journal of Mycobacteriology*, vol. 5, pp. S181-S183, 2016.
- [7] M. Rajan and V. Raj, "Encapsulation, characterisation and in-vitro release of anti-tuberculosis drug using chitosan - poly ethylene glycol nanoparticles," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 255-259, 2012.
- [8] B. N. Patil and T. C. Taranath, "Limonia acidissima L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*," *Int. J. Mycobacteriology*, vol. 5, no. 2, pp. 197-204, 2016.
- [9] N. Vale *et al.*, "Preparation and biological evaluation of ethionamide-mesoporous silicon nanoparticles against *Mycobacterium tuberculosis*," 2017.
- [10] A. Banu, "Biosynthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles and their Activity against *Mycobacterium tuberculosis*," *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.*, vol. 3, no. 1, pp. 1-5, 2013.



Antonio Javier Sánchez Díaz recibió el título de Graduado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2016. Actualmente es estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.