

LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA IMPIDEN EL CRECIMIENTO BACTERIANO SIN EFECTOS TÓXICOS EN EL SEMEN DE CERDO

SILVER NANOPARTICLES PREVENT BACTERIAL GROWTH WITHOUT TOXIC EFFECTS ON SWINE SEMEN

López-Pérez R.¹, Acosta-Torres L.S.², Serrano-Díaz P.², Avilés-López Y.S.¹,
Toscano-Torres I.A.¹, Olivo-Zepeda I.B.¹, Pérez-Duran F.¹, Núñez-Anita R.E.^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo., Michoacán, México.

*re.nunez.anita@gmail.com.

²Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León. Universidad Nacional Autónoma de México., León Guanajuato, México.

Keywords: Artificial insemination; sperm; biocide.

Palabras clave: Inseminación artificial, espermatozoide, biocida.

ABSTRACT

The success of artificial insemination depends on safety and seminal quality. Contaminant bacteria in the ejaculate have been associated with decreased sperm viability, increased sperm aggregation, and seminal pH variations. Silver nanoparticles (AgNPs) could be an alternative to the use of antibiotics because of their known biocidal effect, and no bacterial resistance has been reported. The aim of this work was to perform a dose-response analysis using AgNPs in suspension (obtained by reduction of silver ions), to evaluate their antimicrobial effect and toxicity in swine spermatozoa. We determined the antimicrobial activity in isolates of contaminating bacteria of the semen. Methodology: Sperm viability was evaluated through the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. *S. aureus* was isolated from ejaculates. Toxicity/sensitivity was analyzed at concentrations of 0, 2, 4, 10 and 20 mM of AgNPs. The antibiotics Streptomycin [10 µg / ml], Amikacin [30 µg / ml] and Tetracycline [10 µg / ml] were included as controls. The biocidal effect was analyzed through bacterial growth in liquid and solid culture medium. The results showed that AgNPs inhibit *S. aureus* growth at concentrations higher than 4mM of AgNPs. None of the levels of AgNPs is cytotoxic in spermatozoa. Conclusion: AgNPs could be used in the prevention of bacterial growth in samples destined for the storage and preservation of swine germplasm without toxic effects.

RESUMEN

El éxito de la inseminación artificial depende de la inocuidad y calidad seminal. Las bacterias contaminantes del eyaculado, se han asociado a la disminución de la viabilidad de los espermatozoides, el aumento de la agregación de los espermatozoides y cambios del pH seminal. Las nanopartículas de plata (AgNPs) podrían ser una alternativa al uso de antibióticos por su conocido efecto biocida, además no se ha reportado resistencia bacteriana. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis dosis-respuesta utilizando AgNPs en suspensión (obtenidas por reducción de iones plata), para evaluar el efecto antimicrobiano y la toxicidad en espermatozoides de cerdo. De hecho, la actividad antimicrobiana de AgNPs se analizó en bacterias aisladas del

semen. Metodología: Se evaluó la viabilidad de los espermatozoides a través del ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). A partir de eyaculados se aisló *S. aureus*. Se analizó la toxicidad/sensibilidad a las AgNPs en concentraciones de 0, 2, 4, 10 y 20 mM. Se incluyeron como controles los antibióticos Estreptomina [10 µg/ml], Amikacina [30 µg/ml] y Tetraciclina [10 µg/ml]. El efecto biocida se analizó a través del crecimiento bacteriano en medio de cultivo líquido y sólido. Los resultados mostraron que las AgNPs inhiben el crecimiento de *S. aureus* a partir de la dosis 4 mM. También, muestran que ninguna de las dosis empleadas de AgNPs es citotóxica en espermatozoides. Conclusión: Los resultados sugieren que las AgNPs podrían ser utilizadas en la prevención del desarrollo bacteriano sin efectos tóxicos en semen de cerdo. Esto podría implicar un potencial uso de las AgNPs en los sistemas de almacenamiento y preservación del semen.

INTRODUCCIÓN

La contaminación bacteriana en muestras de semen destinado a la inseminación artificial favorece la aglutinación de los espermatozoides, la baja motilidad del espermatozoide, variaciones en el pH seminal e incluso enfermedades en la hembra que se someterá al proceso de inseminación. La contaminación por bacterias ocurre cuando la muestra está expuesta al ambiente, ya sea por las bacterias que se encuentren en el prepucio del animal o un mal manejo al momento de extraer la muestra, en consecuencia, se afecta la calidad y la longevidad del esperma y se reduce la fertilidad. Es necesario añadir antibióticos tanto a los diluyentes, como a los medios de transporte del semen para evitar el crecimiento bacteriano y así evitar el deterioro de la calidad del eyaculado. Bacterias tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella spp* y *Pseudomona auriginosa* son algunas de las bacterias que se han reportado como contaminantes del semen de cerdo (Pineda *et al.*, 2007). Debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos, se han propuesto alternativas al uso de antibióticos. Diversos autores han demostrado el efecto biocida de las AgNPs, las cuales interactúan con los microorganismos a través de una serie de mecanismos que aún no están estudiados en detalle. Algunos de los mecanismos antimicrobianos propuestos incluyen interacción directa bacteria-AgNPs y por tanto la interrupción de la transferencia de electrones de la membrana; además de la penetración en la membrana celular bacteriana, así como la producción de metabolitos secundarios tales como especies reactivas de oxígeno, además de iones de metales pesados, que causan daño al microorganismo. Debido a la variedad de mecanismos de acción que presentan las AgNPs y su baja posibilidad de generar resistencia, han sido estudiadas en células somáticas como los fibroblastos y los linfocitos en los que no se han reportado efectos tóxicos (Acosta-Torres *et al.*, 2012). La acción biocida de las AgNPs se ha demostrado empleando diferentes bacterias, entre ellas *S. aureus* (Ortíz-Gil *et al.*, 2015). Con respecto a la toxicidad de las AgNPs en células somáticas se ha demostrado que depende de varios aspectos: el tamaño, nanopartículas de tamaño menor a 10 nm son más tóxicas; la forma, las formas amorfas son más tóxicas comparadas con las esféricas; la dosis; la vía de administración, la vía sistémica e inhalada se asocia a mayor toxicidad comparado con otras vías; la forma de administración, las nanopartículas en suspensión suelen ser más tóxicas que las AgNPs presentes en recubrimientos de superficies (Nuñez-Anita *et al.*, 2014; Acosta-Torres *et al.*, 2012). La toxicidad de las AgNPs es poco estudiada en células germinales como los espermatozoides. Se ha reportado que las AgNPs son tóxicas en espermatozoides de ratón (0.1 µg / ml, equivalente a 0.00092 mM y 50 µg / ml, equivalente a 0.46 mM) (Yoisungnern *et al.*, 2015) y en espermatozoides de rata también mostraron ser tóxicas (5 mg/kg y 10 mg/kg, equivalente a 57 mM y 114 mM respectivamente) (Gromadzka-Ostrowska *et*

al., 2012), por el contrario, no mostraron toxicidad en espermatozoides de humano (30, 60, 125, 250 y 500 μM) (Moretti *et al.*, 2013). En este trabajo por primera vez se analiza la toxicidad de las AgNPs en espermatozoides de cerdo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo: Un total de cinco sementales en etapa reproductiva (de entre 2-4 años de edad) clínicamente sanos de la raza York, fueron empleados para la obtención de muestras de semen para el aislamiento de microorganismos. Tres muestreos fueron empleados para las pruebas de toxicidad en los que se determinó una viabilidad microscópica promedio de 73.3 % con $\pm\text{DS}$ 2.88, evaluada por un mismo experimentador, la cual se determinó paralelamente a los ensayos de toxicidad. La concentración espermática aproximada de las muestras de semen fue de aprox. $6 \times 10^{10}/\text{dL}$, de acuerdo al conteo con cámara de Neubauer.

Determinación de la concentración de AgNPs: Se calculó la concentración de AgNPs obtenidas por reducción de iones plata descritas por Serrano-Díaz *et al.* (2016), a través de una curva de calibración con AgNPs comerciales (SIGMA, Ref 736481) seguido de la medición espectrofotométrica a 420 nm en un Nanodrop, Thermo Scientific. **Pruebas microbiológicas:** Las muestras de semen fresco se sembraron en medios selectivos (Agar Mc Conkey; Agar infusión cerebro corazón; Agar Baird Parker, BD BIOXON®) y medios de cultivo enriquecidos (Agar chocolate y Agar Sangre, BD BIOXON®) para aislamiento de bacterias. Seguido de incubación a 37°C. 24 h después se realizó la revisión macroscópica para identificar las colonias desarrolladas en cada medio de cultivo de acuerdo a su forma, borde y elevación. Una vez identificadas las distintas colonias presentes en cada medio, se realizó el aislamiento de cada una de ellas en medio líquido de Luria Bertani (LB Broth, Miller (Luria-Bertani) - DIFCO® Dehydrated Culture Media), preparado según las especificaciones del fabricante. Los tubos con el medio y la bacteria aislada se incubaron en agitación a 180 rpm durante 24 h, para posterior tinción de Gram. Las pruebas bioquímicas para identificación fueron: Catalasa, Coagulasa, Citrato, Sal y manitol, Ureasa e Indol. El inóculo se utilizó cuando se alcanzó una absorbancia entre 0.008-0.1 a 625nm, equivalente a 0.5 en la escala de Mc Farland correspondiente a 108 UFC/ml. Para las pruebas de actividad antibacteriana se utilizó el inóculo de la bacteria *S. aureus* en placa de 96 pocillos y se adicionaron las AgNPs 2, 4, 10, 20 mM. Para los controles se utilizaron los antibióticos Estreptomina [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$], Amikacina [30 $\mu\text{g}/\text{ml}$], Tetraciclina [30 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. Seguido de agitación a 180 rpm por 24 horas a 37°C. Referente a las pruebas de crecimiento bacteriano en medio líquido se llevó a cabo la lectura de turbidez en el equipo VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 350 nm. Por otro lado, para las pruebas en medio sólido se tomó un inóculo a partir de las pruebas en medio líquido y se estiraron placas con agar LB.

Pruebas de toxicidad: El ensayo de MTT, se fundamenta en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (color amarillo), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas. Dicho método es frecuentemente empleado para medir sobrevivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Brevemente, en placas de 96 pocillos se depositaron 100 μl de la muestra de semen fresca sin diluir. Inmediatamente, se adicionaron las AgNPs utilizando las mismas concentraciones empleadas para las pruebas microbiológicas. Seguido de adición de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de reactivo (MTT) por pocillo. Seguido de incubación a 37°C, 5 % de CO_2 y humedad relativa de 95 %, durante 1 hora. Después se descartó el medio centrifugando en dos ciclos de 5 min a 2500 rpm y se adicionaron 100 μL de dimetil sulfoxido

(SIGMA) para solubilizar los cristales de formazan. La lectura de densidad óptica (D.O) se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. El porcentaje de viabilidad se calculó con la fórmula: % de Viabilidad=D.O células tratadas x 100/D.O células control. Los valores del % de viabilidad representan la media aritmética del cuadruplicado de cada experimento y se expresan como \pm DS.

Análisis estadístico: Los datos representan los resultados de por lo menos tres experimentos independientes por cuadruplicado, particularmente en los ensayos de toxicidad para cada experimento se obtuvo la muestra de semen de cerdo fresco sin diluir. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron analizadas con ANOVA de una vía y prueba pos hoc de Tukey. Las diferencias con valor de $P \leq 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Se utilizó el software GraphPad Prism V5.

RESULTADOS

Respecto a la cuantificación de AgNPs, la curva de calibración de AgNPs mostró una correlación lineal de 0.999, por lo tanto, de acuerdo a la ecuación de la recta se calculó la concentración de AgNPs, ver Figura 1.

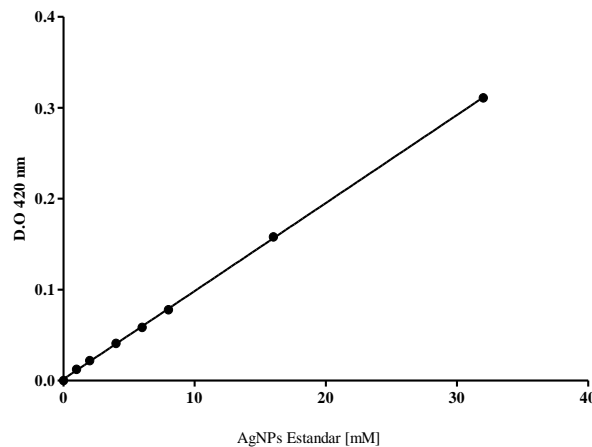


Figura 1. Curva de calibración de AgNPs utilizando AgNPs estándar (*Calibration curve of AgNPs employed AgNPs standar*).

Las AgNPs utilizadas son de morfología esférica con un tamaño de partícula de 10 a 25 nm y fueron descritas en trabajos anteriores (Serrano-Díaz *et al.*, 2016). Por otro lado, se probaron diferentes concentraciones de AgNPs para evaluar el efecto antimicrobiano contra *S. aureus* Figura 2, se observó una reducción en la turbidez en los tratamientos de AgNPs 2, 4 10 y 20 mM y en los antibióticos Estreptomicina y Amikacina, medida a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 350 nm, lo que sugiere la reducción del crecimiento bacteriano. Mientras que el tratamiento con Tetraciclina no fue tan efectivo. De acuerdo a estos resultados el tratamiento con AgNPs 2 mM tiene un efecto comparable a los antibióticos Estreptomicina y Amikacina. En tanto que, la prueba en medio sólido mostró ser más sensible, debido a que se observa crecimiento bacteriano en el tratamiento con AgNPs 2 mM, y se confirma el crecimiento bacteriano en el tratamiento con tetraciclina, ver Figura 3. Las líneas punteadas en la Figura 3.

Las AgNPs utilizadas resaltan las condiciones en las que se observó crecimiento bacteriano. Sin embargo, es importante mencionar que la prueba en medio sólido es cualitativa.

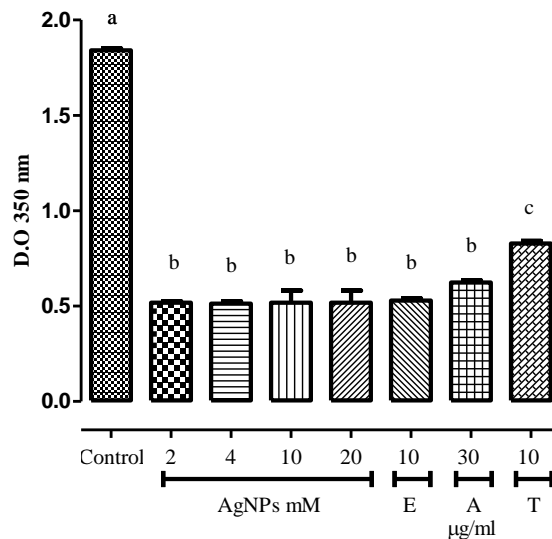


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* en medio líquido. Se evaluó el crecimiento bacteriano a través de la turbidez a 350 nm. Se utilizaron AgNPs en concentraciones de 0, 2, 4, 10 y 20 mM. También se incluyeron como controles, E, estreptomycin; A, amikacina y T, tetraciclina. Las letras diferentes representan diferencias significativas. (*Growth of S. aureus in liquid medium. Bacterial growth was evaluated through turbidimetry at 350 nm. AgNPs were used at 0, 2, 4, 10 and 20 mM concentrations. Whereas: E, streptomycin; A, amikacin and T, tetracycline were included as controls. The different letters represent significant differences.*)

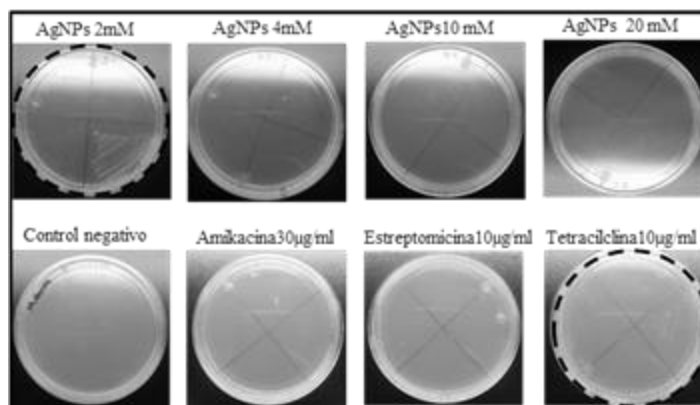


Figura 3. Crecimiento de *S. aureus* en medio sólido. El crecimiento bacteriano en medio sólido se estimó a partir del crecimiento bacteriano en medio líquido, se inoculó en forma de estría, seguido de incubación durante 24 h. Se muestra crecimiento en estría. Las líneas punteadas indican crecimiento bacteriano. (*Growth of S. aureus in solid medium. Bacterial growth in solid medium was estimated from bacterial growth in liquid medium, inoculated as a streak, followed by 24 h of incubation. Streak growth is shown. Dotted lines indicate bacterial growth.*)

Por lo tanto, se propone que ambas pruebas son complementarias. Con respecto a la toxicidad de AgNPs en espermatozoides de cerdo, los datos muestran que espermatozoides tratados mantienen la viabilidad en todos los tratamientos analizados, con respecto a los no tratados. Los resultados muestran que las AgNPs empleadas no son citotóxicas en espermatozoides de cerdo (Figura 4).

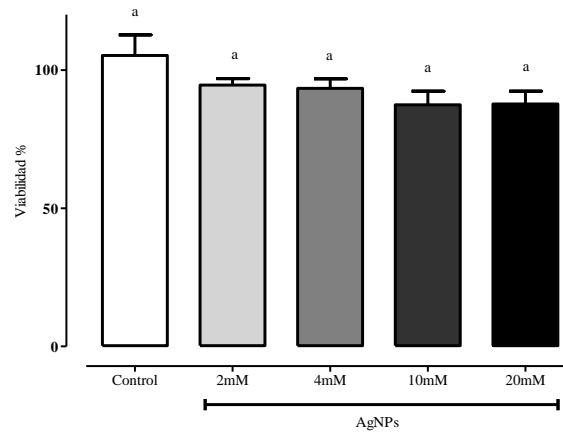


Figura 4. Viabilidad de los espermatozoides. Se determinó el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides a través del ensayo MTT. Los tratamientos fueron a las concentraciones de AgNP's de 0, 2, 4 10 y 20 mM, seguido de incubación durante 1 h. No se observaron diferencias significativas. (*Sperm viability. The percentage of sperm viability was determined through to MTT assay. Sperms were treated with AgNPs at 0, 2, 4 10 and 20 mM concentrations, followed by 15 min of incubation. No significant differences were observed.*)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

A partir de las muestras de eyaculado se aisló *S. aureus*, cuya identidad fue confirmada por pruebas bioquímicas, se realizaron pruebas microbiológicas, por un lado, se realizaron pruebas en medio líquido que nos permitieron determinar la actividad antibacteriana mediante la medición de la turbidez, la prueba en medio líquido sugiere que a partir de 2 mM se inhibe el crecimiento de *S. aureus*. Por otro lado, las pruebas en medio sólido muestran que la dosis mínima inhibitoria es de 4 mM. Tomando en cuenta ambas pruebas, se propone que a partir de 4 mM de AgNPs se inhibe el crecimiento de *S. aureus* y dicha inhibición es comparable con los antibióticos Amikacina y Estreptomycin, en tanto que *S. aureus* mostró resistencia a tetraciclina. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos en la literatura en los que se ha demostrado el efecto biocida de las AgNPs con las características físicas y químicas de las AgNPs utilizadas en este trabajo (Ortíz-Gil *et al.*, 2015; Acosta-Torres *et al.*, 2012). Además, por primera vez se demostró la citocompatibilidad de AgNPs en espermatozoides de cerdo. Aún con el tratamiento con la dosis de 20 mM se mantuvo la viabilidad del semen de cerdo, la cual podría considerarse alta comparada con las dosis reportadas por otros autores quienes analizaron la toxicidad de AgNPs en espermatozoides de humano y coinciden en que las AgNPs no mostraron ser tóxicas (Moretti *et al.*, 2013). Estos datos son relevantes considerando la sensibilidad de los espermatozoides al daño causado por bacterias contaminantes. Los resultados sugieren que las AgNPs podrían ser utilizadas en la prevención del desarrollo bacteriano sin efectos tóxicos en semen de cerdo. Esto podría implicar un potencial uso de las AgNPs en los sistemas de almacenamiento y preservación del semen como una alternativa al uso de antibióticos. En nuestro laboratorio se llevan a cabo

experimentos para determinar otros aspectos de la calidad seminal en presencia de las AgNPs en suspensión o en recubrimiento de superficies.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento parcial para la realización del presente trabajo: Donativos: Proyecto PAPIIT-UNAM IN225516 y Proyecto de Infraestructura científica CONACYT INFR-2015-01 255010.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Torres, L., Mendieta, I., Nuñez-Anita, R.E., Cajero-Juárez, M., Castaño, V.M. (2012). Cytocompatible antifungal acrylic resin with silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 4777-4786.
- Braydich-Stolle, L. K., Lucas, B., Schrand, A., Murdock, R. C., Lee, T., Schlager, J. J., Hofmann, M. C. (2010). Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicological Sciences*, 116(2), 577–589. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq148>.
- Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Kruszewski, M. (2012). Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 214(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.028>.
- Moretti, E., Terzuoli, G., Renieri, T., Iacoponi, F., Castellini, C., Giordano, C., Collodel, G. (2013). In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia*, 45(6), 392–396. <https://doi.org/10.1111/and.12028>.
- Núñez-Anita, R. E., Acosta-Torres, L. S., Vilar-Pineda, J., Martínez-Espinosa, J. C., De la Fuente-Hernández, J., Castaño, V. M. (2014). Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 3999–4006. <https://doi.org/10.2147/IJN.S63064>.
- Ortiz-Gil, M. Á., Nuñez-Anita, R. E., Arenas-Arocena, M. C., Martínez-Alvarado, O., Emiliano-Ramírez, J., De la Fuente-Hernández, J., Acosta-torres, L. S. (2015). Silver nanoparticles for the inhibition of *Staphylococcus aureus* Las nanopartículas de plata inhiben el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Entreciencias diálogos en la sociedad del conocimiento*.3(7), 133–142. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5043.6324>.
- Pineda, Y., Santander, J. (2007). Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 25(3), 173-177.
- Serrano-Díaz, P., Campos, P., Ruíz-Medina, A.I., Nuñez-Anita, R.E., De la Fuente, J., Acosta-Torres, L.S. (2016). Actividad antimicrobiana de un cemento sellador modificado con micro y nanopartículas. *Memorias de Magno Evento AMEAC Endolatinos*, Querétaro, Qro. México.
- Yoisungnarn, T., Choi, Y.-J., Han, J. W., Kang, M.-H., Das, J., Gurunathan, S. Kim, J.H. (2015). Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Scientific Reports*, (5), 11170. <https://doi.org/10.1038/srep11170>.