

## Artículo original

## Nanopartículas derivadas de válvula aórtica: sin evidencias de vida

Ignasi Barba<sup>a,\*</sup>, Eduardo Villacorta<sup>a,b</sup>, Miguel-Angel Bratos-Perez<sup>c</sup>, Maria Antolín<sup>d</sup>, Encarna Varela<sup>d</sup>, Pedro Luís Sanchez<sup>b</sup>, Pilar Tornos<sup>a</sup> y David Garcia-Dorado<sup>a</sup><sup>a</sup> Institut de Recerca, Àrea del Cor, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España<sup>b</sup> Servicio de Cardiología, Hospital General Gregorio Marañón, Madrid, España<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Facultad de Medicina, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España<sup>d</sup> Institut de Recerca, Servei Digestiu, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

## Historia del artículo:

Recibido el 25 de noviembre de 2011

Aceptado el 15 de marzo de 2012

On-line el 28 de junio de 2012

## Palabras clave:

Válvulas

Infección

Nanobacteria

Perfil metabólico

Nanopartículas calcificantes

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** Las nanopartículas calcificantes, también conocidas como nanobacterias, son estructuras, similares a las bacterias, de reducido tamaño (0,1-0,5  $\mu\text{m}$ ) que tienen la capacidad de facilitar la precipitación y el crecimiento de fosfato cálcico en condiciones patológicas y a las que se ha asociado con la calcificación de la válvula aórtica. La clasificación de las nanobacterias como organismos no está exenta de controversia; algunos autores apuntan que son una nueva clase de organismo vivo, mientras que otros las describen como complejos mineraloproteicos. El objetivo del trabajo es clarificar si las nanopartículas calcificantes son entes vivos basándonos en si tienen o no actividad metabólica, característica de los seres vivos independiente de su composición.

**Métodos:** Las nanopartículas calcificantes se cultivaron a partir de seis válvulas aórticas seleccionadas aleatoriamente de entre 84 válvulas aórticas explantadas consecutivamente, como se ha descrito en la literatura. Se obtuvieron espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los medios de cultivo de las nanopartículas calcificantes para evaluar posibles cambios metabólicos; mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se investigó la presencia de 16sRNA.

**Resultados:** A las 6 semanas de cultivo, la presencia de nanopartículas calcificantes se observa claramente como una monocapa unida a la superficie del frasco de cultivo. Todas las muestras resultaron negativas para la presencia de 16sRNA, lo que descartó la presencia de bacterias conocidas en los cultivos. Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN no mostraron diferencias entre los cultivos de nanopartículas calcificantes y medio de cultivo estéril en las mismas condiciones.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que no se puede considerar organismos vivos a las nanopartículas calcificantes.

© 2012 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Aortic Valve-derived Calcifying Nanoparticles: No Evidence of Life

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Calcifying nanoparticles, also known as "nanobacteria," are very small bacteria-like structures (0.1-0.5  $\mu\text{m}$ ) with the ability to facilitate the precipitation and growth of calcium phosphate in pathological conditions and have been associated with aortic valve calcification. The status of nanobacteria is controversial; some have proposed that they are a new class of living organism while others describe calcifying nanoparticles as mineralo-fetuin complexes. The objective of the present study is to elucidate if calcifying nanoparticles are living entities, based on whether or not they have metabolic activity, a characteristic of life, irrespective of their composition.

**Methods:** Calcifying nanoparticles were grown from 6 different valves randomly chosen among 84 consecutively explanted aortic valves, as described in the literature. The  $^1\text{H}$ -NMR spectra were acquired from calcifying nanoparticles culture media to assess metabolic changes and the presence of 16sRNA in the culture media was investigated by real-time polymerase chain reaction.

**Results:** After 6 weeks in culture, calcifying nanoparticles could be seen clearly attached to the surface of culture flasks. All samples were negative for 16sRNA, discarding the presence of known bacteria.  $^1\text{H}$ -NMR spectra showed no difference between calcifying nanoparticles and 6-week-old sterile culture media maintained under the same conditions.

**Conclusions:** Our results show that calcifying nanoparticles cannot be considered as living organisms.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

© 2012 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Keywords:

Valves

Infection

Nanobacteria

Metabolic profiling

Calcifying nanoparticles

\* Autor para correspondencia: Institut de Recerca, Àrea del Cor, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, España.

Correo electrónico: [ignasi.barba@vhir.org](mailto:ignasi.barba@vhir.org) (I. Barba).

## Abreviaturas

CNP: nanopartículas calcificantes  
RM: resonancia magnética

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad degenerativa de la válvula aórtica, un trastorno progresivo caracterizado por una calcificación distrófica de las cúspides valvulares y un estrechamiento del orificio valvular aórtico<sup>1</sup>, es la valvulopatía más frecuente y una causa importante de mortalidad y morbilidad. Cada vez es mayor la evidencia de que el grado de calcificación de la válvula está correlacionado con una progresión más rápida de la enfermedad y peor evolución clínica<sup>2</sup>. Los depósitos de calcio valvulares contienen tanto calcio y fosfato como hidroxapatita, la forma mineral de fosfato cálcico presente tanto en el tejido arterial calcificado como en el hueso<sup>3</sup>.

El término «nanobacteria» es un neologismo introducido por el Dr. Kajander para designar a unos organismos muy pequeños, similares a bacterias. El tamaño extremadamente pequeño (0,1-0,5 µm) y la capacidad de facilitar la precipitación y el crecimiento del fosfato cálcico en condiciones fisiológicas son las características principales de estas partículas, a las que se denomina también nanopartículas calcificantes (CNP, por sus siglas en inglés)<sup>4</sup>. Esta singularidad fomentó la idea de que las nanobacterias podían estar relacionadas con enfermedades ligadas a los depósitos de calcio. La presencia de CNP se ha descrito en una gran variedad de enfermedades, como estenosis aórtica<sup>5</sup> y calcificación arterial<sup>6</sup>. La inyección intravenosa de CNP en animales indujo una biocristalización acelerada de oxalato cálcico monohidrato<sup>7,8</sup>.

La condición que debe atribuirse a las CNP sigue en discusión, y ha impulsado una de las mayores controversias de la microbiología moderna<sup>4,6,9,10</sup>. Algunos investigadores han apuntado que se trata de una nueva clase de organismos vivos, ya que parece que estas CNP se autorreplican en cultivo<sup>11</sup>, son capaces de incorporar uridina marcada radiactivamente, se ha documentado una respuesta inmunitaria potente contra ellas<sup>12,13</sup> y causan la muerte celular *in vitro*<sup>4,6,11,14</sup>. La mayor parte de los estudios en los que se ha buscado evidencia de vida en las CNP se han centrado en elementos estructurales, mediante la búsqueda de ácidos nucleicos o proteínas relacionadas con ellas, hasta ahora sin resultados concluyentes<sup>15,16</sup>. En artículos recientes se han descrito las CNP como complejos de mineralofetuininas<sup>10,12</sup>. Sin embargo, al menos en el caso de las CNP derivadas de válvulas cardíacas, la condición de organismos vivos aún está en discusión<sup>17</sup>.

Sean cuales fueren su naturaleza y su composición química, los organismos vivos «preservan su orden interno tomando del entorno energía libre, en forma de nutrientes o luz solar, y devolviendo al entorno una cantidad igual de energía en forma de calor y entropía»<sup>18</sup>. En otras palabras, la presencia de actividad metabólica podría aportar, de por sí, prueba de la existencia de vida. La búsqueda de nuevas formas de vida ha adquirido especial relevancia tras el inicio de la exploración del espacio, ya que un objetivo principal de estos programas es identificar características distintivas que indiquen actividad metabólica. Por ejemplo, a comienzos de los años setenta, la búsqueda de vida recibió un nuevo impulso, en especial en el programa Viking de exploración de Marte, que incluyó experimentos diseñados para buscar vida en la superficie de Marte basándose en la actividad metabólica<sup>19</sup>.

En el caso de las CNP cultivadas, el origen de la energía debe ser químico, procedente de los nutrientes en el medio de cultivo. En

otras palabras, deben poseer algún tipo de actividad metabólica. Actualmente, la única referencia sobre el metabolismo de las CNP es que tienen «escasa actividad metabólica»<sup>20</sup>. La metabolómica, al ser un enfoque que no utiliza hipótesis, es ideal para un estudio de este tipo, puesto que es capaz de detectar cambios en muchos metabolitos sin disponer de ningún conocimiento previo sobre qué metabolitos podrían estar involucrados.

El objetivo del presente trabajo es investigar el posible origen biológico de las CNP analizando los perfiles metabólicos de <sup>1</sup>H-RMN de medios de cultivo de CNP.

## MÉTODOS

### Válvulas aórticas

Se obtuvieron válvulas aórticas de 84 pacientes a los que se practicó una sustitución valvular a causa de una valvulopatía aórtica sintomática. Las válvulas se obtuvieron de forma consecutiva entre enero de 2004 y julio de 2005. Los criterios de exclusión fueron la estenosis aórtica congénita y la válvula aórtica bicúspide. Se seleccionaron aleatoriamente seis válvulas aórticas con cultivo positivo del conjunto del grupo para el posterior análisis de espectroscopia por resonancia magnética (RM). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético y el Comité de Investigación del hospital. Ninguno de los pacientes evaluados inicialmente para la inclusión en el estudio rechazó participar.

Se realizó una evaluación ecocardiográfica con un dispositivo Vivid 3 (General Electric; Massachusetts, Estados Unidos) equipado con un transductor de 1,5-3 MHz, empleando técnicas de obtención de imagen estandarizadas. Se determinó la velocidad máxima a través de la válvula mediante Doppler de onda continua. Se calculó el área de la válvula aórtica con la ecuación de continuidad. Se evaluó también el grado de calcificación de la válvula aórtica, que se clasificó como leve (ausencia de calcificación o manchas calcificadas aisladas y pequeñas) o grave (manchas más grandes multiplaca o engrosamiento amplio y calcificación de todas las cúspides de la válvula aórtica)<sup>21</sup>.

### Cultivo de nanopartículas

Se seleccionaron aleatoriamente seis válvulas aórticas, que se cultivaron con un método descrito con anterioridad<sup>5</sup>. De forma resumida, las válvulas se dividieron en dos partes, una de las cuales se congeló a -80 °C para el futuro análisis, mientras que la otra se trituró en un mortero de vidrio estéril. Se realizaron cultivos primarios mediante desmineralización de las válvulas con la adición de HCl 1 M, que se neutralizó luego con NaOH 1 M. El producto resultante se filtró con un filtro de poros de 0,22 µm y se cultivó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de suero bovino fetal sometido a irradiación gamma, a 37 °C y en una atmósfera con un 5-10% de CO<sub>2</sub>. Una vez establecido el cultivo, se realizaron pases posteriores en DMEM sin contenido de suero de ternera fetal. Todos los medios de cultivo utilizados tenían una antigüedad de al menos cinco pases. Después de una incubación de 6-8 semanas en cultivo, se utilizó medio recién preparado para la espectroscopia por RM y se congeló en condiciones estériles para un posterior análisis mediante reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Las válvulas no calcificadas no dan lugar a crecimiento de CNP. Como control, utilizamos medios estériles mantenidos en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo que los cultivos de CNP.

## Espectroscopia

Los medios de los cultivos de CNP se obtuvieron en condiciones estériles y se diluyeron en proporción 1:1 en óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O) antes de la espectroscopia por RM.

Se obtuvo el espectro de RM del cultivo en un imán vertical a 400 MHz equipado con una sonda de 5 mm conectada a un espectrómetro Bruker Avance (Bruker; Madrid, España). Se utilizaron secuencias de pulso y adquisición unidimensionales, precedidas de una secuencia 3-9-19 WATERGATE para reducir la señal del agua; cada espectro se formó por la acumulación de 64 exámenes y tuvo una duración de aproximadamente 6 min. En algunas muestras se obtuvieron espectros bidimensionales de espectroscopia de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y de coherencia de cuanto único heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C para fines de asignación de los picos. Todos los espectros se obtuvieron a 30 °C.

## Identificación de patrones

Para la identificación de patrones, se digitalizaron los espectros de RM unidimensional en 1.000 elementos, se eliminó el área que contenía los picos de agua residuales de entre 4,25 y 5,25 ppm, y se introdujeron los espectros resultantes en el programa informático SIMCA-P (Umetrics; Umeå, Suecia) según lo descrito con anterioridad<sup>22</sup>. Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) de la base de datos de los espectros, que permitió una reducción del número de variables (picos de RM o metabolitos en nuestro caso) en vectores ortogonales, y por tanto independientes, según las fuentes de variación, de tal manera que cada vector correspondiera a una fuente de variación en orden descendente.

Dado que el ACP es un método no supervisado, no comporta introducción de datos por el observador, y las muestras se agrupan únicamente en función de las fuentes de variación existentes en el conjunto de datos; este es el enfoque carente de sesgo que preferimos para detectar cualquier posible cambio de los espectros relacionado con actividad metabólica.

## Reacción en cadena de polimerasa de 16sRNA

Con objeto de determinar la presencia de bacterias en las CNP, se descongeló el medio y se sometió, en condiciones estériles, a una RT-PCR de la región hipervariable V4 del gen del 16SrRNA bacteriano. Las regiones V4 (290 pb) se amplificaron usando cebadores universales situados en secuencias de la región V4 con una alta conservación: V4 F (5'-GCC AGC AGC CGC GGT AA-3') y V4R\_805\_19 (5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA T-3'). Elegimos estos cebadores de entre diversos pares comúnmente mencionados en la literatura, porque se correspondían con la mayoría de las secuencias bacterianas depositadas en el *Ribosomal Database Project*<sup>23</sup>. Se analizó la válvula cultivada y el medio DMEM descongelado antiguo (control negativo) utilizando un método de diseño ciego. Para generar una curva estándar, se utilizaron las cantidades calculadas de un plásmido linealizado, en el que se había introducido la región V4 de una bacteria de control. Se determinó la concentración del plásmido con el empleo de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nucliber), y se calculó el número de copias del plásmido a partir del peso molecular de este. Se amplificaron diluciones seriadas del plásmido de entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>7</sup> para poder extrapolar el número de bacterias de cada muestra. Además, se determinaron los controles positivos y negativos en paralelo en cada tanda de análisis. Se llevó a cabo una amplificación y detección del ADN mediante RT-PCR con el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, California, Estados Unidos) utilizando placas de 96 pocillos de grado óptico. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl utilizando

un Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) con un contenido de 100 nM de cada uno de los cebadores directos e inversos universales. Las condiciones de reacción para la amplificación fueron de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se calcularon los valores medios. Se obtuvieron curvas de fusión, que se examinaron tras una amplificación para determinar la especificidad de la reacción de PCR.

## Análisis estadístico

Las variables discretas se presentan en forma de valores absolutos y porcentajes. Las variables continuas se presentan en forma de media ± desviación estándar o de mediana [intervalo intercuartílico]. Se verificó la distribución normal de las variables cuantitativas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cualitativas se compararon con las pruebas de la  $\chi^2$  y exacta de Fisher. Las variables continuas se compararon con la prueba de la t de

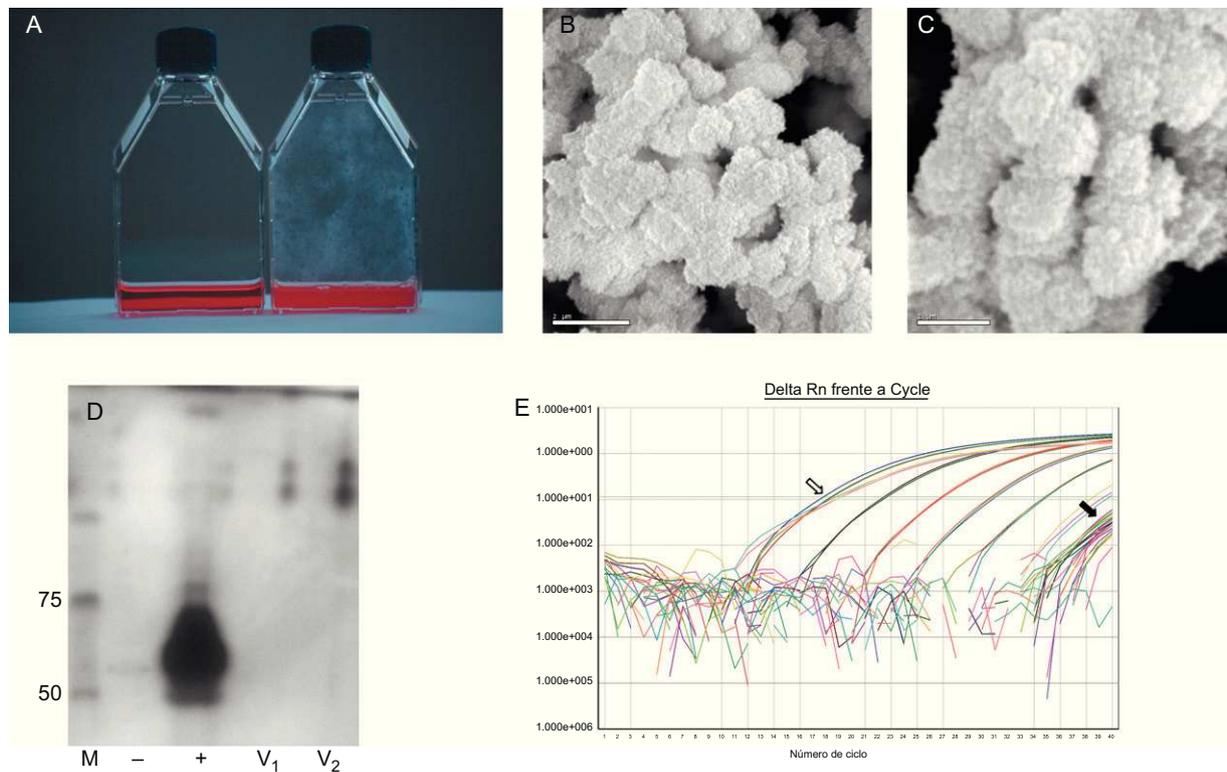
### Tabla

Características del grupo total y de las válvulas seleccionadas con nanopartículas calcificantes positivas

Variables	Total	Válvulas seleccionadas	p
Válvulas (n)	84	6	
Edad (años)	71 [67-76]	75 [69-77]	0,36
Varones	53 (63)	6 (100)	0,09
Presión arterial sistólica (mmHg)	131 ± 2	129 ± 7	0,74
Presión arterial diastólica (mmHg)	65 ± 1	66 ± 5	0,85
Tabaquismo	10 (12)	1 (17)	0,57
Hipertensión	52 (62)	5 (83)	0,41
Diabetes	17 (22)	1 (17)	1
Dislipemia	39 (47)	4 (67)	0,42
Enfermedad coronaria angiográfica	31 (37)	1 (17)	0,41
<b>Tratamiento médico</b>			
Anticoagulantes	35 (42)	2 (33)	1
Bloqueadores beta	30 (36)	3 (50)	0,66
Antagonistas del calcio	14 (17)	0	0,58
IECA	21 (25)	0	0,33
Estatinas	39 (46)	2 (33)	0,69
Diuréticos	44 (52)	2 (33)	0,43
<b>Variables ecocardiográficas</b>			
Gradiente máximo transvalvular (mmHg)	76 ± 3	77 ± 8	0,96
Grado de calcificación	42 (50)	4 (67)	0,360
Área de válvula aórtica (cm <sup>2</sup> )	0,73 ± 0,3	0,77 ± 0,12	0,748
<b>Variables analíticas</b>			
Colesterol total (mg/dl)	187 ± 4	188 ± 13	0,968
cHDL (mg/dl)	50,1 ± 4	59 ± 2,7	0,386
cLDL (mg/dl)	105,7 ± 7,5	97 ± 0,5	0,671
Triglicéridos (mg/dl)	116 ± 7	106 ± 12	0,694
Creatinina (mg/dl)	0,9 [0,8-1,1]	0,9 [0,8-1,15]	0,98
Calcio (mg/dl)	9,7 [9,3-10,6]	8,9 [8,2-9,6]	0,14
Recuento de leucocitos (×10 <sup>9</sup> /l)	6,6 [5,7-7,3]	6,9 [6,3-8,4]	0,36
Fibrinógeno (mg/dl)	311 ± 13	296 ± 51	0,77

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; IECA: inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina.

Las variables discretas se presentan en forma de proporciones, n (%). Las variables continuas se presentan en forma de media ± error estándar de la media y medianas [percentiles 25-75].



**Figura 1.** A: fotografía de frascos de cultivo con presencia de nanopartículas calcificadas (derecha) y medios envejecidos estériles de control (izquierda). B y C: fotografías de microscopio electrónico de nanopartículas calcificadas (CNP) a diferentes aumentos. D: gel de PAGE-SDS con líneas que corresponden a marcadores de peso molecular (M), medios de cultivo sin y con suero de ternera fetal como controles negativo y positivo (-, +), respectivamente, y medios de cultivo de dos válvulas diferentes ( $V_1$  y  $V_2$ ). E: gráficos de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real de medios de cultivo de CNP con controles positivos (flecha blanca), cultivos de CNP y controles negativos (flecha negra) y una curva estándar entre  $10^7$  y  $10^2$  copias. Todas las muestras y los controles negativos tienen valores de TC superiores a 40.

Student o su equivalente en pruebas no paramétricas, la U de Mann-Whitney, para las variables que no tenían una distribución normal.

Todos los datos se introdujeron en una base de datos y se analizaron con el programa estadístico PASW (v. 17.0.2, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias en las que había un valor de p nominal bilateral sin ajustar  $< 0,05$ .

## RESULTADOS

Las características demográficas, clínicas y ecocardiográficas y los datos bioquímicos de la población total y de los pacientes cuyas válvulas se incluyeron en el estudio se presentan en la [tabla](#). Todos los datos basales de ambos subgrupos eran similares. Tan sólo se observó una tendencia favorable al sexo masculino (el 63 frente al 100%;  $p = 0,09$ ) en cuanto a las válvulas seleccionadas con cultivos positivos. Las características de nuestros pacientes son similares a las descritas en artículos previos<sup>24,25</sup>.

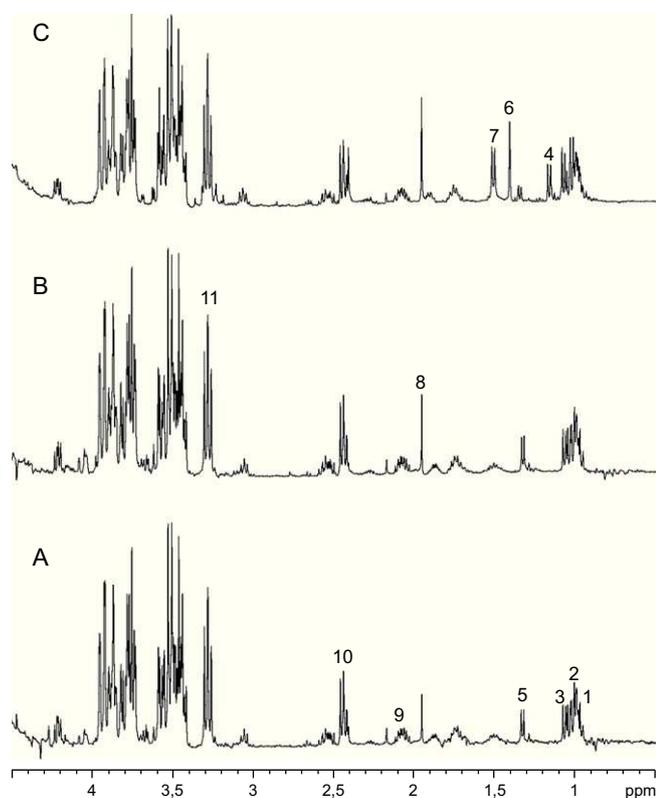
Después de aproximadamente 6 semanas en cultivo, se formaron CNP que se observaban en forma de una película adherida a la superficie de plástico ([fig. 1](#)). Los medios de cultivo se mantuvieron claros y no se apreció ningún olor especial ni ninguna otra característica que pudiera asociarse a un crecimiento bacteriano.

En la [figura 2](#) se muestran los espectros de RM de los medios obtenidos después de 6 semanas de cultivo de CNP, los medios de control envejecidos durante 6 semanas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$  y los medios procedentes de un

cultivo contaminado. Los espectros de los medios envejecidos y de los cultivos de CNP son similares ([figs. 1A y B](#)), sin que se aprecie ningún metabolito/pico específico que permita diferenciarlos. En cambio, los espectros de los medios contaminados presentan picos en 1,16 y 1,40 ppm, que se asignaron de forma preliminar a los ácidos alfacetoisovalérico y dimetilmalónico, respectivamente, que no se hallan en los otros dos.

Los demás metabolitos identificados son compatibles con los presentes en la formulación de los medios de cultivo. Los picos más grandes de los espectros corresponden a la glucosa. Otros metabolitos identificados son lactato, lisina, glutamina, piruvato y tirosina, todos ellos presentes en la formulación de los medios de DMEM. Pudimos identificar también la presencia de acetato y formiato, compuestos que aparecen en los medios envejecidos, con independencia de la presencia de CNP, pero no en los medios recientes. Estos últimos cambios no estaban relacionados con la presencia de microorganismos bacterianos conocidos, ya que cuando se evaluaron los medios de cultivo para determinar la presencia del gen bacteriano de 16sRNA, los resultados fueron negativos en todas las muestras evaluadas ([fig. 1E](#)) y, por consiguiente, no diferían de los resultados obtenidos en el control negativo.

Con objeto de investigar si había diferencias poco manifiestas entre los medios de control y de CNP, utilizamos en método de ACP de reconocimiento de patrones sin supervisión. En la [figura 3](#) se muestra el gráfico de puntuación de ACP, en el que cada punto corresponde a una muestra individual. La única muestra que no estaba dentro del intervalo de confianza del 95% es la correspondiente a la muestra contaminada (señalada con un asterisco en el gráfico). No se apreció agrupación alguna de las muestras que nos



**Figura 2.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de medios estériles envejecidos (A), medios de cultivo después de 6 semanas de crecimiento de CNP (B) y medios contaminados (C). La asignación preliminar de los picos, basada en la desviación química solamente, es la siguiente: 1, isoleucina; 2 y 3, valina; 4, ácido alfacetoisovalérico; 5, lactato; 6, ácido dimetilmalónico; 7, alanina; 8, acetato; 9 glutamato/glutamina; 10, glutamato; 11, glucosa.

permitiera diferenciar los medios envejecidos de los medios de cultivo de CNP, lo cual respalda la ausencia de diferencias entre los dos conjuntos de medios.

## DISCUSIÓN

Este estudio aborda específicamente la cuestión de si las CNP son entes vivos buscando señales de metabolismo en los medios de cultivo. Los resultados no muestran actividad metabólica alguna que pueda relacionarse directamente con el crecimiento de las CNP. En consecuencia, no se debe considerar organismos vivos a las CNP según la definición utilizada en el presente trabajo<sup>18</sup>.

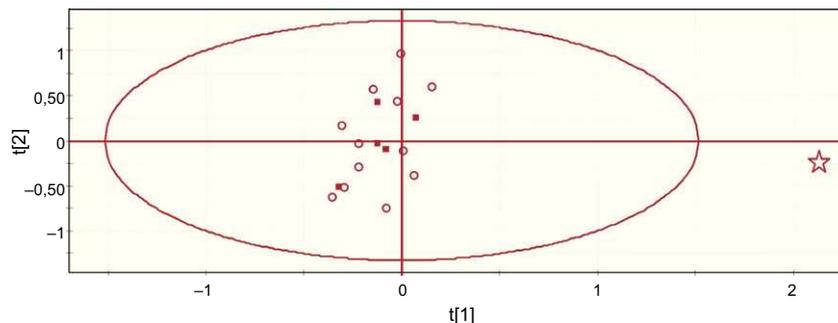
Tal como se muestra en la figura 1, hemos podido provocar el crecimiento de CNP con unas características similares a las descritas en la literatura, tanto macroscópica como microscópicamente<sup>5,10,24</sup>. Este crecimiento se ha producido sin la presencia detectable de suero de ternera fetal en los medios de cultivo.

Se ha generado controversia respecto a si las CNP son entes vivos; los resultados más recientes indican que no lo son. Cisar et al<sup>9</sup> llegaron a la conclusión de que la biomineralización atribuida a las nanobacterias puede ser iniciada por macromoléculas no vivas. Posteriormente, Raoult et al<sup>11</sup> llevaron a cabo un análisis exhaustivo con *Nanobacterium* sp., y llegaron a la conclusión de que las CNP son «complejos proteicos minerales autopropagados que contienen fetuinas como principal componente biológico». Martel et al<sup>24</sup> también han respaldado el origen no biológico de las partículas de tipo nanobacteria. Además, hay mecanismos de crecimiento de cristales poco habituales que pueden producir precipitados de witherita a partir de soluciones de sílice y cloruro de bario que se parecen mucho a organismos primitivos; así pues, la evidencia de vida no puede basarse únicamente en la morfología<sup>25</sup>. La evidencia de que las CNP son entes vivos se basa principalmente en su capacidad de reproducción en cultivo, pero la controversia persiste. Los artículos de Wainwright<sup>26</sup> y Urbano et al<sup>27</sup> son un buen ejemplo de dicha controversia.

Nuestros resultados respaldan los datos recientemente publicados que indican que las CNP son una combinación de sales y proteínas del suero<sup>11</sup> que puede formarse mediante un proceso no biológico<sup>28</sup>. En estos sistemas, la presencia de cristales actuaría como centros de nucleación y facilitarían la formación de CNP.

Se ha señalado que las CNP tienen «escaso metabolismo»<sup>20</sup>, pero nosotros no pudimos detectar actividad metabólica alguna en nuestras muestras. La presencia de acetato se ha asociado al crecimiento bacteriano en el caso de los espectros de RMN obtenidos a partir de abscesos *in vivo*<sup>29</sup>, pero en el caso del cultivo de CNP esto se descartó debido a la ausencia de 16sRNA en los medios de cultivo. Aunque algunos autores han indicado que las CNP inhiben la PCR<sup>20</sup>, posteriormente se ha descrito que las nanobacterias pueden detectarse fácilmente mediante RT-PCR<sup>30</sup>. En nuestro estudio, la RT-PCR no produjo resultado alguno a pesar de la evidencia de crecimiento de CNP.

La hipótesis de que las CNP sean un organismo vivo es muy atractiva desde el punto de vista clínico. Según dicha hipótesis, el tratamiento antibiótico tendría un efecto protector respecto al desarrollo de la estenosis aórtica. Todo ello concuerda con lo indicado por estudios previos que han señalado efecto beneficioso de un tratamiento combinado de EDTA (sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético) y tetraciclinas para la reducción de la calcificación arterial vascular<sup>31</sup>. Nuestras observaciones van en favor de una interpretación alternativa de la biomineralización de las CNP, pero no reducen la importancia de realizar nuevos trabajos para definir la base que subyace a la calcificación



**Figura 3.** Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales del conjunto de datos de espectros. Cada punto corresponde a un cultivo individual. Los cuadrados corresponden a medios de cultivo envejecidos; los círculos a medios procedentes de cultivos de CNP, y la estrella, a medios contaminados.

extraósea patológica. La concentración de proteínas y fosfato en la sangre humana está justo por debajo del umbral en el que empieza a formarse el precipitado de hidroxapatita. Los factores que facilitan el depósito de calcio pueden tener efectos clínicos adversos. En consecuencia, nosotros proponemos una nueva teoría: los complejos proteicos que contienen fetuinas y albúmina actúan normalmente como inhibidores de la calcificación y pueden precipitar en la matriz extracelular cuando este mecanismo se ve superado. Estos complejos podrían actuar entonces como centros de nucleación para el depósito de calcio. Los avances recientes de la proteómica y la nanotecnología pueden ser útiles para proporcionar fármacos dirigidos, pero es preciso prestar especial atención para evitar que las nanoestructuras constituyan centros de nucleación para el depósito de calcio<sup>32</sup>. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios para determinar si las fetuinas y la albúmina intervienen en la patogenia de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados no respaldan un origen vivo de las CNP. Sin embargo, dada la capacidad de las CNP de actuar como centros de nucleación y fomentar la calcificación, es preciso prestarles especial atención, sobre todo en situaciones en que puede prevenirse su formación, como en los fármacos administrados mediante nanoestructuras. Aunque las CNP no sean entes vivos y no se pueda tratarlas como una infección, no se puede descartar que sean relevantes en ciertas enfermedades en las que la calcificación es un elemento clave.

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## BIBLIOGRAFÍA

- O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Tromb Vasc Biol*. 2006;26:1721-8.
- Goldbarg SH, Elamariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;13:1205-13.
- Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111:3316-26.
- Kajander EO, Çiftçioğlu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8274-9.
- Bratos-Pérez MA, Sánchez PL, García de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernández-Fernández JM, et al. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J*. 2008;29:371-6.
- Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, et al. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1115-24.
- Çiftçioğlu N, Björklund M, Kuoikoski K, Bergström K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int*. 1999;56:1893-8.
- Wang L, Shen W, Wen J, An X, Cao L, Wang B. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria. *Dig Dis Sci*. 2006;51:1126-32.
- Kajander EO. Nanobacteria-propagating calcifying nanoparticles. *Letters in applied microbiology*. 2006;42:549-52.
- Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11511-5.
- Kajander EO, Kuronen I, Akerman K, Pelttari A, Çiftçioğlu N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on earth. *Proc SPIE*. 1997;3111:420-8.
- Raoult D, Drancourt M, Azza S, Nappes C, Guieu R, Rolain JM, et al. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. *PLoS Pathog*. 2008;4:e41.
- Çiftçioğlu N, Aho KM, Mc Kay DS, Kajander EO. Are apatite nanoparticles safe? *Lancet*. 2007;369:2078.
- Çiftçioğlu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology*. 1998;4:259-70.
- Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, Coulanges C, et al. Attempted isolation of Nanobacterium sp. Microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol*. 2003;41:368-72.
- Benzerara K, Miller VM, Barell G, Kumar V, Miot J, Brown Jr GE, et al. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft x-ray spectromicroscopy. *J Invest Med*. 2006;54:367-79.
- Candemir B, Ertas FS, Kaya CT, Ozdol C, Hasan T, Akan OA, et al. Association between antibodies against calcifying nanoparticles and mitral annular calcification. *J Heart Valve Dis*. 2010;19:745-52.
- Lehninger A. Principles of biochemistry. 2.<sup>a</sup> ed. Worth Publishers; 1993.
- Klein HP, Horowitz NH, Levin GV, Oyama VI, Lederberg J, Rich A, et al. The viking biological investigation: preliminary results. *Science*. 1976;194:99-105.
- Çiftçioğlu N, McKay DS, Mathew G, Kajander EO. Nanobacteria: fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Invest Med*. 2006;54:385-94.
- Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2000;343:611-7.
- Barba I, De León G, Martín E, Cuevas A, Aguade S, Candell-Riera J, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease. *Magn Reson Med*. 2008;60:27-32.
- Manichanh C, Reeder J, Gibert P, Varela E, Llopis M, Antolin M, et al. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res*. 2010;20:1411-9.
- Martel J, Young JDE. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *PNAS*. 2008;105:5549-54.
- García-Ruiz JM, Melero-García E, Hyde ST. Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. *Science*. 2009;323:362-5.
- Wainwright M. Nanobacteria and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer. *Microbiology*. 1999;145:2623-4.
- Urbano P, Urbano F. Nanobacteria: Facts or fancies? *PLoS Pathog*. 2007;3:e55. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030055>.
- Young JD, Martel J, Young L, Wu CY, Young A, Young D. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis. *PLoS ONE*. 2009;4:e4417. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004417>.
- Martínez-Pérez I, Moreno A, Alonso J, Aguas J, Conesa G, Capdevila A, et al. Diagnosis of brain abscess by magnetic resonance spectroscopy. Report of two cases. *J Neurosurg*. 1997;86:708-13.
- Kim TH, Kim HR, Myung SC. Detection of nanobacteria in patients with chronic prostatitis and vaginitis by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Korean J Urol*. 2010;52:194-9.
- Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology*. 2004;11:95-101.
- Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodóvar LF, Juárez-Tosina R, De la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:46-53.