

Eva Márquez Durán
David Hernández Moreno
María Prado Míguez Santiyán
Francisco Soler Rodríguez
Marcos Pérez López

LAS NANOPARTÍCULAS Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS

Las nanopartículas y sus aplicaciones biomédicas

Eva Márquez Durán
David Hernández Moreno
María Prado Míguez Santiyán
Francisco Soler Rodríguez
Marcos Pérez López

Las nanopartículas y sus aplicaciones biomédicas



Cáceres
2021

Esta obra ha sido objeto de una doble evaluación, una interna llevada a cabo por el Consejo Asesor del Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, y otra externa, efectuada por evaluadores independientes de reconocido prestigio en el campo temático de la misma.



Tipografía utilizada: Minion Pro (para cubierta), Bembo Std (para páginas iniciales) y Palatino LT Std (para el texto de la obra)

Imagen de cubierta: *Micrograph of a Nanoparticle Crystal Lattice by EMSL* is licensed under CC BY-NC-SA 2.0

Edita:

Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones
Plaza de Caldereros, 2. 10071 Cáceres (España)
Tel. 927 257 041; Fax 927 257 046
publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>

I.S.B.N.: 978-84-09-25218-3 (edición digital)

Maquetación y edición multimedia: Dosgraphic, s. l.

ÍNDICE

	<i>Páginas</i>
Capítulo 1. Conceptos básicos: nanopartículas, nanotecnología y nanomateriales	9
Capítulo 2. Generación de nanoestructuras	13
2.1. Top-Down	13
2.2. Bottom-Up	14
2.2.1. Método de la fase gaseosa.....	14
2.2.2. Método de la fase líquida.....	14
Capítulo 3. Proceso de caracterización de las nanopartículas	17
3.1. Tamaño y morfología	18
3.2. Carga superficial	18
Capítulo 4. Tipos de nanopartículas	19
4.1. Nanopartículas metálicas	19
4.1.1. Nanopartículas de plata	19
4.1.2. Nanopartículas de oro	20
4.1.3. Nanopartículas de aleación.....	21
4.1.4. Nanopartículas magnéticas.....	21
4.2. Nanopartículas no metálicas.....	23
4.2.1. Nanopartículas poliméricas	23
4.2.2. Nanopartículas de nanogel polimérico	23
4.2.3. Nanopartículas liposómicas	24
4.2.4. Nanopartículas micelares.....	24
4.2.5. Nanopartículas dendrímeras	25
4.2.6. Nanopartículas de quitosano.....	25
4.2.7. Nanopartículas proteicas.....	26
4.2.8. Nanopartículas lipídicas	26

Capítulo 5. Uso de nanopartículas en el diagnóstico clínico	27
5.1. Aplicaciones de las nanopartículas en la resonancia magnética	27
5.1.1. Uso como agentes de contraste T1	29
5.1.2. Uso como agente de contraste T2.....	30
5.1.3. Ventajas del uso de nanopartículas como agentes de contraste en resonancia magnética.....	31
5.2. Aplicaciones en la obtención de imágenes por ultrasonido	32
5.3. Aplicaciones en tomografía computarizada	34
Capítulo 6. Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas	37
6.1. Uso de nanopartículas en tratamiento	37
6.2. Aplicaciones en la administración de medicamentos.....	40
Capítulo 7. Posibles aplicaciones de las nanopartículas en el campo de la veterinaria	45
Capítulo 8. Toxicidad presente en las nanopartículas	47
8.1. Toxicidad dependiente de la forma de administración	48
8.1.1. Inhalación.....	48
8.1.2. Exposición oral.....	50
8.1.3. Absorción dérmica	51
8.1.4. Administración parenteral	52
8.2. Toxicidad dependiente del tipo de nanopartícula	53
8.2.1. Nanopartículas de oro.....	53
8.2.2. Nanopartículas de plata	54
8.2.3. Nanopartículas magnéticas.....	55
8.2.4. Nanopartículas metálicas.....	56
Capítulo 9. Legislación de las nanopartículas.....	59
9.1. Legislación en la Unión Europea	60
9.1.1. Reglamento (CE) N.º 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP, Reglamento 1272/2008)	62
9.1.2. Reglamento (UE) N.º 649/2012 del consentimiento fundamentado previo (PIC, Reglamento 649/2012)	62
9.2. Normativas de nanotecnología en España.....	63
9.3. Regulación de la nanotecnología por sectores	64
Capítulo 10. Bibliografía.....	67

CAPÍTULO 1

CONCEPTOS BÁSICOS: NANOPARTÍCULAS, NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES

El primer paso para comprender qué son las nanopartículas empieza por su definición, entendida como la explicación en un enunciado de manera exacta y clara del significado de un concepto, y debe ser lo más simple y clara posible (sobre todo cuando tiene un propósito regulatorio), y debe ser al mismo tiempo inequívoca y comprensible (Lövestam *et al.*, 2010). Las definiciones nos son necesarias para evitar cualquier malentendido y poder asegurarnos una comunicación eficiente. El prefijo “Nano” proviene del griego (νάνος), donde significaba “enano”, incorporado al español como prefijo que entra en la formación de nombres y adjetivos con el significado de ‘muy pequeño’, y que en el campo de las nanociencias representa la mil millonésima parte de algo. Nanopartícula, por tanto, describe a aquellas partículas que son más pequeñas que 100 nanómetros.

Nanotecnología describe a las ciencias y técnicas que se aplican a un nivel de nanoescala, esto es, unas medidas extremadamente pequeñas, “nanos”, que permiten trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. Con origen en la conferencia que impartió el 29 de diciembre de 1959 Richard Feynman bajo el título “There’s Plenty of Room at the Bottom” (*Hay mucho espacio al fondo*), no es sin embargo hasta la última década del siglo XX cuando se ha comenzado a aplicar a diversos campos del conocimiento con una difusión cada vez mayor (Pal *et al.*, 2011). Así, cuando utilizamos el término “Nanotecnología” nos referimos a la tecnología basada en partículas muy pequeñas, específicamente aquellas que se encuentran en el rango de los nanómetros, que pretende explotar las propiedades específicas que surgen de estructurar la materia a una (meso-) escala, caracterizada por la interacción de la física clásica y la mecánica cuántica (Williams *et al.*, 2005).

Siguiendo el mismo razonamiento, cuando nos referimos a “nanomaterial” estamos hablando de materiales con dimensiones externas o estructuras internas de longitud en el rango de nanómetro (mil millonésima parte del metro). Estos materiales normalmente presentan propiedades y comportamientos diferentes o adicionales comparados con los mismos materiales fuera de la nanoescala (Authority, 2014).

No obstante, para que estas definiciones sirvan para entender los conceptos de los que vamos a hablar a lo largo de ese trabajo, se hace necesario advertir que no existe, a día de hoy, una definición internacional unívoca sobre lo que es una “nanopartícula”. A pesar de la gran cantidad de definiciones que pueden encontrarse y que han sido propuestas y discutidas, tanto por autoridades nacionales como por

organismos internacionales y comunidades científicas, ninguna de ellas cumple los requisitos para uso sobre todo en el ámbito legislativo (Lövestam *et al.*, 2010).

Las definiciones que vamos a tratar son las expuestas por la Organización Internacional de Estandarización (International Organization for Standardization, ISO), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD), el Comité Científico de la Unión Europea de Riesgos Sanitarios Emergente y Recientemente Identificados (The European Union Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR), el Centro de Investigación Conjunta (Join Research Center, JRC) de la Unión Europea (UE), y definiciones de Norteamérica y Australia.

En el caso de la definición propuesta por la ISO, el principal problema que encontramos es que habla en términos demasiado generales. Incluye todos los nano-objetos (nanopartículas, nanofibras y nanoplacas) y materiales de nanoestructura (incluyendo agregados y aglomerados). La definición de la OECD intenta ir un paso más allá, añadiendo la intención de incluir propiedades fisicoquímicas únicas a la definición de la ISO. El SCENIHR ve necesario tener en cuenta la distribución del tamaño, mientras que el JRC publicó un informe de referencia (Lövestam *et al.*, 2010) que no incluía una definición específica para los nanomateriales, pero sí recomendaciones para crear una definición que permita su regulación. En ese informe se dice que la definición debe tener en cuenta el tamaño como una propiedad definitoria, además debe tener en cuenta la distribución del tamaño y sólo debía referirse a materiales particulares. La Unión Europea en el año 2011 publicó unas recomendaciones relativas a la definición de nanomaterial basada en el informe del JRC, de la opinión del SCENIHR y la definición de nanomateriales desarrollada por la ISO (Rec. 2011/696 de la Comisión, de 18 de octubre de 2011).

Las recomendaciones propuestas por la UE para la definición de nanomateriales a efectos legislativos y políticos de la Unión son las siguientes:

- Debería incluir materiales naturales y accidentales, así como materiales de ingeniería.
- Se restringe a las nanopartículas.
- Deberían incluirse agregados y aglomerados de nanopartículas.
- Debería centrarse en el tamaño de las nanopartículas.
- Debería incluir un requisito de distribución de tamaño específico y permitir variar el umbral de distribución numérica en función de las preocupaciones ambientales, de salud y de seguridad.

Basándose en el informe propuesto el 18 de octubre de 2011 (Rec. 2011/696 de la Comisión, de 18 de octubre de 2011), la UE recomendó que los nanomateriales se definieran como “material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm”. Esta definición de la Comisión Europea es un intento de crear una interpretación uniforme para la identificación de nanomateriales usando el tamaño de la partícula como la única medida,

y está específicamente destinada a clasificar un material como “nanomaterial” para un propósito legislativo y político en la Unión Europea.

Para entender el nano-mundo debemos entender el rango de medida en el que se mueve, ya que se mide en nanómetros y abarca sistemas cuyo tamaño está por encima de las dimensiones moleculares y por debajo de los macroscópicos (generalmente >1 nm y <100 nm). A este tamaño, átomos y moléculas trabajan de forma diferente, y proporcionan una variedad de usos interesantes y sorprendentes. Los estudios de nanotecnología y nanociencia han emergido rápidamente durante los últimos años en una amplia gama de productos. Ofrece oportunidades para el desarrollo de materiales, incluyendo aquellos para aplicaciones médicas, y donde las técnicas convencionales hayan alcanzado sus límites (Pal *et al.*, 2011). Y a pesar de que en la naturaleza hay muchos ejemplos de estructuras que existen con dimensiones nanométricas (incluyendo moléculas esenciales dentro del cuerpo humano y componentes de la comida), y de que muchas tecnologías han venido involucrando estructuras de nanoescala desde hace muchos años, sólo ha sido en los últimos veinticinco años cuando se ha podido, intencionada y activamente, modificar moléculas y estructuras dentro de este rango de tamaño (Williams *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 2

GENERACIÓN DE NANOESTRUCTURAS

¿Cómo obtenemos una nanopartícula? La pregunta parece simple, pero esconde una trampa saducea, y la respuesta se hace compleja. Los procesos de síntesis de nanopartículas son simples de comprender, pero no por ello fáciles de realizar. Fundamentalmente existen dos enfoques diferentes para la generación controlada de nanoestructuras y son dos caminos opuestos. Uno de ellos parte de materiales de mayores dimensiones y los divide utilizando poderosas técnicas de litografía hasta obtener las partículas del tamaño que se desea, mientras que el otro, toma átomos y moléculas individuales que se ensamblan para obtener las nanopartículas. Estos dos métodos se denominan respectivamente Top-down y Bottom-up (Figura 1), y ambos presentan diversas ventajas inherentes al proceso.

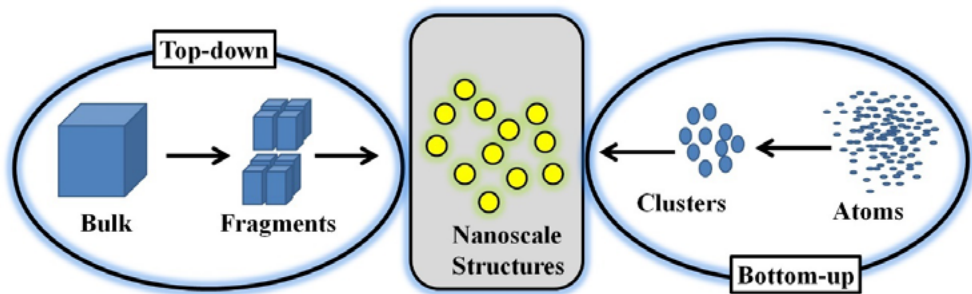


Figura 1. Esquema representativo de la síntesis de nanopartículas (Nanoparticle synthesis technique), por Vicente Neto, 2019.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nanoparticle_synthesis_techniques.jpg
Reimpresión autorizada.

2.1. TOP-DOWN

El método Top-down, como hemos adelantado, parte de un material de mayores dimensiones y trata de descomponer una sustancia sólida. Esta sustancia sólida puede subdividirse en molienda seca o húmeda. En el caso de la molienda seca una característica importante de las partículas en los procesos de refinado de granos

(eliminación de las impurezas) es que su energía superficial aumenta, lo que hace que la agregación de partículas también aumente. En el método de molienda en seco, la sustancia sólida es triturada como resultado de un choque, una compresión o por fricción, utilizando para ello distintos tipos de molinos tales como el molino de chorro, de martillos, de corte, de rodillos, de cizallamiento, de bolas o de tambor. Dado que la condensación de partículas pequeñas también tiene lugar simultáneamente con la pulverización, es difícil obtener tamaños de partícula de menos de 3 μm por refinado de grano.

Por su parte el proceso húmedo emplea un molino cargado con pequeñas esferas y se activa mediante un eje de agitador de alta velocidad para crear un corte hidráulico mecánico y favorecer el impacto de las partículas. Esto permite que los sólidos se rompan suspendidos en un líquido (lodo) a medida que se bombean a través de la cámara de trituración. El proceso húmedo es adecuado para prevenir la condensación de las nanopartículas así formadas y, por lo tanto, es posible obtener nanopartículas altamente dispersas (Horikoshi & Serpone, 2013).

2.2. BOTTOM-UP

El método Bottom-up básicamente utiliza átomos o moléculas pequeñas como bloques de construcción de estructuras de varios niveles que realizan diversas operaciones y es extremadamente prometedor, ya que podría conducir a que no existan productos de desecho ni materiales no utilizados. El enfoque ascendente se encuentra dividido en dos métodos, uno de fase gaseosa y otro en fase líquida. Para el primero, el método consiste en una deposición química en fase vapor (Chemical Vapour Deposition method, CVD) que implica una reacción química, mientras que el segundo se trata de un método físico de deposición en fase vapor (Physical Vapour Deposition method, PVD) consistente en la deposición de las partículas evaporadas que permite el bombardeo de plasma (Horikoshi & Serpone, 2013).

2.2.1. Método de la fase gaseosa

El método CVD, como hemos introducido anteriormente, implica una serie de reacciones químicas y minimiza la presencia de impurezas orgánicas en las partículas en comparación con los métodos en fase líquida. El problema es que requieren del uso de equipos de vacío que son complicados de utilizar, y cuyo principal inconveniente es el alto coste y su baja productividad. La gran ventaja es que puede producir partículas ultra pequeñas de menos de 1 μm .

2.2.2. Método de la fase líquida

El método en fase líquida o PVD, se basa en el enfriamiento del material evaporado. Se utiliza como punto de partida un material sólido o líquido que se evapora y cuyo vapor resultante se enfría rápidamente, dando como resultado la formación de las nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas, ya sea por el método CVD o por el PVD, requiere el uso de un equipo específico y llevar a cabo un proceso que cumpla las siguientes condiciones (Horikoshi & Serpone, 2013a):

- Control del tamaño de partícula, distribución de tamaños, forma, estructura cristalina y distribución de la composición química.
- Mejora de la pureza de las nanopartículas (impurezas inferiores).
- Control de la agregación.
- Estabilización de propiedades físicas, estructuras y reactantes.
- Mayor reproducibilidad.
- Mayor producción en masa, ampliación y menores costos.

CAPÍTULO 3

PROCESO DE CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Una vez que las nanopartículas se obtienen mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente (Bottom-up y Top-bottom), se debe especificar el tamaño, la morfología y la carga de superficie deseados. Es el paso más difícil y el más importante ya que dependiendo de estos tres parámetros, la partícula presentará diversas características que serán las que definan su utilización.

¿Por qué es tan importante? Porque el promedio del diámetro de partícula, su distribución de tamaño y su carga afectan de forma trascendental a la estabilidad física y la distribución *in vivo* de las nanopartículas (Pal *et al.*, 2011). Con el tiempo, se han ido reconociendo los desafíos inherentes que presenta la caracterización de los nanomateriales; estos retos en la caracterización tienen el potencial de inhibir o retrasar el impacto científico y tecnológico de la nanociencia y la nanotecnología (Baer *et al.*, 2013). Es un auténtico desafío el lograr una adecuada caracterización de muchos tipos de nanomateriales debido a diversos factores que influyen y que pueden tener como consecuencia un proceso de caracterización incompleto. Las tres razones más importantes por las que la caracterización de las nanopartículas no llega a buen término son:

1. Los nanomateriales presentan algunas dificultades únicas de preparación y análisis (descritas en las siguientes secciones) que son nuevas para algunas disciplinas e investigadores que trabajan o investigan con nanomateriales.
2. Es un campo multidisciplinar y no todos los equipos de investigación tienen acceso a la gama de herramientas de caracterización necesarias para obtener información potencialmente importante.
3. El rango de información necesario para comprender los nanomateriales puede requerir la aplicación de herramientas y análisis de datos más allá de la experiencia de los equipos de investigación, lo que a veces conduce a una aplicación menos que óptima de métodos importantes y/o una comprensión incompleta de los datos producidos (Baer *et al.*, 2013).

Una vez que entendemos las dificultades que presenta este proceso, debemos entender también la importancia de la caracterización y, por tanto, la relevancia de otorgarle a las nanopartículas un tamaño, una morfología y una carga superficial determinados.

3.1. TAMAÑO Y MORFOLOGÍA

La distribución del tamaño de partícula y la morfología son los parámetros más importantes en cuanto a la caracterización de nanopartículas (Fernández-Cruz *et al.*, 2019). La alta relación superficie-volumen junto con los efectos de tamaño (efectos cuánticos) de las nanopartículas induce muchos fenómenos dependientes del tamaño, como propiedades químicas, electrónicas, magnéticas y mecánicas. El tamaño de partícula juega un papel crucial en las propiedades de las nanopartículas y, por lo tanto, una tarea esencial en la caracterización de sus propiedades es el dimensionamiento de las mismas. En general, hay dos métodos básicos para definir el tamaño de partícula. El primer método es inspeccionar las partículas y hacer mediciones reales de sus dimensiones mediante microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de escáner, microscopio de fuerza atómica, entre otros. El segundo método utiliza la relación entre el comportamiento de las partículas y su tamaño, es decir cómo sus pautas varían dependiendo de las dimensiones que presenten. Esto a menudo implica una suposición de tamaño esférico equivalente desarrollado usando una propiedad dependiente del tamaño de la partícula y relacionándola con una dimensión lineal (Akbari *et al.*, 2011); para ello se mide el radio hidrodinámico, que es el radio de una hipotética esfera sólida (esfera equivalente), mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*).

3.2. CARGA SUPERFICIAL

La importancia de la naturaleza e intensidad de la carga superficial radica en que esta determina su interacción con el entorno biológico así como su interacción electrostática con compuestos bioactivos. La estabilidad coloidal se analiza a través del potencial zeta de las nanopartículas. Este potencial es una medida indirecta de la carga superficial que corresponde a la diferencia de potencial entre el plano exterior de Helmholtz¹ y la superficie de corte, lo que permite predicciones sobre la estabilidad de almacenamiento de la dispersión coloidal. Se deben alcanzar altos valores de potencial zeta, ya sean positivos o negativos, para garantizar la estabilidad y evitar la agregación de las partículas. La extensión de la hidrofobicidad superficial puede entonces predecirse a partir de los valores del potencial zeta que, además, puede proporcionar información sobre la naturaleza del material encapsulado dentro de las nanocápsulas o recubierto sobre la superficie (Pangi *et al.*, 2003). La medición del potencial zeta depende de la fuerza y la valencia de los iones contenidos en la suspensión. La fuerza iónica alta y los iones de valencia altos comprimen la doble capa eléctrica, lo que resulta en la reducción del potencial zeta. El pH y la concentración de iones de hidrógeno en el medio también influyen, de tal manera que cuando la suspensión es ácida, las nanopartículas adquieren más carga positiva, y viceversa (Cho *et al.*, 2013).

¹ Teoría de la distribución de la carga, como una doble capa compuesta por las cargas a una distancia fija.

CAPÍTULO 4

TIPOS DE NANOPARTÍCULAS

La ausencia de una definición estándar no sólo tiene repercusiones a la hora de regular, sino también en cuanto a la ausencia de una clasificación específica y estándar, por lo que la clasificación generalmente depende de su autor. En el presente trabajo de revisión bibliográfica, se dividen en dos categorías principales, metálicas y no metálicas.

4.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanoestructuras metálicas nobles suscitan un gran interés en la comunidad científica debido a sus propiedades únicas, entre las que se encuentran grandes mejoras del campo óptico que tienen como resultado una mayor dispersión y absorción de la luz. El aumento de las propiedades ópticas y fototérmicas de las nanopartículas metálicas tiene como origen la oscilación resonante de sus electrones libres en presencia de luz, también conocida como resonancia localizada de plasmón superficial (LSPR). Como consecuencia, la capacidad de integrar estas nanopartículas de metal en sistemas biológicos ha tenido un gran impacto en los campos de la biología y la biomedicina (Jain *et al.*, 2008). Es importante conocer las diferentes características asociadas a los tipos más comunes de estas nanopartículas. Las partículas metálicas nanométricas son únicas y pueden cambiar considerablemente las propiedades físicas, químicas y biológicas a causa de su relación superficie-volumen. Debido a ello, hay que prestar especial atención a su caracterización gracias a que las propiedades fisicoquímicas de la partícula pueden tener un impacto significativo en su interacción con tejidos biológicos (Zhang *et al.*, 2016). A continuación se hace una relación de las nanopartículas metálicas más importantes:

4.1.1. Nanopartículas de plata

Son indudablemente los nanomateriales más utilizados en la actualidad debido al uso que se les puede dar como agentes antimicrobianos, en las industrias textiles, para el tratamiento de agua/residuos, lociones de protección solar (Hasan, 2015) y en diferentes bioinserciones. Esto obedece a sus propiedades principalmente antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas y antiangiogénicas²

² Inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes.

(Zhang *et al.*, 2016). La actividad biológica de las nanopartículas de plata (AgNPs) depende de diversos factores entre los que se encuentran la química superficial, el tamaño, la distribución de tamaños, la morfología de las partículas, la composición de partículas, el revestimiento/taponamiento, la aglomeración y velocidad de disolución, presentando diferentes tipos de especiación. La reactividad de las partículas en solución, el tipo de células y el tipo de agentes reductores utilizados para la síntesis de AgNPs son factores cruciales para la determinación de la citotoxicidad (Carlson *et al.*, 2008).

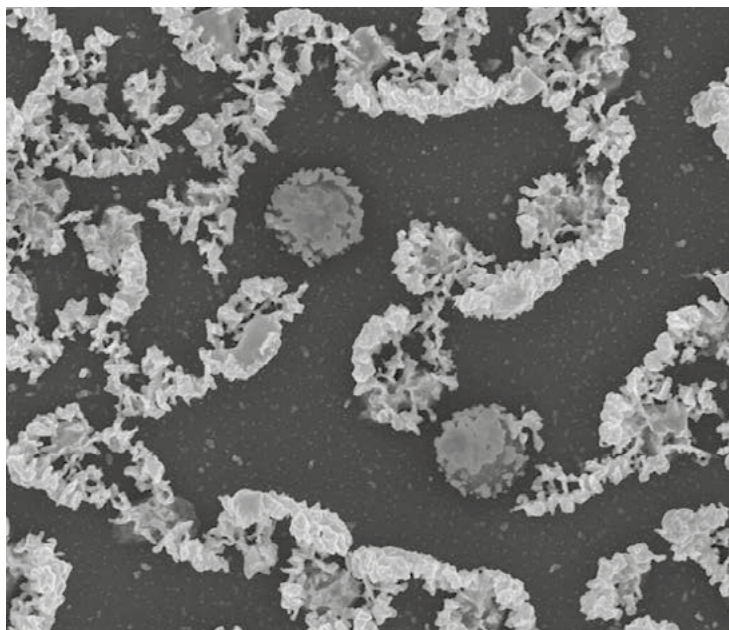


Figura 2. Recubrimiento de óxido de plata en la superficie de una oblea de silicio (Silver-Oxide Coating on the Surface of a Silicon Wafer), por Environmental Molecular Sciences Laboratory. Licencia CC BY-NC-SA 2.0.

Pero no todo son ventajas. Su extenso uso actual ha producido un aumento del contacto ya sea de forma directa o indirecta entre los organismos vivos y las nanopartículas de plata, lo que podría inducir numerosos efectos deletéreos sobre la salud humana y el medio ambiente. Los efectos adversos (primarios o secundarios) de las nanopartículas de plata en los órganos pueden extenderse al sistema cardiovascular o al sistema nervioso central, causando neurotoxicidad o inmunotoxicidad (Durán *et al.*, 2015).

4.1.2. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son conocidas por su facilidad de síntesis, procedimientos de funcionalización sencillos usando moléculas terapéuticas, y su buena

biocompatibilidad. Por ello, las AuNPs se utilizan en estudios inmunoquímicos para la identificación de interacciones de proteínas y como trazador de laboratorio en huellas dactilares para detectar la presencia de ADN en una muestra. Están teniendo un papel importante para la detección de antibióticos aminoglucósidos como estreptomycin, gentamicina y neomicina. Las nanopartículas de oro se utilizan para detectar células madre cancerígenas, siendo así beneficioso para su diagnóstico, así como para la identificación de diferentes clases de bacterias (Hasan, 2015).

Seguramente, su característica más atractiva sea la posibilidad de convertirlas en un método de transporte para la penetración de la barrera hematoencefálica (BHE), cuya relevancia se extiende más allá del transporte de fármacos para incluir otras aplicaciones medicinales, como la imagen, la radioterapia de tumores y la terapia fototermal (Sela *et al.*, 2015).

4.1.3. Nanopartículas de aleación

Las nanopartículas de aleación, como es de esperar, presentan propiedades estructurales que son diferentes de sus muestras originales. Por ejemplo, en el caso de las aleaciones formadas con AgNPs, debido a que estas partículas presentan mayor conductividad eléctrica y, a diferencia de otros muchos metales, sus productos óxidos presentan una conductividad relativamente mucho mejor, siendo los copos de Ag los más utilizados al producir dichas aleaciones. Hay que tener en cuenta, al hablar de sus propiedades, que en el caso de las nanopartículas bimetálicas, estas se ven influenciadas por las características presentadas por ambos metales y se ha observado que pueden llegar a presentar mayores ventajas que las nanopartículas metálicas ordinarias (Hasan, 2015).

Uno de los problemas que presentan es su generación, ya que requieren unas condiciones estrictas del entorno para su síntesis, al igual que la experimentación con estas nanopartículas puede llegar a ser complicada debido a la fuerte actividad de los metales frescos (Zhong & Zhong, 2013).

En cuanto a sus usos y aplicaciones, destacan el desarrollo de un sensor electroquímico para la determinación de uno de los hidrocarburos poliaromáticos prioritarios, el antraceno (Mailu *et al.*, 2010), en aplicaciones ortopédicas (Liao *et al.*, 2015). También tienen un gran interés por su papel en los procesos de catálisis (Cnossen *et al.*, 1994), en el diagnóstico del cáncer (Zhang *et al.*, 2014) y como biosensores.

4.1.4. Nanopartículas magnéticas

La gran ventaja que presentan estas nanopartículas frente a otro tipo es su biocompatibilidad, en concreto las nanopartículas magnéticas como Fe_3O_4 (magnetita) y Fe_2O_3 (maghemita) han sido investigadas de forma activa con diferentes fines, entre los que se encuentran el tratamiento selectivo del cáncer (hipertermia magnética³), la clasificación y manipulación de células madre, la administración guiada de fármacos,

³ Uso de nanopartículas magnéticas y campos magnéticos alternativos como agentes térmicos.

la terapia génica, el análisis de ADN e imágenes por resonancia magnética (RM) (Hasan, 2015). Las propiedades que se atribuyen a efectos de magnetización de superficie y a efectos de tamaño finito están relacionadas con la aparición de desviaciones magnéticas al reducir el tamaño de las partículas (Issa *et al.*, 2013).

Hay que tener en cuenta diversas consideraciones si se desea utilizar las nanopartículas magnéticas con fines biomédicos (Batlle *et al.*, 2011). Estas son:

1. Las nanopartículas magnéticas deben ser biocompatibles y no pueden presentar en ningún momento alguna toxicidad para el organismo.
2. La elección del tamaño con preferencia por partículas pequeñas (entre 10 y 50 nm) responde a las ventajas que presentan en el organismo respecto a otras de mayor tamaño:
 - a) Las nanopartículas conservan su estabilidad coloidal y resisten la agregación si su interacción magnética se reduce. Esto puede lograrse si su magnetismo desaparece después de la eliminación del campo magnético aplicado. Este comportamiento superparamagnético sólo es alcanzable bajo cierto tamaño de partícula y por encima de una temperatura denominada temperatura de bloqueo.
 - b) La interacción dipolo-dipolo está determinada con escala r^6 (r es el radio de la partícula). Esto quiere decir que las interacciones dipolares se hacen muy pequeñas cuando el tamaño de partícula llega a ser muy pequeño. Lo que permite evitar la agregación de las partículas bajo el campo magnético.
 - c) Disminuir tamaño significa obtener una mayor área de superficie para cierto volumen (o masa) de la partícula. La eficacia del recubrimiento (y también la fijación de ligandos) mejorará, conduciendo de esta forma a una resistencia aún mayor a la aglomeración, evitando la eliminación biológica y mejorando la focalización.
 - d) Al ser muy pequeñas, las partículas pueden permanecer en la circulación después de su administración parenteral y pasar a través de los sistemas capilares de órganos y tejidos, evitando la embolia vascular.
 - e) Las partículas magnéticas serán estables en agua a $\text{pH} = 7$ y en un ambiente fisiológico.
 - f) Las precipitaciones debidas a las fuerzas de gravitación pueden evitarse con partículas de pequeño tamaño.
3. Las partículas magnéticas deben tener una magnetización de saturación alta (cantidad de energía magnética que puede almacenar un imán). Este es un requisito importante por dos razones:
 - a) El movimiento de las partículas en la sangre puede controlarse con un campo magnético externo moderado.
 - b) Las partículas se pueden mover cerca del tejido patológico deseado.

Xiang *et al.*, en 2017, indicaron que el Fe_3O_4 tiene características excelentes, tales como alta compatibilidad con la sangre, propiedades fisicoquímicas estables, alta

tasa de adsorción de plomo y baja citotoxicidad. Además, la falta de efecto inmunosupresor demostró la viabilidad y eficacia de este material para la aplicación clínica en hemoperfusión.

4.2. NANOPARTÍCULAS NO METÁLICAS

4.2.1. Nanopartículas poliméricas

El estudio de las nanopartículas poliméricas se centra en su uso como un sistema de suministro de fármacos dirigidos y sostenidos para la administración eficaz de estos a la diana, con efectos secundarios mínimos (Kompella *et al.*, 2013). La forma de unión de estas nanopartículas a los fármacos se presenta tanto en forma de solución como en dispersión sólida, pudiendo adherirse a la superficie o unirse químicamente a las nanopartículas que soportan la carga. Para la síntesis de estas nanopartículas se usa un polímero que permite mejorar su estabilidad en un entorno biológico y ayuda a mediar en la biodistribución de compuestos activos, carga de fármacos, direccionamiento de fármacos, transporte, liberación e interacción con barreras biológicas. Además, estos sistemas de suministro de fármacos tienen un potencial uso en la transferencia de agentes moleculares e inmunológicos al sistema biológico. Estos se usan para la liberación génica y para hacer péptidos terapéuticos recombinantes sintetizados mediante la fusión de nuevos genes en las células pudiendo transferir agentes neurotróficos para abolir enfermedades neurodegenerativas (Upadhyay, 2014). Además, su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) los convierte en un componente importante para una terapia a nivel del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, la citotoxicidad generada por las nanopartículas o sus productos de degradación sigue siendo un problema importante en el desarrollo de fármacos. Es más, se ha demostrado que el uso de nanopolímeros puede llegar a presentar efectos adversos tóxicos debido a su degradación, teniendo como consecuencia la creación de alteraciones que pueden tener consecuencias graves para el SNC.

4.2.2. Nanopartículas de nanogel polimérico

Los nanogeles son hidrogeles compuestos por una red de polímeros hidrófilos a nanoescala. En el proceso de síntesis pueden ser cargados directamente con fármaco ya sea por equilibrio o por hinchamiento en agua, seguido de una reducción en el volumen de disolvente y colapso de gel, dando lugar a la formación de nanopartículas empaquetadas de forma compacta. Los nanogeles se pueden usar para la liberación controlada de fármacos hidrófilos e hidrófobos variando la composición, la conformación de polímeros y el grado de reticulación. La cinética de liberación del fármaco también puede controlarse variando la velocidad de degradación de los enlaces cruzados y a través de estímulos externos, especialmente en hidrogeles sensibles a los estímulos, cuya degradación puede ser controlada por propiedades externas tales como pH y temperatura. Los nanogeles catiónicos se han estudiado principalmente para la administración génica después de la encapsulación espontánea de genes cargados negativamente y de ADN antisentido (Kompella *et al.*, 2013).

4.2.3. Nanopartículas liposómicas

Los liposomas son muy versátiles en cuanto a la carga de fármacos. Esto es manifiesto ya que pueden encapsular fármacos hidrófilos en el núcleo y fármacos lipófilos en la bicapa, además de que la carga iónica del fármaco puede facilitarse adicionalmente utilizando lípidos catiónicos o aniónicos. El fármaco encapsulado normalmente se libera por difusión pasiva, fusión vesicular o disrupción vesicular. En la actualidad, la verteporfina es una terapéutica fotodinámica liposómica administrada sistemáticamente y utilizada clínicamente para el tratamiento de la neovascularización⁴ coroidea subfoveal (Ruiz-Moreno *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha encontrado que las formulaciones liposómicas suministradas de forma intravítrea tienen una toxicidad tisular mínima y una semivida del fármaco mejorada reduciendo así la eliminación del fármaco de la cavidad vítrea y reduciendo el número de aplicaciones (Kompella *et al.*, 2013). La estabilidad de los liposomas sigue siendo una de las cuestiones más importantes en el desarrollo de liposomas de fármacos, para que su preparación tenga como resultado liposomas físicamente estables, la composición de lípidos y la relación de fármaco-lípido han de considerarse y equilibrarse. Para minimizar la agregación y aumentar la estabilidad, a menudo se incluyen colesterol o algunos fosfolípidos aniónicos o catiónicos. De este modo, para conseguir una elevada proporción fármaco-lípido mientras se retiene la estabilidad fisicoquímica a largo plazo, se emplea un método de liofilización para obtener un polvo de fármaco-lípido seco, que se rehidrata en una solución acuosa inmediatamente antes de su uso (Feng & Mumper, 2013).

4.2.4. Nanopartículas micelares

Las micelas son los sistemas coloidales más simples formados espontáneamente por moléculas anfifílicas. Dependiendo de los tipos de moléculas anfifílicas, las micelas pueden dividirse en micelas lipídicas, micelas poliméricas y micelas híbridas lipídico-poliméricas. A baja concentración, las moléculas anfifílicas salen al medio acuoso en un estado separado, mientras que cuando la concentración aumenta comienzan a ensamblarse formando una estructura micelar, impulsadas por la disminución de la energía libre. La concentración más baja a la que se forman las micelas se denomina concentración micelar crítica (CMC).

Como sistema coloidal simple, se utilizan nano-portadores micelares para suministrar principalmente fármacos hidrófobos, mientras que a veces también se suministran agentes hidrófilos o anfipáticos. El aumento de la retención de fármacos en las micelas probablemente se asocia con la integridad de las micelas (Feng & Mumper, 2013). Además, estas micelas poliméricas contienen típicamente polietilenglicol debido a su capacidad para prevenir la agregación y prolongar el tiempo de circulación puesto que no son reconocidas por los macrófagos del hígado y, por tanto, no serán fagocitadas (Klibanov *et al.*, 1990). Estos sistemas micelares son termodinámicamente estables a la dilución y poseen una toxicidad reducida, en comparación con las micelas tradicio-

⁴ Desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya preexistentes.

nales basadas en tensioactivos, con concentraciones micelares críticas muy elevadas (Kompella *et al.*, 2013).

4.2.5. Nanopartículas dendrímicas

Los fármacos pueden estar atrapados en la red de dendrímeros a través de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas e interacciones iónicas o pueden conjugarse mediante enlaces covalentes. Los dendrímeros de poliamidoamina son los dendrímeros más investigados para la administración de fármacos y genes (Kompella *et al.*, 2013).

4.2.6. Nanopartículas de quitosano

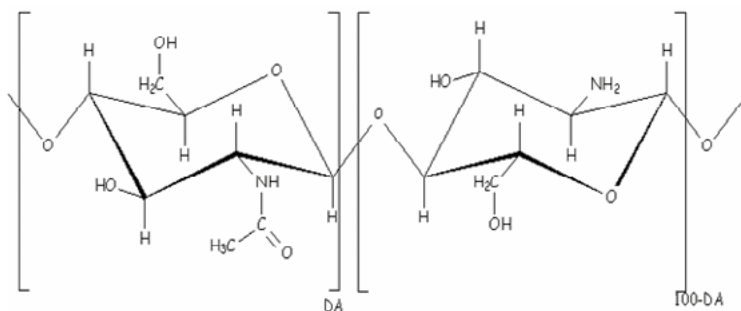


Figura 3. Estructura química del Quitosano (Chitosan), por File Upload Bot (Magnus Manske). Licencia CC BY-SA 2.5.

El quitosano o chitosano (Figura 3) es un polisacárido lineal derivado de la quitina, que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos. El grupo amino del quitosano experimenta fácilmente protonación en condiciones ácidas y neutras, dando como resultado una carga neta positiva. Esto hace que el quitosano sea soluble en agua y también actúa como bioadhesivo, ya que el quitosano cargado positivamente puede unirse a las mucoproteínas cargadas negativamente. La ventaja que supone esta interacción es la de prolongar el tiempo de permanencia de los medicamentos unidos a quitosano en la circulación, aumentando así la biodisponibilidad del fármaco (Wang *et al.*, 2011). La administración de fármacos a través de nanopartículas de quitosano puede controlarse mediante la degradación del polímero, que puede ajustarse variando el peso molecular y el grado de desacetilación del quitosano. Como resultado, se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano proporcionan una liberación sostenida que va de días a meses (Prabaharan & Mano, 2004). Además, muestran propiedades únicas como la mucoadhesión, consecuencia de la carga superficial positiva, lo que le permite, por ejemplo, permanecer en la superficie ocular durante un tiempo prolongado después de la administración tópica, razón de que sea foco de atención de la oftalmología (De Salamanca *et al.*, 2006). Por otra parte, los grupos hidroxilo de la estructura polisacárida del quitosano compiten con el agua en la superficie de los

tejidos y, por lo tanto, proporcionan medios adicionales de bioadhesión (Kompella *et al.*, 2013). Además, presenta la capacidad de unirse a enzimas permitiendo su acción y así reducir costes económicos al facilitar su uso en diversos escenarios y se ha utilizado en estudios para la biorremediación de disruptores endocrinos.

4.2.7. Nanopartículas proteicas

La mayoría de las biomoléculas adsorbidas en la superficie de las nanopartículas en el plasma sanguíneo son proteínas, aunque recientemente también se ha dado noticia de algunos rastros de lípidos, aunque en proporciones bastante más inferiores. La adsorción de proteínas en la superficie de las nanopartículas se rige por las afinidades de unión proteína-nanopartícula, así como las interacciones proteína-proteína. Cuando las proteínas interactúan con nanopartículas forman lo que se denomina una "biocorona". Las proteínas que se adsorben con alta afinidad forman lo que se conoce como la biocorona "dura", que consiste en proteínas estrechamente unidas y de difícil desorción. Por otro lado, aquellas proteínas que presentan baja afinidad forman una estructura que recibe el nombre de biocorona "blanda", y que consiste en proteínas unidas libremente. Tanto la biocorona blanda como la dura pueden definirse en función de sus tiempos de intercambio. Por norma general la biocorona dura presenta tiempos de intercambio mucho más altos, en el orden de varias horas. Esto es importante para entender cómo interactúan con los sistemas biológicos, porque esta biocorona permite que el sistema inmunológico lo reconozca como propio permitiendo su libre circulación en el organismo. Sin embargo, la interacción entre esta estructura proteína-nanopartícula y la célula no es tan simple como se podría pensar en un principio ya que depende de varios factores como son: que la membrana celular debe poseer los receptores para las proteínas unidas a las nanopartículas; que las proteínas se presenten en la orientación correcta para interactuar con el receptor; y que la proteína unida a las nanopartículas pueda competir eficazmente con la proteína libre para el receptor (Rahman *et al.*, 2013).

La albúmina, una proteína situada principalmente en el plasma sanguíneo, ofrece ventajas únicas sobre otros tipos de materiales para las nanopartículas, ya que es una proteína endógena. Estas ventajas consisten en el aumento de la solubilidad del fármaco, disminución de la toxicidad del fármaco, protección de los fármacos frente a la oxidación y aumento de la semivida del fármaco (Kragh-Hansen *et al.*, 2002).

4.2.8. Nanopartículas lipídicas

La mayoría de las nanopartículas basadas en lípidos están diseñadas para ser más adecuadas y eficientes para la encapsulación de fármacos lipófilos. Sin embargo, un problema significativo con estos sistemas es que los fármacos lipófilos son a menudo, *in vivo*, liberados muy rápidamente de las nanopartículas a causa de la rápida partición de los fármacos en la sangre debido, en parte, a la alta unión proteica (Feng & Mumper, 2013).

CAPÍTULO 5

USO DE NANOPARTÍCULAS EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Incluso cuando sus cualidades para el uso en el tratamiento y el diagnóstico se definen como casi infinitas, la mayoría de los estudios se han centrado en su uso en el diagnóstico por imágenes, sobre todo por parte de las nanopartículas metálicas. Esto se debe a sus propiedades ópticas, descritas anteriormente (apartado 4.1). Debido a que la distribución biológica de las nanopartículas depende directamente de su tamaño, se han clasificado de acuerdo con el tamaño total de las partículas para su uso en el diagnóstico de la siguiente manera:

1. Nanopartículas de óxido de hierro ultraparamagnético (USPIONs) de diámetro inferior a 50 nm.
2. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) con tamaño de cientos de nanómetros.
3. Partículas micronizadas de óxido de hierro (MPIO) con un diámetro superior a 1 μm .

La vía de administración depende del tamaño que presentan, por ello las dos primeras suelen ser administradas por vía intravenosa mientras que la tercera se limita a la administración oral debido a su gran tamaño, lo que tiene como consecuencia la limitación de que sólo se puede usar para la exploración del aparato gastrointestinal. Existen también otras formulaciones, como las partículas de óxido de hierro monocristalino (MION) y óxidos de hierro reticulados (CLIO) (Geraldès & Laurent, 2009).

A pesar de las inversiones y los avances en cuanto al estudio de las nanopartículas en el diagnóstico por imagen, se piensa que todavía no se ha alcanzado su máximo potencial en su uso en la clínica, sobre todo en el contexto de la focalización (Toy *et al.*, 2014).

5.1. APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA RESONANCIA MAGNÉTICA

La resonancia magnética (RM) se basa en la respuesta del spin del protón en presencia de un campo magnético externo cuando se dispara con un pulso de radiofrecuencia (RF). Los protones se alinean en una dirección cuando son sometidos a este campo magnético externo y al aplicar el pulso de RF son perturbados para

posteriormente relajarse y volver a su estado original. Existen dos procesos de relajación independientes: relajación longitudinal (T1) y transversal (T2), estos dos procesos son los que se utilizan de forma habitual para obtener las imágenes de RM. Los agentes de contraste consistentes en nanopartículas presentan ciertas ventajas frente a los utilizados de forma convencional (Zhu *et al.*, 2013):

1. La bioestabilidad y la biodistribución sintonizable pueden lograrse mediante modificación de la superficie.
2. Se pueden ajustar diferentes grados de biocompatibilidad y propiedades de imagen por su composición química, formas y tamaños.
3. Pueden identificar el objetivo deseado por conjugación específica con interacciones de moléculas biológicas, tales como anticuerpos, ácidos nucleicos y péptidos.
4. La imagen multimodal también se puede lograr utilizando una combinación de propiedades ópticas y magnéticas de los nanomateriales.

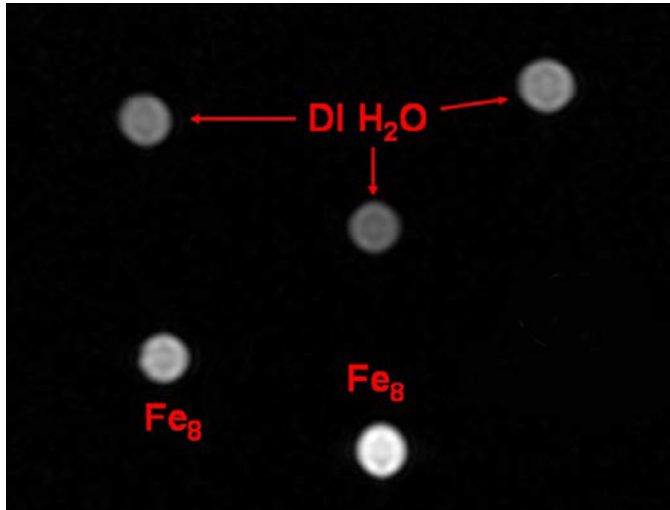


Figura 4. Esta imagen muestra lo que sucede cuando se usan nanoimanes para alterar las propiedades nucleares del hidrógeno en el agua, aumentando el brillo (puntos brillantes debajo del centro y la izquierda) en comparación con el agua desionizada (arriba) (Using Nano-Magnets to Enhance Medical Imaging), por National Institute of Standards and Technology, 2007. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Using_Nano-Magnets_to_Enhance_Medical_Imaging_\(5940526011\).jpg#file](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Using_Nano-Magnets_to_Enhance_Medical_Imaging_(5940526011).jpg#file). Reimpresión autorizada.

La RM es actualmente una de las herramientas de diagnóstico más potentes en el ámbito de las ciencias médicas, ya que es capaz de adquirir información tomográfica tridimensional en muestras de tejido completo con una alta resolución espacial y temporal. A pesar de que la realización de una RM de un tejido nos permite observar detalles anatómicos en los órganos, somos incapaces de diferenciar las células sanas de aquellas que presentan alguna patología, dado que las diferencias que presentan en el tiempo de relajación son muy pequeñas. Por ello es tan importante el uso de agentes

de contraste que permitan aumentar la sensibilidad de la imagen, y ahí es donde intervienen las nanopartículas (Zhu *et al.*, 2013). Diversas investigaciones han demostrado que la mejora del contraste de RM (Figura 4) con el uso de nanopartículas magnéticas está altamente relacionada con su composición, tamaño, propiedades superficiales y el grado de agregación en el entorno biológico. Las propiedades importantes de la fagocitosis celular de las nanopartículas magnéticas han ampliado las aplicaciones de la RM mejorada por contraste más allá de la imagen de morfología vascular y de tejido, permitiendo muchas nuevas aplicaciones de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (IONPs) para el diagnóstico por RM de enfermedades hepáticas, metástasis de cáncer a ganglios linfáticos y seguimiento *in vivo* de células implantadas y de los injertos. Sin embargo, las especificidades de estas nanopartículas magnéticas en el diagnóstico de la enfermedad son limitadas. La magnitud de los efectos del contraste también precisa ser mejorada para conseguir una alta sensibilidad a los cambios mínimos en la enfermedad, y para la detección de biomarcadores específicos. Por lo tanto, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas y diseñadas por ingeniería genética se desarrollan para satisfacer los intereses crecientes para la generación de imágenes *in vivo* no invasivas de actividades moleculares y celulares dirigidas a una enfermedad (Huang *et al.*, 2012). Uno de los grandes avances que ha proporcionado la RM es, por ejemplo, el análisis de sistema linfático, el cual es difícil de evaluar debido a que sus canales y ganglios linfáticos son pequeños y no son accesibles directamente. De hecho, la RM presenta grandes ventajas para su estudio gracias a su alta resolución y el hecho de que este método no presenta radiación ionizante (Bulte & Modo, 2007). Por desgracia, el uso de nanopartículas como agentes de contraste también presenta ciertas complicaciones, por ejemplo, en el caso de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, este radica en que presentan una superficie hidrófoba y altamente cargada negativamente lo que conduce a la agregación y formación de grandes racimos que como consecuencia reducen el potencial de absorción celular. La solución que se presenta para evitar estos inconvenientes consiste en recubrir las nanopartículas con estabilizadores que pueden ser tanto carbohidratos como polímeros naturales que se añaden en el momento de la preparación, dando como resultado una arquitectura característica núcleo-envoltura (Kasten *et al.*, 2014).

5.1.1. Uso como agentes de contraste T1

El gadolino (Gd) es el ión metálico más utilizado clínicamente como agente de contraste paramagnético T1, pero los iones Gd libres son citotóxicos y se acumulan en el hígado, el bazo y el hueso. Por eso, al Gd se le aplica un proceso de quelación que intenta evitar esa posible toxicidad, usando grandes moléculas orgánicas que forman un complejo estable alrededor del Gd, complejo que se elimina predominantemente a través de la orina. Sin embargo, aunque el Gd se considera seguro cuando se administra como un compuesto quelatado, el uso de algunos quelatos de Gd en personas con enfermedad renal se ha relacionado con una complicación rara pero grave, la afección médica conocida como “fibrosis sistémica nefrogénica”. Además, para ciertas pruebas diagnósticas como la angiografía⁵ por RM el margen de tiempo para la

⁵ Estudio por imagen de los vasos sanguíneos.

obtención de imágenes por contraste es muy estrecho, debido a que las nanopartículas usadas como agentes T1 presentan una mayor carga útil paramagnética de superficie que rotan o caen más lentamente que los compuestos organometálicos de moléculas pequeñas típicamente usados como “blood-pool agentes”⁶. Como consecuencia de esto, de la rápida extravasación que provoca limitaciones en la obtención de imágenes en alta resolución, y debido a sus breves tiempos de circulación sanguínea, su escasa sensibilidad de detección y la preocupación por su toxicidad, las investigaciones por RM han cambiado a los agentes de contraste T2, especialmente a las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (Estelrich *et al.*, 2015).

5.1.2. Uso como agente de contraste T2

Por definición, los agentes de contraste T2 interactúan con moléculas de agua cercanas al inducir un campo magnético local en el que se acorta la relajación transversal (T2) del agua. Este efecto se evidencia como un área relativamente “oscura” en las imágenes ponderadas en T2. La relajación de la esfera externa, que describe el comportamiento de relajación de las moléculas de agua que rodean a los agentes de contraste, es uno de los contribuyentes más importantes al contraste de RM. Según el modelo de esfera externa de relajación transversal, la relajabilidad r_2 es proporcional a la magnetización de las partículas (M) (Cowger *et al.*, 2015). Los agentes de contraste T2 (o agentes de contraste negativos) disminuyen la intensidad de la señal de RM de los tejidos en los que se acumulan. Las nanopartículas de óxido de hierro se han utilizado como agentes de contraste T2 durante más de 25 años. Estos óxidos de hierro pueden ser ferromagnéticos o superparamagnéticos, dependiendo del tamaño del núcleo de la nanopartícula. Dos óxidos de hierro son los que se utilizan fundamentalmente para aplicaciones biomédicas: la magnetita (Fe_3O_4), y su forma oxidada y más estable de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). El desarrollo de nanomateriales que pueden filtrar los artefactos de RM permite la discriminación entre las señales procedentes de agentes de contraste o artefactos (Estelrich *et al.*, 2015). Las SPION se utilizan preferentemente para aplicaciones de RM debido a sus propiedades ya que no retienen el magnetismo después de la eliminación del campo magnético (Kasten *et al.*, 2014).

En los estudios, la conjugación de partículas de óxido de hierro individuales da como resultado una construcción con mayor relajación de T2 en relación con las nanopartículas individuales de óxido de hierro. La flexibilidad en el recubrimiento de núcleos de óxido de hierro con diferentes materiales poliméricos funcionalizados también ha facilitado el desarrollo de agentes de formación de imágenes multimodales. Por ejemplo, los agentes ópticos-RM se han desarrollado atrapando óxido de hierro superparamagnético dentro de partículas de lípidos dirigidas a proteínas cRGD⁷ marcadas con agentes fluorescentes. También se ha explorado la orientación de tejidos profundos con óxido de hierro superparamagnético para la imagen de tumores

⁶ Agentes de contraste utilizados en la angiografía.

⁷ Proteínas que contienen Arg-Gly-Asp.

primarios usando dianas tales como uroquinasa activador de plasminógeno⁸ (uPA), receptores de transferrina, receptores HER2⁹, receptor de quimiocina¹⁰. Además de proporcionar un medio para la amplificación de señal, estos agentes de contraste también pueden facilitar la detección de cánceres difíciles de tratar mediante el ajuste de las interacciones biofísicas (transporte intravascular) y bioquímicas (receptor diana) de la nanopartícula y la célula tumoral (Toy *et al.*, 2014).

Se ha informado recientemente que las nanopartículas elaboradas con Fe₅C₂ exhiben una elevada magnetización (~140 emu/g), una toxicidad relativamente baja y una síntesis relativamente sencilla. Más importante aún, la alta magnetización se traduce en una alta relajación r₂, que es 2-3 veces más alta que en el caso de las IONPs. Estos hallazgos sugieren un gran potencial de las nanopartículas de Fe₅C₂ como agente de contraste T₂ alternativo fundamentalmente en las exploraciones hepáticas. A la misma concentración de Fe, las nanopartículas de Fe₅C₂ pueden inducir con mayor eficiencia hipotensidades al hígado, lo que se atribuye principalmente a la alta relajación r₂. Una observación interesante es la acumulación de nanopartículas Fe₅C₂ de 5 nm en los riñones. Esto sugiere un posible aclaramiento renal de partículas de Fe₅C₂ de pequeño tamaño, lo que puede servir como una ventaja en otras aplicaciones de formación de imágenes (Cowger *et al.*, 2015).

5.1.3. Ventajas del uso de nanopartículas como agentes de contraste en resonancia magnética

La RM puede proporcionar alta resolución espacial y es el sistema de análisis estándar habitual para la obtención de imágenes de tumores cerebrales en un entorno clínico. Los quelatos de gadolinio tales como Gd-DTPA son agentes de contraste usados para RM, pero tales moléculas normalmente no atraviesan la BHE. Sin embargo, se están desarrollando placas de nanopartículas como agentes de contraste para proporcionar mejoras con respecto a las utilizadas actualmente. Las nanopartículas de óxido de hierro han sido ampliamente estudiadas como agentes de contraste T₂ para la obtención de imágenes de tumores cerebrales. El Ferumoxytol, que consiste en nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas con sorbitol carboximetil éter de poliglucosa, se ha utilizado como agente de contraste RM junto con un quelato de gadolinio estándar para pacientes con glioma recurrente de alto grado que reciben quimioterapia en ensayos clínicos de fase I (Cheng *et al.*, 2014).

Otra aplicación de la RM ha sido para la evaluación no destructiva del cartílago. Numerosos estudios han informado sobre el uso del marcado de óxido de hierro superparamagnético para permitir la detección de células mediante la RM. Así mediante este método se ha permitido demostrar la presencia de condrocitos marcados con óxido de hierro superparamagnético como regiones de intensidad de señal reducida (Ramaswamy *et al.*, 2009).

⁸ Glicoproteína sintetizada por el hígado.

⁹ Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

¹⁰ Proteína de bajo peso molecular perteneciente a la familia de las citoquinas.

Uno de los usos revolucionarios de la imagen de resonancia magnética (IRM) ha sido el seguimiento de las células de trasplante en el destino *in vivo*. Esto es útil para desarrollar terapias celulares exitosas y para las diferentes estrategias de ingeniería que tienen como finalidad la curación de defectos de tejidos blandos o para el aumento persistente de estos tejidos que permite la evaluación de la eficacia terapéutica de los trasplantes de células (Kasten *et al.*, 2014). La aplicación de tales métodos en el contexto de la ingeniería reconstructiva puede ser particularmente útil como un método no invasivo y no destructivo para la monitorización de la distribución celular. Tales métodos deben permitir la visualización longitudinal durante un período de tiempo del orden de al menos varias semanas después de su suministro, con el consecuente potencial en el ámbito de la aplicación clínica (Farrell *et al.*, 2008).

5.2. APLICACIONES EN LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR ULTRASONIDO

Los agentes de contraste de ultrasonido (ACU) han experimentado varias generaciones de desarrollo. Los agentes de contraste para la formación de imágenes moleculares de ultrasonido se componen principalmente de perfluorocarbonos, tanto burbujas de tamaño micrométrico gaseoso como gotas líquidas. Sin embargo, estas sondas están limitadas por el tamaño micrométrico de la burbuja, así como por su corto tiempo de vida (Kempen *et al.*, 2015). No importa qué composiciones de núcleo interno o capa externa se emplearon en los ACUs, todos comparten la misma estructura con sólo una interfaz y, por lo tanto, sólo pueden realizar una dispersión/reflexión en la imagen de ultrasonido desde el punto de vista estructural, dando lugar a la utilización limitada de la onda de ultrasonido. A pesar de que la producción de multi-dispersión/reflexión es de gran importancia, todavía sigue suponiendo un gran desafío técnico. Se ha propuesto un nuevo concepto de diseño basado en estructuras de ACUs (doble dispersión/reflexión en una única nanopartícula) el cual, dependiendo de las dos interfases contribuyentes, la doble dispersión/reflexión se produce en una única nanopartícula de sílice mesoporosa¹¹ (NSM) (Kempen *et al.*, 2015). En comparación con las nanopartículas de sílice pura, las NSMs poseen muchas propiedades atractivas, tales como una gran área superficial, un volumen de poro alto, un tamaño de poro uniforme y sintonizable, y una baja densidad de masa (Tarn *et al.*, 2013). Por lo tanto, desde el punto de vista de las evaluaciones de imágenes de ultrasonido, junto con el cálculo de la simulación y las mediciones acústicas, el tipo NSM actúa mucho mejor en cuanto a la mejora de la imagen de ultrasonidos en comparación con las nanoestructuras sólidas y huecas con una sola interfaz (Zhang *et al.*, 2015). Estas nanopartículas no son tan monodispersas como las nanopartículas de oro o tan coloidalmente estables como los nanocristales, y la falta de estas características contribuye a su ecogenicidad ultrasónica (Kempen *et al.*, 2015).

Las nanopartículas de oro y las nanopartículas de sílice mesoporosa hueca (NSMH) encapsuladas con perfluorohexano (PFH) se han utilizado tanto para la imagen de ultrasonido con contraste como para la terapia quirúrgica con ultrasonido enfocado

¹¹ Nanopartículas con un núcleo de sílice con canales regulares en su interior.

de alta intensidad (HIFU). Se mejoró la estabilidad de las nanopartículas, la capacidad de formación de imágenes de los ultrasonidos, así como la terapia HIFU, cubriendo las NSMHs con nanopartículas de oro y, posteriormente, mediante un recubrimiento con una capa de polietilenglicol. Esta mejora se atribuyó a que las nanopartículas de oro ancladas tienen la capacidad de poder alterar la amplitud de respuesta y absorber simultáneamente la energía de ultrasonido cuando se exponen a una frecuencia y potencia ultrasónicas apropiadas, intensificando así las señales de eco acústico y potenciando la respuesta térmica (Shi *et al.*, 2013).

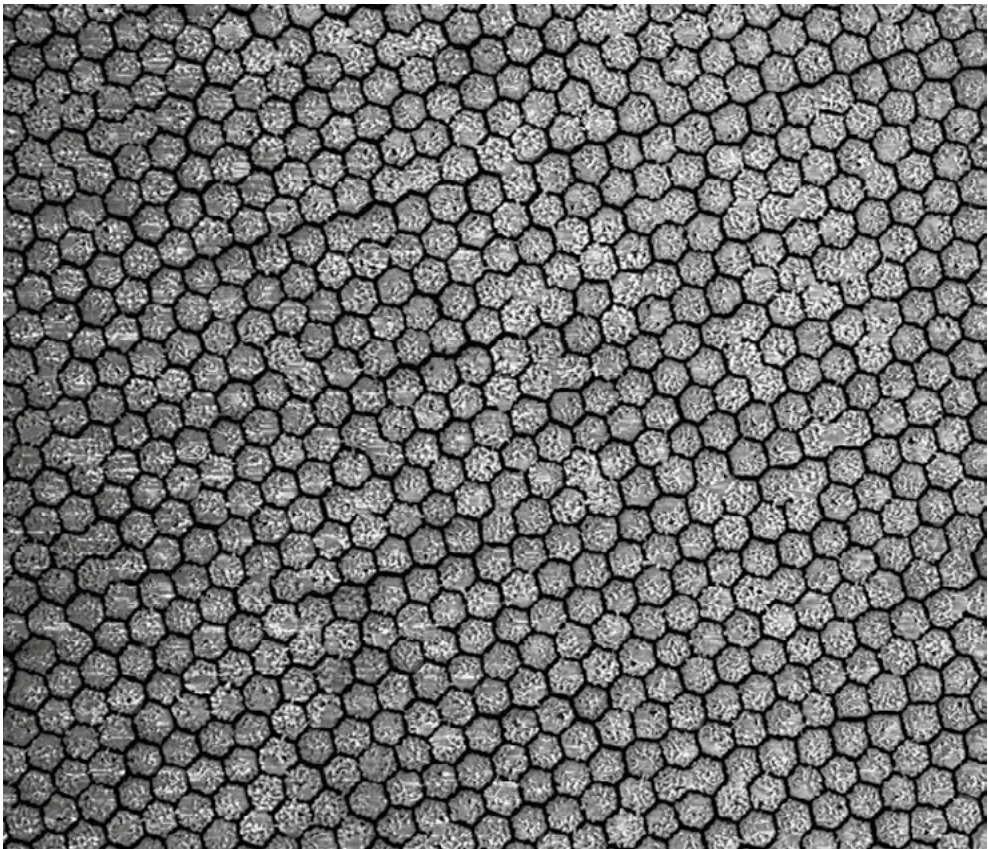


Figura 5. Micrografía de una red cristalina de nanopartículas (Micrograph of a Nanoparticle Crystal Lattice), por Environmental Molecular Sciences Laboratory. Licencia CC BY-NC-SA 2.0 (creative commons).

En el caso del diagnóstico de cáncer mediante ultrasonido, las partículas de ACU deben ser lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de las hendiduras endoteliales de los tumores (desde 380 a 780 nm) y lograr una imagen ultrasónica vascular satisfactoria. En segundo lugar, las partículas se pueden cargar con un grupo funcional específico (tales como anticuerpo, transferrina, pentapéptido cíclico (cRGD)

y ácido fólico) de manera que puedan ser dirigidos a tejidos tumorales específicos para su captación por parte de las células. Estas características deben facilitar el contraste eficaz para la imagen ultrasónica de las células tumorales. Gracias a todo esto, las nanopartículas dirigidas han mostrado una mejor capacidad de formación de imágenes tumorales y de formación de imágenes por ultrasonido *in vitro*. Sus características sugieren que la nueva nanopartícula dirigida puede ser aplicable a la imagenología molecular ultrasónica del receptor de folato (RF) (altamente sobreexpresado en varios tipos de tumores humanos, incluyendo cáncer de hígado, pero generalmente ausente en la superficie de células normales) (Hu *et al.*, 2016). Además, el ultrasonido es una herramienta prometedora para la obtención de imágenes en tiempo real de la entrega celular debido a su alta resolución espacio/temporal ya que poseen una alta profundidad de imagen (Kempen *et al.*, 2015), siendo realmente útil rastrear las interacciones entre nanopartículas y células.

Las imágenes por resonancia magnética pulsátil (pMMUS) se han presentado como una técnica de imagen molecular basada en ultrasonidos capaz de detectar la presencia y distribución de nanoestructuras magnéticas a través de sus respuestas mecánicas a un campo magnético aplicado; y se ha demostrado que los agentes de contraste magnéticos con geometrías más grandes (es decir, nanoclusters) pueden mejorar la señal pMMUS (Mehrmohamamdi *et al.*, 2011).

5.3. APLICACIONES EN TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Existe una amplia gama de elementos útiles para la obtención de un buen contraste en la tomografía computarizada (TC) y se han propuesto diversos tipos de formulaciones como agentes de contraste alternativos, de uso en TC, a lo largo de los años, tales como quelatos de gadolinio o grupos de tungsteno. El material utilizado para generar contraste para la TC suele estar en el núcleo de la partícula. El yodo, el oro o el bismuto son los elementos generadores de contraste utilizados con mayor frecuencia, sin embargo, se ha investigado el uso de diversos elementos tales como bromo, tantalio, platino, iterbio, itrio, gadolinio, tungsteno y otros. En el uso de nanopartículas de oro como contraste de TC en experimentos *in vitro*, la hematología, la química sanguínea o la histología no mostraron signos de toxicidad, aunque la microscopía electrónica de transmisión y la espectrometría de masas por plasma sí mostraron una retención hepática persistente hasta tres días después de la inyección (Cormode *et al.*, 2014).

Por su parte, el bismuto es considerado como uno de los elementos pesados que presentan una mayor biocompatibilidad (a pesar de que en su forma iónica es tóxica a 0.2 M) (Luo *et al.*, 2012) y es mucho más barato que el oro. Sin embargo, en comparación con las nanopartículas de oro, se sabe mucho menos sobre su síntesis, en términos de control del tamaño, la forma y la química superficial (Cormode *et al.*, 2014).

Las AuNPs han demostrado ser adecuadas como agentes de contraste para la imagen por TC debido a su elevado número atómico, su coeficiente de absorción, su tamaño y su morfología (Tian *et al.*, 2015). Las AuNPs se utilizan de forma modificada junto con quelatos de Gd, sin embargo, este enfoque normalmente conduce a una

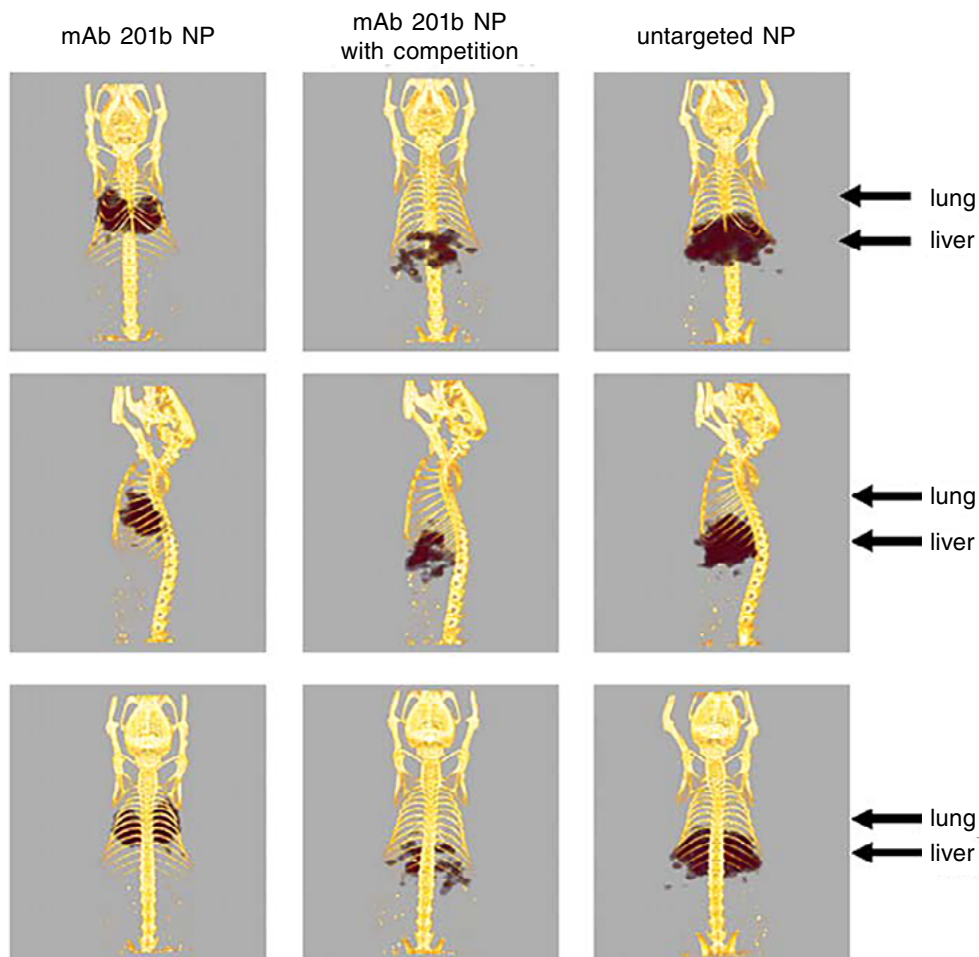


Figura 6. Imagen obtenida con CT mediante el uso de nanopartículas (SPECT-CT of radioactive nanoparticles in mouse), por McLaughlin et al., 2013. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SPECT-CT_of_radioactive_nanoparticles_in_mouse.png. Reimpresión autorizada.

carga útil de centro magnético bajo (Gd^{+3}) por partícula y limita la funcionalización adicional. Para superar estas limitaciones, algunos autores describen un método para combinar AuNPs y nanopartículas GdMOF (estructura metal-orgánica de gadolinio) a través de un procedimiento de modificación de polímero. El desarrollo de estos nuevos nanocompuestos no sólo ofrece un excelente contraste tanto en la TC como en la RM, sino que también proporciona un tiempo de circulación potencialmente mayor en comparación con los agentes de contraste de moléculas pequeñas utilizados actualmente (Tian *et al.*, 2015). Incluso a concentraciones muy bajas de AuNP, hay manifiestos cambios de atenuación visibles en la imagen de TC llevada a cabo en un estudio con cerdos, en el que no se observaron anomalías en el análisis bioquímico o en el examen macroscópico o microscópico de los tejidos. Se observó que las GA-AuNP

(nanopartículas de oro estabilizadas con goma arábica¹²) se distribuyen rápidamente desde el torrente sanguíneo a los siguientes tejidos, en orden de predominio: hígado, pulmón, riñones y bazo (Boote *et al.*, 2010).

Los sistemas de TC con alta resolución (Micro-TC) se han convertido en una herramienta extremadamente importante en la investigación de animales pequeños. Micro-TC produce imágenes anatómicas no invasivas, tridimensionales, de alta resolución, que pueden proporcionar una gran cantidad de información sobre la función normal de los animales y la patología. La creciente disponibilidad y el bajo costo de los escáneres de micro-TC prometen aumentar en gran medida el uso y el impacto de esta técnica en estudios de animales pequeños (Ashton *et al.*, 2015).

¹² Goma arábica: polisacárido obtenido de la resina.

CAPÍTULO 6

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas, de un tiempo a esta parte, se consideran una de las grandes y más prometedoras herramientas para el diagnóstico médico. Diferentes actividades de investigación relacionadas con el cáncer han demostrado que la NP puede hacer a las células cancerosas más vulnerables a los tratamientos convencionales e incluso destruirlas por sí mismos (Figura 7). Sin embargo, no sólo en esta enfermedad se han logrado grandes avances, sino en otros tratamientos como es el caso de las úlceras del pie diabético, uno de los problemas más graves que afectan a los pacientes con diabetes mellitus, o en el tratamiento de la tuberculosis. Además, se han hecho avances prometedores en el caso de sus aplicaciones como vehículo de fármacos, abriendo puertas para tratamientos menos invasivos y más específicos.

6.1. USO DE NANOPARTÍCULAS EN TRATAMIENTO

Las nanopartículas magnéticas se usan en la terapia tumoral, siendo introducidas selectivamente en las células tumorales y, posteriormente, aumentada su temperatura usando un campo magnético oscilante para alcanzar cerca de 43°C (esta temperatura es conocida por hacer a las células tumorales más sensibles a la radiación y otros tratamientos). Los ferrofluidos de nanopartículas se han usado en el tratamiento de tumores sólidos y posteriormente como magnetoliposomas en sistemas de suministro de fármacos y/o péptidos y en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Issa *et al.*, 2013). Como se ha referido antes, las nanopartículas tienen una relevancia significativa en el tratamiento del cáncer, particularmente en lo que respecta a la administración del fármaco.

Un estudio reciente con ratas estableció que las nanopartículas Pt (NH₃)₄Cl₂/SiO₂ causan aproximadamente una reducción de tamaño del 73 % del glioblastoma multiforme (GBM). Los autores asumieron que la actividad anticancerígena de Pt (NH₃)₄Cl₂/SiO₂ provenía de la muerte de las células cancerosas a través de radicales libres inducidos en el ADN (López *et al.*, 2011). En el caso de las nanopartículas de oro la mayoría de sus aplicaciones biológicas consisten en su uso como agente pasivo, ya sea como una sonda para microscopía electrónica o como un vehículo para depositar biomoléculas en las células. Mukherjee *et al.* (2005) demostraron que las nanopartículas de oro se pueden utilizar como agentes activos para interferir directamente con los procesos celulares y poseen capacidad antiangiogénica. El resultado de estas

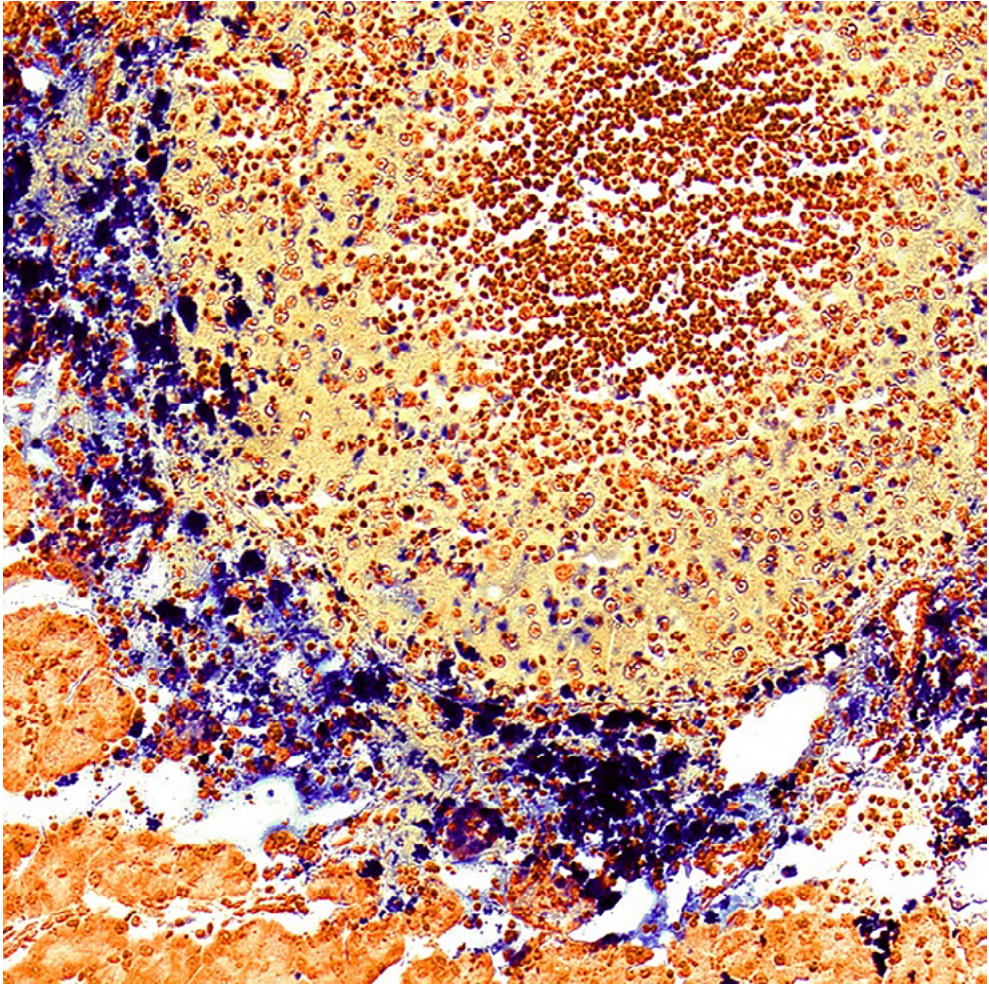


Figura 7. Uso de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro en la terapia de cáncer de páncreas guiada por imagen (Tumor-Targeted Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Image-guided Pancreatic Cancer Therapy), por National Institute of Health. Licencia CC BY-NC 2.0 (creative commons).

propiedades antitumorales se debe a la inhibición del VEGF165¹³ que es el encargado de la formación de nuevos vasos sanguíneos esenciales para el crecimiento y la progresión de los tumores.

Hou *et al.* (2017) cargaron una nanopartícula de núcleo revestido de ácido hialurónico modificado que interacciona con el receptor proteína quinasa 3 (RIP3) en combinación con cloroquina (CQ) para eliminar células de cáncer de colon. En el estudio se descubrió por primera vez que CQ regulaba la expresión de RIP3 en células

¹³ Factor de crecimiento endotelial vascular.

cancerígenas CT26. El RIP3 puede participar en la autofagia relacionada con CQ y juega un papel importante en la necroptosis, que suele ir acompañada de autofagia, lo que sugiere que CQ y RIP3 pueden estar estrechamente relacionados. En este estudio, los experimentos *in vitro* e *in vivo* confirmaron que la combinación de mRIP3 (ratón) y CQ tiene un efecto inhibitorio significativo contra tumores.

En el caso de la tuberculosis (TB), se observó que la terapia basada en nanopartículas podría ofrecer una ventaja potencial sobre su tratamiento convencional, ya que tiene un gran potencial para disminuir el régimen de fármacos y mejorar el cumplimiento del paciente. Y no sólo eso, sino que además el uso de estas nanopartículas es una de las medidas prometedoras adoptadas actualmente para mejorar la vacunación contra la tuberculosis. En general, incluso a dosis terapéuticas bajas, la biodisponibilidad y la utilidad son superiores, además de que el período de quimioterapia también puede reducirse (Nasiruddin *et al.*, 2017).

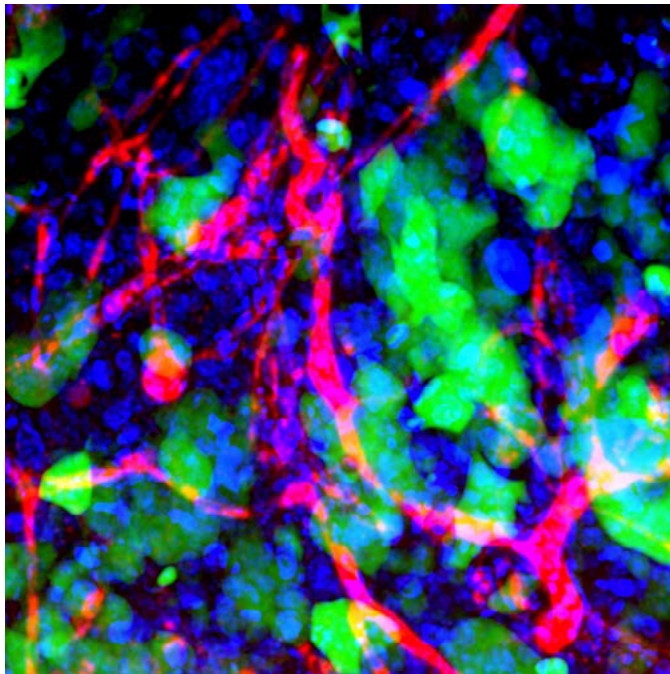


Figura 8. Nanopartículas en metástasis cerebral
(Nanoparticles in brain metastases), por National Institute of Health.
Licencia CCDPM 1.0 (creative commons).

6.2. APLICACIONES EN LA ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS

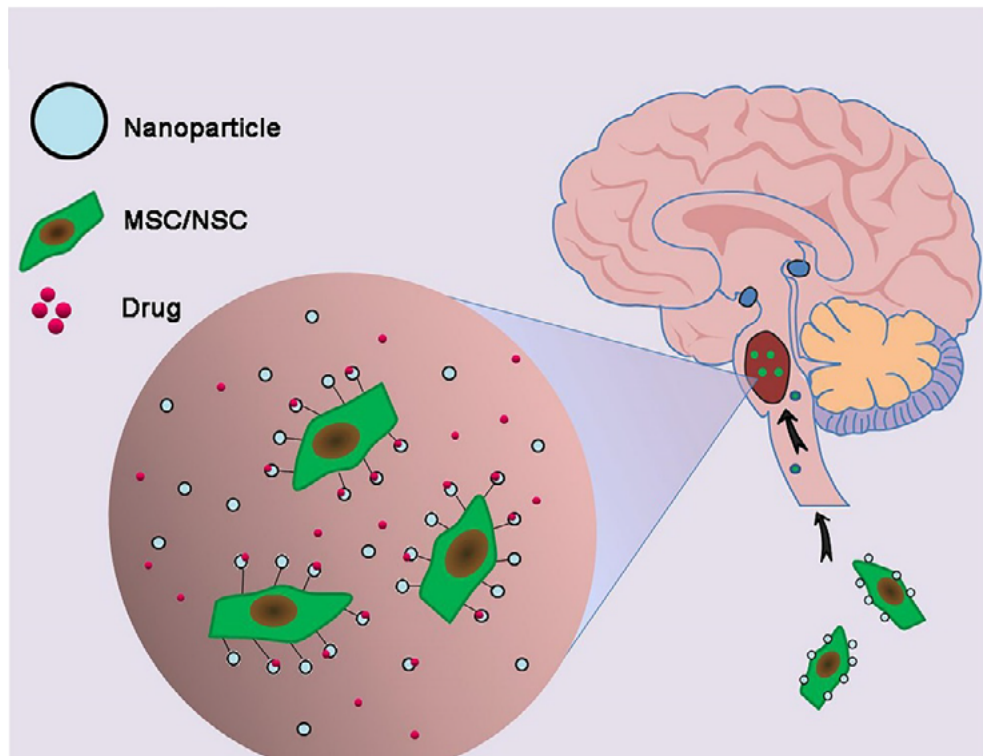


Figura 9. Administración de fármacos mediante el uso de nanopartículas (Drug delivery to diffuse intrinsic pontine glioma), por Daniel Mietchen. Licencia CC BY 4.0 (creative commons).

La combinación de nanopartículas y componentes biológicamente activos suscita un gran interés debido a las propiedades sinérgicas que están siendo explotadas por esta nueva tecnología (Kemp & Linhardt, 2010). Las nanopartículas tienen la capacidad de administrar numerosos fármacos (Figura 9) y genes en diversas partes del cuerpo de forma específica durante un período prolongado de tiempo. Se prefieren las nanopartículas basadas en polímeros para la liberación de fármacos debido a su baja toxicidad, a la liberación sostenida, biodegradabilidad y la presencia de lugares disponibles para realizar diversas modificaciones. La mayoría de las nanopartículas basadas en polímeros desarrolladas para sistemas de administración de fármacos tienen un tamaño medio de aproximadamente 100-200 nm, y se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. Por otra parte, estos nanomateriales utilizados como vía de transporte de fármacos o “nanocarriers”, pueden proteger los fármacos de su metabolismo rápido en la circulación sistémica, así como de la depuración llevada a cabo por el hígado, el riñón y el sistema reticuloendotelial, lo que mejora aún más la estabilidad de los fármacos y la especificidad de la diana (Devulapally &

Paulmurugan, 2014). También aumentan la sensibilidad y la selectividad en comparación con los agentes diagnósticos más convencionales (Kompella *et al.*, 2013).

Para ello se han desarrollado sistemas de liberación controlada. La biomolécula se dispone en el interior de la estructura nanoparticulada y se bloquea la salida del poro mediante una serie de polímeros o moléculas evitando la liberación prematura. La liberación de la biomolécula solo sucederá cuando la nanopartícula sea expuesta a un estímulo, el cual provoca la apertura del poro. Los estímulos pueden diferenciarse entre internos (pH, enzimas, red-ox...) y externos (ultrasonidos, luz, temperatura...). La Figura 10 muestra el proceso de liberación del fármaco.

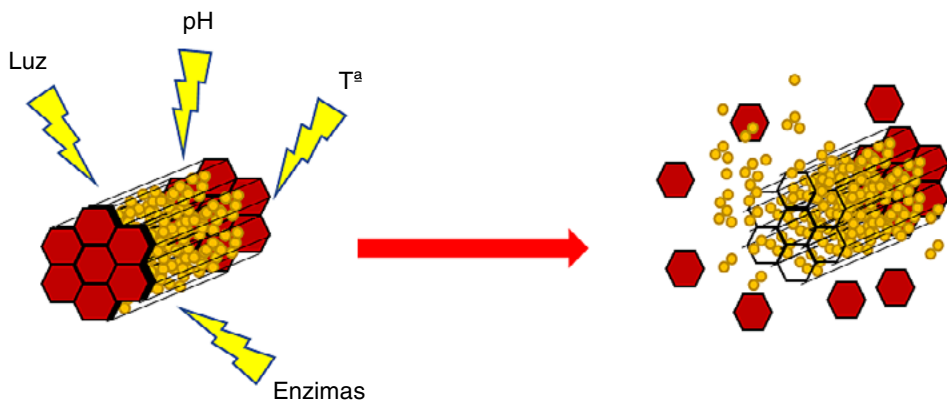


Figura 10. Proceso de liberación de un fármaco. Adaptado de Mora-Rasimundo *et al.* (2016).

El sistema inmune innato fácilmente reconoce y destruye el material extraño que entra en la circulación del cuerpo. En ausencia de camuflaje, las nanopartículas interactúan con las proteínas de la sangre, lo que resulta en un aclaramiento del sistema fagocítico mononuclear que reduce drásticamente la vida media de la nanopartícula (Babu *et al.*, 2014). Se han desarrollado muchos estudios con polietilenglicol (PEG) tratando de resolver este problema. El PEG es un polímero hidrófilo con una carga neutra que forma una capa densa sobre la superficie de la nanopartícula que genera un escudo estérico necesario para evitar que las proteínas de la sangre se unan a la superficie de las nanopartículas. Esto, efectivamente, retrasa la depuración fagocítica y confiere tiempo de circulación prolongado para las nanopartículas (She *et al.*, 2013). No obstante, es importante destacar que el PEG no es biodegradable, debido al peso molecular de sus cadenas, influyendo en la depuración renal (Babu *et al.*, 2014).

A pesar de los beneficios que confiere el PEG, se sospecha que la PEGilación¹⁴ induce respuestas inmunes e hipersensibilidad, especialmente cuando se incluye un agente inmunoestimulador. Se ha demostrado que los poliaminoácidos (como el ácido poliglútamico), los glicopolímeros y las polioxazolininas (POx) ayudan a las moléculas

¹⁴ Unión de un polietilenglicol a un fármaco.

y a las nanopartículas a evadir la depuración del sistema reticuloendotelial. Otros factores que afectan a la interacción reticuloendotelial son el tamaño, la composición, el potencial zeta (cuanto más cercana es la nanopartícula a la neutralidad (± 10 mV), más rápida es la penetración en el tejido), y la forma de las nanopartículas (Ernsting *et al.*, 2013).

Las nanopartículas de lípidos sólidos y los liposomas ofrecen un valor potencial como sistemas tópicos de administración de fármacos, además de las nanopartículas poliméricas y aquellas basadas en metales. Sin embargo, como demuestra el pequeño número de estudios clínicos avanzados, el impacto clínico de las nanopartículas y las mallas de fibra como sistemas de administración de fármacos tópicos o transdérmicos han sido limitados. Se requieren más estudios cuantitativos en el área de la toxicidad de las nanopartículas. Además, no existen comparaciones de piel sana *versus* piel enferma en el contexto de la eficiencia de penetración de las nanopartículas. Poco se sabe sobre los mecanismos de transporte de las nanopartículas a través de las tres capas principales de la piel. Otra observación interesante es que muy pocos estudios usan controles comercialmente relevantes, por ejemplo, el efecto de una formulación de un fármaco de nanopartículas se compara a menudo con pacientes sin ningún tratamiento o con uno de formulación libre en lugar de usar concentraciones de oro “estándar” como punto de referencia. En consecuencia, hay muchas preguntas interesantes sin respuesta y desafíos técnicos que proporcionan una oportunidad significativa para estudios de investigación adicionales (Goyal *et al.*, 2016).

Las nanopartículas también se usan para el tratamiento y manejo de enfermedades del segmento posterior del ojo tales como retinopatía diabética, retinoblastoma, retinitis pigmentosa y neovascularización coroidea debido a la difícil tarea asociada a la anatomía y fisiología de las barreras oculares (Kompella *et al.*, 2013). En realidad, el ojo es un excelente objetivo para el desarrollo de terapias genéticas. Las nanopartículas basadas en polipéptidos, particularmente CK30-PEG, se están convirtiendo en excelentes candidatos para ser vehículos de administración de genes retinales. La incorporación de estrategias de ingeniería de vectores diseñadas para mejorar los perfiles de expresión plasmídica puede ayudar a mejorar el rescate fenotípico en fotorreceptores de vástago y cono y en células del epitelio pigmentario retinal (Conley & Naash, 2010).

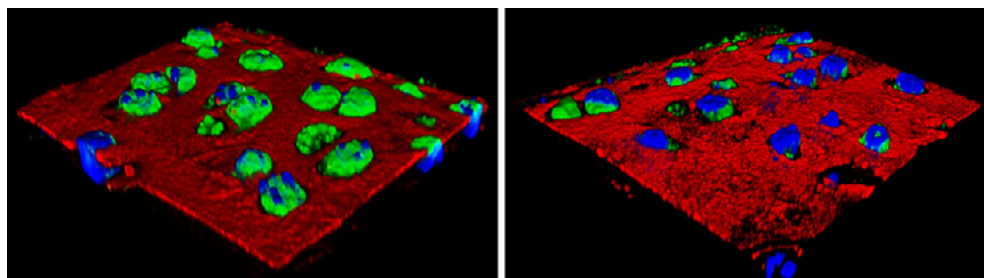


Figura 11. Imagen de la reducción de la inflamación producida por el uso de nanopartículas (Nanoparticles Reduce Inflammation after Injury), por National Institute of Arthritis and Musculoskeleta. Licencia CC BY-NC-SA 2.0 (creative commons).

Más recientemente, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) han demostrado ser adecuadas transportadoras para el suministro intracelular de ácidos nucleicos. Mora-Raimundo *et al.* (2019) aprovecharon la alta capacidad de carga de estas MSN para cargar sus poros con osteostatina, un péptido osteogénico. En dicho estudio se comprobó que este sistema podía administrar eficazmente esclerotina y osteostatina dentro de las células, con el consiguiente aumento de marcadores osteogénicos con un efecto sinérgico. La administración conjunta de ambas moléculas ayudó a la formación de hueso, siendo por tanto una alternativa potencial para tratar la osteoporosis.

CAPÍTULO 7

POSIBLES APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS EN EL CAMPO DE LA VETERINARIA

Aunque hay pocos estudios enfocados directamente en la medicina veterinaria, todo lo anteriormente indicado también es aplicable, ya que la medicina veterinaria y humana están estrechamente relacionadas y, paso a paso, esta tecnología llegará a las clínicas y hospitales veterinarios para dar el mejor tratamiento a los pacientes. Por lo tanto, los avances en este campo deben ser seguidos de cerca, ya que pueden ser utilizados en beneficio de la Veterinaria y tarde o temprano tendrán un impacto en el mundo animal.

Si bien muchas investigaciones y desarrollos importantes están enfocados a la agricultura, hay muchas visiones de futuro en aplicaciones para suministro de fármacos, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, nutrición animal, manejo de desechos de animales, cría de animales y preservación de identidad.

Entre otras razones, el hecho de que la nanotecnología haya adquirido gran relevancia se debe a que la administración de fármacos por vía parenteral es inadecuada para muchos fármacos nuevos, como aquellos que usan proteínas recombinantes, que tienen semividas cortas, permeabilidad pobre en membranas y son severamente tóxicos cuando se administran sistemáticamente en grandes dosis. Estas dificultades en la administración de fármacos basados en proteínas fueron las responsables del empeño en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos que pudieran ser introducidos en el cuerpo de tal manera que sus niveles terapéuticos pudieran mantenerse sin producir efectos secundarios indeseables (Dai *et al.*, 2005), y es ahí donde entran en juego las nanopartículas.

Las NPs como transportadores también han mejorado su biodisponibilidad y la selectividad de fármacos, incluso en tratamientos muy complicados como la malaria cerebral por infección por *Plasmodium falciparum* (Waknine-Grinberg *et al.*, 2013). Las nanopartículas suponen una potente herramienta para reducir el riesgo de resistencia a los fármacos tradicionales en el caso de la Parasitología, evitando algunos de los mecanismos de resistencia, aumentando la biodisponibilidad de los fármacos y potenciando el objetivo del tratamiento (Allahverdiyev *et al.*, 2013). Además, las partículas de vidrio revestidas con oro activo comúnmente conocidas como “nanoshells” (nanocáscaras) podrían ayudar a la medicina veterinaria a mejorar el tratamiento contra parásitos, facilitando el “encontrar” al parásito y la liberación del fármaco, destruyendo físicamente la infestación. También las nanoshells pueden ser útiles como biosensores, en el estudio de huésped-parásito. Los nanodispositivos pueden

permitir el diagnóstico de parásitos en los rebaños, lo que permite a los veterinarios sugerir un manejo adecuado de la salud (Cruz & Molento, 2015).

Otra de las ventajas del uso de las nanopartículas en el ámbito veterinario es su potencial de diagnóstico rápido. Un diagnóstico seguro de las enfermedades de los animales a veces puede hacerse sobre la base de signos o síntomas clínicos, pero un diagnóstico preciso suele requerir pruebas diagnósticas específicas, que pueden realizarse en clínicas veterinarias de punto de atención, pero a menudo implican acceso a un laboratorio de diagnóstico. El diagnóstico y tratamiento tempranos de las enfermedades no sólo reducen el riesgo de que el paciente animal desarrolle complicaciones a largo plazo, sino que, para algunas enfermedades con un tratamiento rápido, también reducirán su transmisión a otros animales y a los seres humanos. Los recientes desarrollos biotecnológicos, incluyendo micro y nanotecnologías, han conducido a la proliferación de nuevas pruebas de diagnóstico rápidas y eficaces que prometen una mejor gestión y control de las enfermedades infecciosas en los animales (Bollo, 2007).

El futuro de las nanopartículas prevé el desarrollo de dispositivos a nanoescala que tendrán la capacidad de detectar y tratar una infección, deficiencia de nutrientes u otro problema de salud mucho antes de que los síntomas sean evidentes en la macroescala. El veterinario será capaz de conocer el estado de cada animal, tanto de la condición fisiológica como de los niveles de ciertos compuestos, mediante la inyección de nanopartículas en un animal y posterior rastreo de las mismas (tras días, semanas o meses) simplemente pasando un detector sobre el cuerpo del animal, conociendo así si este presenta alguna enfermedad o trastorno fisiológico. El sensor que se encuentra en el animal, ya sea mediante la ingesta del mismo o por implantación, continuará enviando datos durante toda la vida del animal, e incluso posteriormente al sacrificio para rastrear productos de origen animal (Scott, 2007).

CAPÍTULO 8

TOXICIDAD PRESENTE EN LAS NANOPARTÍCULAS

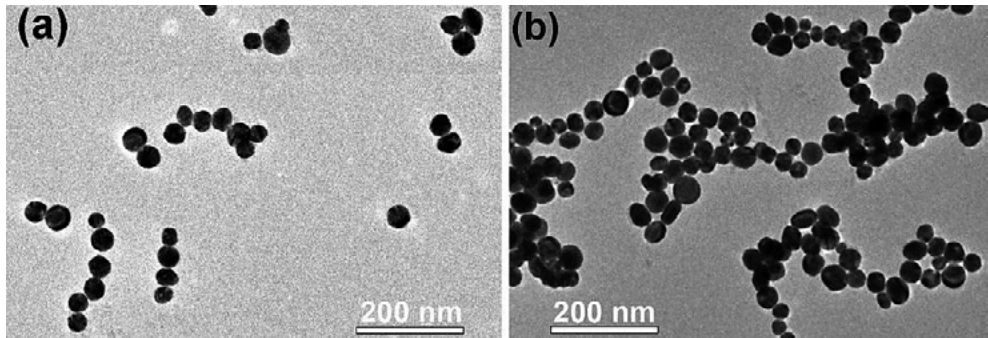


Figura 12. Autoensamblado (Self-assembling nanoparticles), por Argonne National Laboratory. Licencia CC BY-NC-SA 2.0 (creative commons).

Nuestro conocimiento actual de los efectos de las nanopartículas sobre la salud es limitado, pero sugiere que pueden ejercer efectos adversos en aquellos órganos que sirven de puerta de entrada al organismo, como los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal. Además, algunas nanopartículas pueden escapar del sistema inmune y trasladarse desde su punto de inserción, teniendo diversos efectos sobre otros órganos diana claves (Mo *et al.*, 2016). Los factores determinantes en la evaluación del peligro después de la exposición a las partículas son la composición química, la dosis y la ruta de administración/exposición. Sin embargo, en el caso de los nanomateriales, también hay que tener en cuenta factores adicionales como el tamaño, la superficie, la solubilidad, el autoensamblado (Figura 12), los efectos cuánticos, las nanoestructuras, la concentración y la agregación (Oberdörster *et al.*, 2005). Estudios anteriores sugirieron que los impactos biológicos de las nanopartículas están significativamente influenciados por una serie de características fisicoquímicas únicas de los nanomateriales ya sea individualmente o cuando se presentan como agregados. Es de gran importancia comprender cómo estos factores afectan la toxicidad de los nanomateriales, debiendo ser esta, idealmente, tan baja que no haya daños a los organismos o al medio ambiente (Mo *et al.*, 2016). En esta revisión analizaremos la toxicidad potencial que presentan dependiendo de su forma de administración, así como del tipo de nanopartícula.

DISEASES ASSOCIATED TO NANOPARTICLE EXPOSURE

C. Buzea, I. Pacheco, & K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, Biointerphases 2 (2007) MR17-MR71

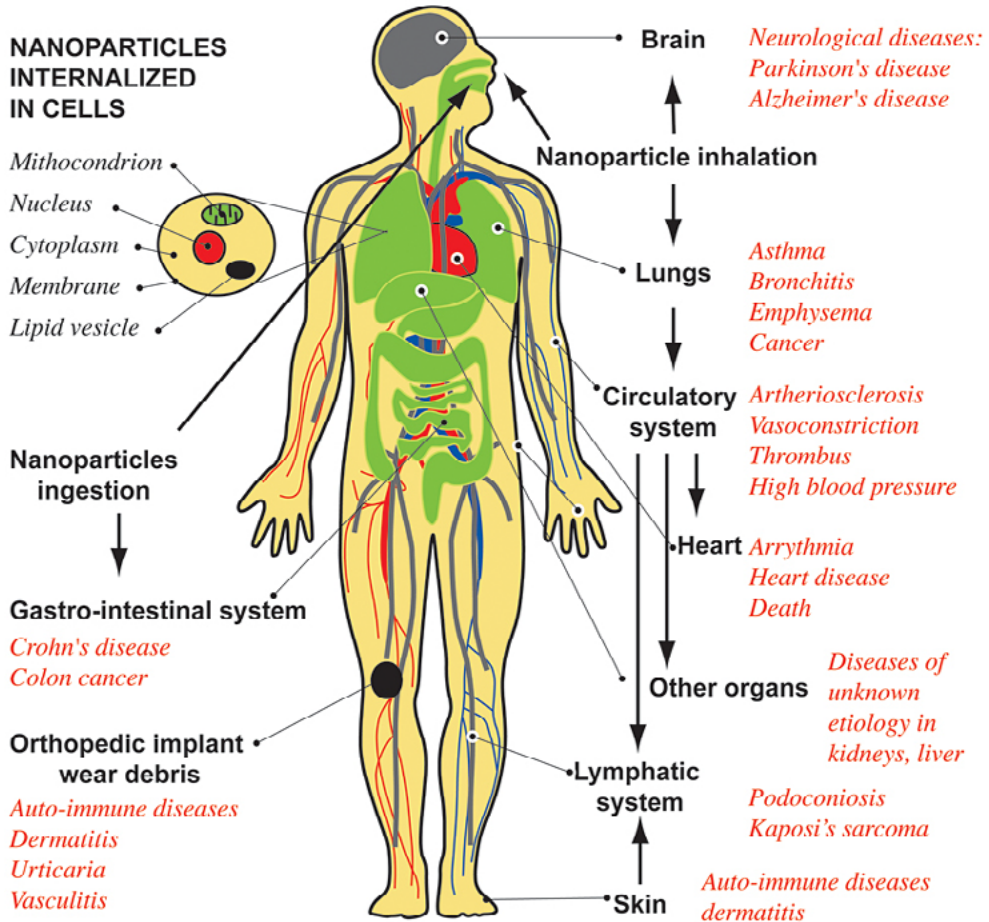


Figura 13. Vías de exposición a las nanopartículas y enfermedades asociadas (Pathways of exposure to nanoparticles and associated diseases as suggested by epidemiological, in vivo and in vitro studies), por Cristina Buzea, 2007 (Buzea & Pacheco, 2007). <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nanotoxicology.jpg>. Reimpresión autorizada.

8.1. TOXICIDAD DEPENDIENTE DE LA FORMA DE ADMINISTRACIÓN

8.1.1. Inhalación

La disposición relativa de las partículas inhaladas en las regiones nasofaríngea, traqueobronquial y alveolar del tracto respiratorio depende del tamaño de las partículas, las especies animales y la estructura del tracto respiratorio. Además, la relación entre tamaño y disposición es compleja (APAVM, 2014). Se ha comprobado que, durante

una administración por inhalación, la exposición a nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂NPs) (Figura 14) resulta en niveles aumentados de estrés oxidativo, inflamación pulmonar y engrosamiento intersticial de ratas. Además, la exposición a TiO₂NPs induce infiltración de células inflamatorias, enfisema pulmonar, edema, congestión, hemorragia, engrosamiento del intersticio pulmonar y apoptosis en pulmón de ratón. La tumorigénesis pulmonar puede estar asociada con inflamación pulmonar crónica y deterioro de la función bioquímica (Hong *et al.*, 2017).

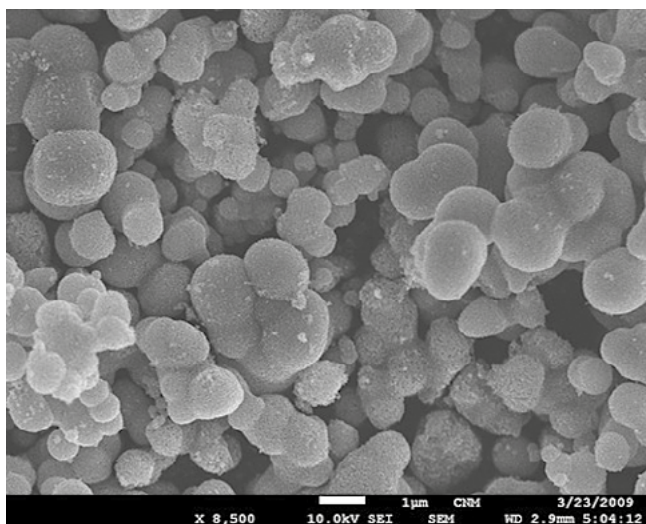


Figura 14. Nanopartículas de TiO₂ recubierta de carbono (SEM: TiO₂ nanoparticles coated with carbon), por Argonne National Laboratory. Licencia CC BY-NC-SA 2.0 (creative commons).

En la administración intratraqueal única o múltiple de nanopartículas de óxido de níquel (NiONPs) en ratas, la toxicidad se detectó a partir de la observación de los cambios de peso pulmonar, el lavado broncoalveolar y los exámenes histopatológicos. El examen citológico del lavado broncoalveolar revela aumentos en el recuento total de células, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, indicando una respuesta inflamatoria, mientras que el aumento de macrófagos indica la fagocitosis de las partículas en todos los grupos tratados con NiO. Además, los resultados bioquímicos del lavado mostraron cambios en los parámetros que indican lesión pulmonar y respuesta inflamatoria (Senoh *et al.*, 2016).

Duan *et al.* (2015) demostraron que las NiONPs no sólo accedían a las células BEAS-2B¹⁵ sino que también aumentaron el nivel de Ni²⁺ celular, lo que proporciona una base para el análisis de los efectos tóxicos de las NiONPs. La activación de la caspasa-3, así como el número cuantitativamente elevado de células apoptóticas,

¹⁵ Células epiteliales bronquiales humanas.

indicaron que las NiONPs provocaban apoptosis en estas células epiteliales de las vías respiratorias. Las razones probables de que el níquel suprime SIRT1¹⁶ y por tanto se produzca el aumento de la apoptosis fueron las siguientes:

1. La inhibición inducida por el níquel de la cadena respiratoria mitocondrial condujo a una disminución de la relación NAD/NADH (He *et al.*, 2013).
2. La disfunción en el metabolismo energético inducida por el níquel, especialmente la disminución de ATP, puede activar la proteína quinasa AMP activada (AMPK), cuya activación puede fosforilar SIRT1 a una forma inactiva (Lee *et al.*, 2012).
3. El níquel es un imitador de hipoxia como se prueba por su capacidad de causar la acumulación de HIF-1 α ¹⁷. El HIF-1 α activado, aumenta la glucólisis y disminuye adicionalmente el nivel de NAD.

En el caso de las nanopartículas de plomo, cuando estas llegan al organismo por inhalación, este elemento compite con el calcio e interrumpe la regulación del metabolismo celular mediante su unión a los receptores, compitiendo con el calcio como segundo mensajero, bloqueando los canales de calcio y la bomba de calcio-sodio y, por tanto, el transporte de este, así como compitiendo con las proteínas de unión. Las nanopartículas de Pb inhiben el crecimiento de los cristales de hidroxapatita¹⁸, al menos una parte, a través de la regulación a la baja de CaSR¹⁹ y RANK²⁰. CaSR es un miembro de la superfamilia del receptor de proteína G, sensor responsable de la modulación de la liberación de parathormona y calcitonina en respuesta a los cambios en los niveles de calcio en la sangre. También es un sensor de espectro bastante amplio de moléculas catiónicas pequeñas capaces de transducir señales en respuesta a cambios en la concentración de metales pesados (Leonas *et al.*, 2016).

8.1.2. Exposición oral

Conceptualmente, para ser absorbida intacta desde el tracto gastrointestinal, una partícula administrada en la dieta (nanoescala o microescala) debe resistir primero la disolución y degradación en el estómago y el intestino, y ser capaz de pasar a la superficie apical de las células epiteliales que recubren la mucosa, siendo esencial que deban disolverse. La disolución se puede definir como un proceso dinámico por el cual una partícula, que tiene alguna solubilidad en el ambiente local, entra en una fase de solución para formar una mezcla homogénea. La tasa de disolución está influenciada por el tamaño, la concentración de solutos, el área superficial, la morfología superficial, la energía superficial, las propiedades de la capa de disolución y la agregación (Borm & Müller-Schulte, 2006).

Se ha notificado que el tratamiento oral con nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) durante 14 días puede perturbar el metabolismo energético y producir

¹⁶ Gen relacionado con la longevidad.

¹⁷ Factor inducible por hipoxia.

¹⁸ Cristal principal de huesos y dientes.

¹⁹ Receptor de detección de calcio.

²⁰ Proteína transmembrana de la superfamilia del receptor de TNF (factor de necrosis tumoral).

deterioro mitocondrial y de la membrana celular en riñón de rata a través de la inducción de nefrotoxicidad (Wang *et al.*, 2017). No sólo se identificó que las ZnONPs podrían producir toxicidad durante el desarrollo prenatal después del tratamiento oral durante un periodo de 15 días, sino que se encontró que la exposición por inhalación a estas NPs durante 3 días conducía a un daño severo en el hígado y el pulmón, y también que podrían elevar la pérdida de lactato deshidrogenasa (LDH) y causar genotoxicidad a los fibroblastos de embriones de ratón primarios. Además, las ZnONPs produjeron un estrés oxidativo intracelular, fuga de la membrana celular y daño al ADN en células epiteliales de pulmón humano, mientras que los efectos a largo plazo de la exposición oral a ZnONPs apenas se han estudiado (Wang *et al.*, 2017).

En el artículo de Lee *et al.* (2016) se hizo una evaluación comparativa de la toxicidad y biodistribución en ratas tras la exposición oral subcrónica a nanopartículas y micropartículas de cobre. Al considerar las nanopartículas de cobre (CuNPs), el estudio de su toxicidad en dosis repetidas *in vivo* demostró que una alta área superficial y una alta solubilidad podrían contribuir a las respuestas toxicológicas al causar sobrecarga de Cu en los lugares de acumulación de las partículas. Las CuNPs afectan a los glóbulos rojos de la sangre, el hígado, el riñón y los órganos inmunes (bazo y timo), así como a los órganos reproductores masculinos accesorios (Lee *et al.*, 2016).

Lee *et al.* (2016) compararon la distribución y toxicidad de diferentes nanopartículas de óxido de vanadio (VONPs) tras la exposición oral. Las nanopartículas de S-V₂O₅ y S-V₂O₃ tienen mayor tendencia a la acumulación en los tejidos en comparación con otras nanopartículas de vanadio (VNPs), y los niveles de acumulación se presentan en mayor cantidad en el siguiente orden: corazón > hígado > riñón > bazo. Como consecuencia de la administración de estas nanopartículas, la homeostasis redox de los tejidos se alteró más claramente en el corazón que en el riñón y el bazo, mostrando una alta distribución. Además, los niveles de Na⁺ y K⁺ en los tejidos se elevaron notablemente en el corazón de ratones expuestos a nanopartículas de S-V₂O₅ y S-V₂O₃ y en el riñón de ratones expuestos a nanopartículas de S-V₂O₃, los niveles de Ca²⁺ también estaban claramente alterados en tejidos de ratones expuestos a todas las VONPs. Estas alteraciones son importantes ya que la homeostasis de los iones (electrolitos), como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, es esencial para los organismos vivos, especialmente con respecto a la fisiología y función celular, y los niveles de estos iones en los tejidos pueden influir a su vez en los niveles de otros iones (Park *et al.*, 2016).

8.1.3. Absorción dérmica

En la revisión realizada en la literatura reciente, no hay información disponible sobre la toxicidad de nanopartículas en cuanto a la absorción dérmica. Se utilizan en todo tipo de productos que están en contacto constante con la piel y tienen ventajas significativas que mejoran todas sus cualidades, llegando a ser la piel una ruta de entrada de NPs importante, tanto a nivel ocupacional como de los consumidores. Sin embargo, aun cuando se ha demostrado que son capaces de atravesar la barrera dérmica, no se conoce con claridad cuál es el mecanismo utilizado para ello y no existe un número significativo de estudios que definan la posible toxicidad que puede

presentar su aplicación en la piel. Existe el riesgo, al igual que en los otros casos, de que una vez hayan penetrado en el organismo puedan presentar diferentes características tóxicas a un nivel celular, con diversas consecuencias para la salud. De ello se deriva la importancia de realizar estudios en profundidad sobre los efectos adversos que pueden presentar debido a la exposición continua que sufre la mayor parte de la población.

Una de las nuevas clases más importantes de nanopartículas multifuncionales son los nanomateriales de carbono (nanotubos de carbono (CNT), de pared simple (SWCNT) y de pared múltiple (MWCNT)), debido a su gran variedad de aplicaciones. En realidad, no hay datos sobre la absorción dérmica de CNT en la literatura pero se ha comprobado, con estudios *in vitro*, que los SWCNT inducen la respuesta de apoptosis / necrosis celular. El tipo de NP va a influir en la posible toxicidad, así, en el informe final del proyecto NANODERM (NANODERM, 2007) se afirmó que no es de esperar la aparición de efectos adversos para la salud por la aplicación tópica de protectores solares que contienen nanopartículas de TiO₂ para una piel sana, sin embargo ciertos estudios han confirmado una interacción entre las células dérmicas humanas y las nanopartículas basadas en carbono (Crosera *et al.*, 2009).

8.1.4. Administración parenteral

En el libro titulado “Consideraciones reglamentarias para nanopesticidas y nanomedicamentos veterinarios”, publicado por el gobierno australiano (A.P.A.V.M, 2014), se presentó un extenso resumen sobre los problemas derivados de la administración parenteral, revelando las diferencias entre una nanopartícula desnuda y una de enlace. La principal preocupación sobre las nanopartículas en la administración parenteral es el tiempo que permanecen en el sistema circulatorio y su biodistribución en el organismo. Cuando la nanopartícula no está unida a una proteína, desaparece del sistema sanguíneo en pocos minutos por el sistema de fagocitos mononucleares. El problema aparece cuando las nanopartículas están recubiertas por una proteína, con una posterior formación de una “biocorona” proteica que es reconocida como “amiga” por las células inmunes, facilitando así su distribución y permanencia en el organismo. Aunque en un principio esta característica puede parecer una ventaja, lo cierto es que, si las NPs presentan cualquier toxicidad, estas pueden estar efectuando su acción durante periodos de tiempo indeterminados.

La unión de las proteínas de la sangre y opsoninas (moléculas que se unen a células, microorganismos o partículas para facilitar su fagocitosis por células fagocíticas) a las partículas de nanoescala depende de las propiedades superficiales de la partícula, así que el que las nanopartículas se unan a las proteínas depende substancialmente de las características superficiales, principalmente la hidrofobicidad y la carga, pero existen otros factores como son los constituyentes del núcleo, el tamaño, la forma y la curvatura, que influyen mayoritariamente en la cantidad de proteína unida pero no con la identidad de la proteína. Por lo tanto, la opsonización diferencial puede explicar las diferencias en las tasas de depuración y el secuestro de macrófagos de las partículas.

8.2. TOXICIDAD DEPENDIENTE DEL TIPO DE NANOPARTÍCULA

8.2.1. Nanopartículas de oro

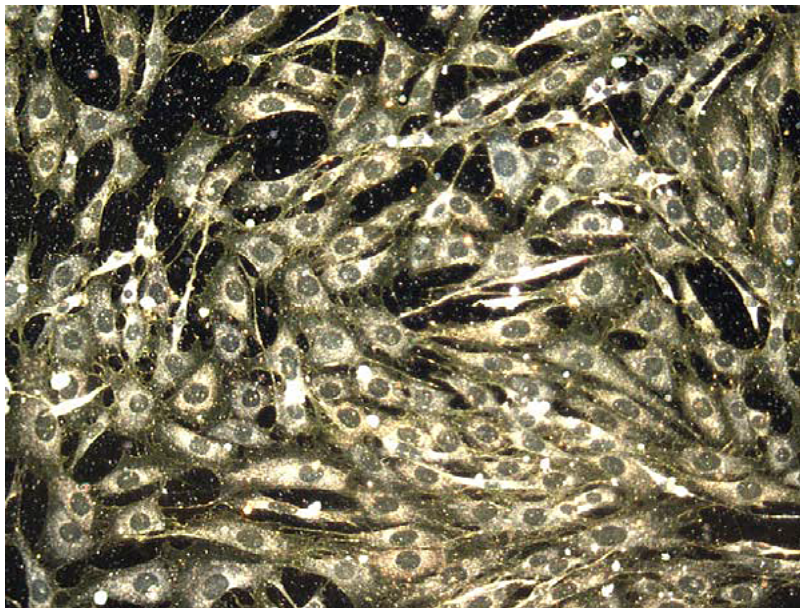


Figura 15. Nanopartículas de oro en el citosol (Gold Nanoparticles in Cell Cytosol), por National Institutes of Health (NIH). Licencia CC PDM 1.0 (creative commons).

En general, la toxicidad de las AuNPs depende de sus dimensiones físicas (como el tamaño y la forma) y la química superficial (como el recubrimiento). La bioseguridad del oro metálico es bien reconocida y se ha utilizado *in vivo* desde los años cincuenta (Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, las nanopartículas de oro funcionalizadas muestran una citotoxicidad obvia (Goodman *et al.*, 2004). Para clarificar estos problemas, se estudió en detalle la citotoxicidad de las nanopartículas de oro en líneas celulares humanas y los resultados mostraron que no son tóxicas hasta 250 mM, mientras que el oro iónico presenta citotoxicidad a 25 mM (Connor *et al.*, 2005). Una de las razones por las que el estudio de su bioseguridad es tan importante es porque estas AuNPs se pueden encontrar en la sangre y en las células de médula ósea hasta 14 días después de su administración oral, lo que indica un largo tiempo de circulación sanguínea. Se ha sugerido que la interacción producida entre las AuNPs y las proteínas esté estrechamente relacionada con la toxicidad que pueden llegar a presentar (Chithrani *et al.*, 2006).

No sólo se ha demostrado que las AuNPs se asocian fuertemente con proteínas esenciales de la sangre (como la albúmina, el fibrinógeno, la γ -globulina, la histona y la insulina), y mientras que el grado de unión entre las nanopartículas y las proteínas aumenta, el grado de cooperatividad de las partículas disminuye con el aumento del

tamaño (Lacerda *et al.*, 2009). También se conoce que estas interacciones, tales como una unión reforzada, pueden inducir un cambio conformacional de las proteínas (Zhang *et al.*, 2010). Además, la superficie de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato probablemente contiene una variedad de proteínas séricas, y muchas de estas proteínas séricas son conocidas por ser absorbidas por las células (Shenoy *et al.*, 2006).

En un estudio de toxicidad (Sung *et al.*, 2011) por inhalación subcrónica enfocado en el uso de nanopartículas de oro en ratas (un aspecto importante de este estudio es que la superficie de las nanopartículas utilizadas no se modificó y no se oxidó) se encontró que no hubo diferencias significativas relacionadas con la dosis para los valores hematológicos y las mediciones bioquímicas sanguíneas. Los aumentos en las concentraciones de oro en el tejido pulmonar y renal del grupo de dosis más alta en comparación con el grupo control fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$). Curiosamente, hubo una diferencia de género en las concentraciones de oro en los riñones, demostrando así una mayor acumulación por parte de las hembras. Aparte de los pulmones y los riñones, no se observó aumento dependiente de la dosis de nanopartículas de oro en sangre, hígado o bulbo olfativo de las ratas tanto en machos como en hembras. A pesar de que, en relación al desarrollo de inflamación pulmonar, no hubo cambios significativos en el número total de células, macrófagos alveolares, PMN, o linfocitos de cualquier animal expuesto, sí hubo un aumento significativo de los linfocitos en hembras a dosis media y alta. En el caso de la albúmina, la LDH y la proteína total en el lavado broncoalveolar no aumentaron significativamente ya sea en machos o hembras. Uno de los parámetros que se vio alterado fue la prueba de función pulmonar, hubo cambios significativos en el volumen tidal y el volumen minuto durante los 90 días de exposición a nanopartículas de oro ($p < 0,01-0,05$).

8.2.2. Nanopartículas de plata

La toxicidad de la plata está estrechamente relacionada con su transformación en medios biológicos y ambientales, incluyendo la oxidación superficial, la liberación de iones de plata, y la interacción con macromoléculas biológicas. Una de las lesiones más conocidas causadas por AgNPs es la argyria²¹, aunque el mecanismo causante de la lesión sigue siendo desconocido. Al igual que en el caso de las nanopartículas de oro la mayor preocupación es que estas nanopartículas pueden interactuar con membranas celulares y causar toxicidad. La adsorción de nanopartículas de plata en la superficie bacteriana, o la interacción con proteínas extracelulares, depende del pH, del potencial y de la concentración de NaCl (McShan *et al.*, 2014), también la concentración de cloruro, así como el contenido de carbono afecta a la aglomeración de la plata y la formación del complejo que afecta a su toxicidad (Kaiser *et al.*, 2017).

Ema *et al.* (2017) estudiaron la toxicidad reproductiva de las nanopartículas de plata en ratones revelando datos importantes como son la identificación de AgNPs en fetos después de la administración oral y en el saco vitelino visceral después de la inyección intravenosa en las hembras de ratón durante la gestación temprana. También

²¹ Enfermedad que cursa con coloración grisácea de piel y órganos.

se identificaron las AgNPs en la descendencia postnatal de las ratas administradas oralmente durante los períodos de gestación y lactancia temprana. Otro de los datos que se pudieron obtener fue que, tras la inyección intravenosa e intraperitoneal materna, los niveles de Ag se incrementaron en embriones de ratón y crías neonatales de rata y se detectaron AgNPs marcados con radio en placenta, leche materna y descendientes pre y postnatal después de la administración oral materna. Las AgNPs afectaron a los porcentajes de células de espermatogonias, espermátidas y espermatozoides. Sin embargo, las AgNPs no afectaron el número de células de Sertoli ni el diámetro de los túbulos seminíferos, pero sí disminuyeron el número de células de Leydig y la calidad del esperma, así como se vieron afectados los niveles séricos de testosterona y hormona luteinizante (LH). Estos hallazgos indican que las AgNPs tienen efectos adversos sobre la espermatogénesis, y que altas dosis de AgNPs afectan los niveles de hormonas sexuales, disminuyen el número de células de Leydig y alteran la morfología y la motilidad de los espermatozoides. Las AgNPs causaron alteraciones histopatológicas, incluyendo inflamación, apoptosis y folículos atrésicos y degenerados en los ovarios (Elnoury *et al.*, 2013).

Los caminos de las nanopartículas que entran al cerebro se dividen generalmente de dos maneras: vía el nervio olfativo o la penetración de la BHE. En el caso de la penetración a través de la BHE la exposición a Ag^+ produce alteraciones en esta mediante la secreción de citoquinas especialmente cuando se administran en co-tratamiento con lipopolisacárido; además, el Ag^+ presenta mayor permeabilidad a la BHE que las AgNPs y sin embargo un menor ratio de traslocación célula-célula. Estas evidencias indican que los efectos específicos de las partículas también deben ser considerados para evaluar la toxicidad de las AgNPs en la BHE (Chen *et al.*, 2016).

Existen pocos estudios de toxicidad de AgNPs en el tracto gastrointestinal que evalúen el impacto potencial en términos de exposición aguda. Sin embargo, el escenario de exposición real es la exposición a largo plazo a dosis bajas de AgNPs, que pueden dar como resultado diferentes consecuencias biológicas en comparación con la exposición aguda a dosis altas. En el estudio sobre las diferencias entre la exposición prolongada y aguda a las AgNPs, se descubrió que la exposición tanto a corto como a largo plazo inducía una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular. La muerte celular marcada solo se observó después de la exposición a corto plazo. La exposición a dosis altas a corto plazo también indujo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño mitocondrial, filtración de la membrana celular, apoptosis e inflamación (nivel de IL-8), mientras que la exposición a dosis bajas a largo plazo indujo únicamente inflamación. Uno de los hechos más importantes en este estudio fue, de manera similar a otros informes, el que los diferentes efectos biológicos a corto y largo plazo de las AgNPs son también dependientes de las líneas celulares (Chen *et al.*, 2016).

8.2.3. Nanopartículas magnéticas

La mayoría de los estudios publicados muestran que las IONPs (nanopartículas magnéticas de óxido de hierro) de menos tamaño son más tóxicas que las grandes; sin embargo, el estudio de Toropova *et al.* (2017) ha demostrado que las IONPs más

pequeñas eran menos tóxicas en comparación con las IONPs que contenían SiO₂ con diámetros mayores. Sus resultados indicaron que la presencia de núcleo o carcasa de sílice aumentaba sustancialmente la toxicidad de las IONPs. Se podría sugerir que el sílice de alguna manera modula la interacción de IONPs con las células diana y/o afecta la distribución/degradación intracelular de nanopartículas aumentando así su efecto perjudicial. Los depósitos intracelulares de IONPs se encontraron predominantemente en células binucleadas, una observación que apoya aún más la conexión entre IONPs y la citoquinesis alterada. En conclusión, las nanopartículas analizadas inducían cambios dosis-dependientes en la morfología celular, la viabilidad, y la tasa de apoptosis.

En el caso de la administración intravenosa de Ang2-CMNP (nanopartícula magnética de quitosano) se observó congestión pulmonar crónica e inflamación pulmonar, y quedó demostrado mediante la tinción azul prusiana la presencia de agregados celulares en el interior de los pulmones (el grupo de control y el grupo expuesto a dosis baja no presentaron tal anormalidad). Los análisis de sangre revelaron que el número total de glóbulos blancos en cada grupo de tratamiento era significativamente mayor en comparación con el grupo control. Por lo tanto, se puede sugerir que el órgano diana para la toxicidad inducida por Ang2-CMNP son predominantemente los pulmones, siendo consecuencia de la acción repetida de partículas a los pulmones la inducción de inflamación pulmonar crónica y fibrosis leve. Se puede presumir que la razón del daño pulmonar inducido por Ang2-CMNP es que cuando un gran número de micropartículas entra en la circulación de los ratones, primero llegarán a los pulmones y la agregación de las partículas bloqueará entonces los vasos pulmonares, lo que conducirá a la congestión pulmonar aguda observada (Shan *et al.*, 2017).

8.2.4. Nanopartículas metálicas

En cuanto a las nanopartículas metálicas se ha podido observar toxicidad testicular, en concreto en las células de Sertoli (SCs), alterando su viabilidad, y dependiendo esta de la concentración de TiO₂NPs a la que se vean expuestas las células y el tiempo de exposición. Como resultado, al aumentar ambos factores, la viabilidad celular disminuye significativamente. También se ha demostrado que las TiO₂NPs no sólo entran en el citoplasma, sino también en los núcleos celulares de las SCs de rata en cultivos primarios. Uno de los problemas derivados de las TiO₂NPs es la inhibición significativa en las SCs de los niveles intracelulares de Ca⁺² tanto de ATPasa (activada por Ca⁺²/Mg⁺²)²² como de la ATPasa²³ transportadora de Ca⁺². Además, las SCs en respuesta a la administración de TiO₂NPs dan como resultado respuestas inflamatorias incrementadas e inmunidad comprometida en los testículos que causan una reducción en la espermatogénesis en seres humanos y animales (Ye *et al.*, 2017).

Recientemente, un estudio *in vitro* encontró que las TiO₂NPs indujeron cambios apoptóticos tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplásmico, incluyendo una elevación en la generación de especies reactivas de oxígeno y reducción en las

²² Enzima activada por Ca⁺² y Mg⁺² cuya función es la hidrólisis de ATP.

²³ Enzima cuya función es el transporte activo de calcio.

actividades de superóxido dismutasa²⁴, catalasa y glutatión peroxidasa. Por otra parte, se observó que se producía una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial y liberación de citocromo C en el citosol, así como un aumento tanto de Bax²⁵, de la caspasa-3 (proteína regulada por la glucosa) y de la proteína homóloga C/EBP²⁶, al igual que de la expresión de la proteína caspasa-12 y la desregulación de las proteínas en las SCs de ratón en cultivo primario (Hong *et al.*, 2016).

Las nanopartículas de óxido de níquel (NiONPs) disminuyeron la actividad metabólica celular en las células SH-SY5Y (línea celular que simula el sistema nervioso) con disfunciones mitocondriales y lisosómicas. Las NiONPs inducen daños significativos en el ADN, dependiendo de la concentración, e inducen daños oxidativos con un aumento significativo en los niveles de malondialdehído²⁷. En general, las NiONPs generan estrés oxidativo de forma significativa en el intervalo de concentración de 50-150 mg/ml teniendo como consecuencia un aumento en el porcentaje de células apoptóticas de una manera directamente proporcional a la dosis (Abudayyak *et al.*, 2017).

Horie *et al.* (2016) estudiaron el estrés oxidativo pulmonar causado por instilación intratraqueal e inhalación de NiONPs. En ese estudio, ambas formas de administración indujeron estrés oxidativo pulmonar; sin embargo, el estado de estrés oxidativo pulmonar en la fase inicial fue diferente entre ambas, incluso cuando la cantidad de NiO en el pulmón era similar. Como diferencia entre ambas formas de administración, la instilación intratraqueal causó un mayor estrés oxidativo pulmonar, mientras que, por el contrario, la inhalación provocó un estrés oxidativo más suave y continuo, que condujo a la inducción del sistema antioxidante.

²⁴ Enzima antioxidante.

²⁵ Proteína que interviene en la apoptosis mediante la inducción de la liberación de citocromo C.

²⁶ Factor regulador de la inflamación.

²⁷ Subproducto derivado del metabolismo de los lípidos.

CAPÍTULO 9

LEGISLACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las propiedades que poseen los nanomateriales pueden dar lugar a nuevas formas de riesgo, que pueden ser desconocidas e incognoscibles. Desconocido porque hasta ahora apenas se ha llevado a cabo una evaluación de riesgos (menos del 2% del dinero invertido en investigación relacionada con la nanotecnología se dedica al análisis de riesgos); e incognoscible, porque el conocimiento científico sobre la evaluación de sustancias químicas no ha seguido el ritmo del conocimiento científico en nanotecnología. Actualmente no podemos evaluar todas las propiedades inherentes de todos los nanomateriales (Vaughan, 2012), debido a las limitaciones existentes en las técnicas analíticas.

Esa problemática implica la necesidad imperiosa de regular el uso de nanomateriales y nanotecnología, y sin embargo, no es una tarea fácil por muchas razones. Hasta la fecha, las iniciativas regulatorias para controlar el uso de la nanotecnología han sido limitadas, con grandes lagunas en los marcos regulatorios actuales que hacen que la nanotecnología no esté cubierta en su totalidad. Esto se debe en parte al hecho de que existe un concepto erróneo de que los nanomateriales son equivalentes al mismo material en su tamaño natural, pero también a los grandes intereses que subyacen en esta área, ya que quienes controlan y regulan el mercado de la tecnología tienen un potencial económico inimaginable y, obviamente, cuanto menos regulación hay en ese mercado, mayor es la libertad de uso y comercialización de este tipo de productos.

La regulación de la nanotecnología es difícil, por lo que es necesario encontrar un equilibrio entre sus beneficios y sus riesgos potenciales. El progreso científico, técnico y social depende de esto en muchos aspectos, pero nunca se debe abandonar el control de la seguridad en el uso previsto y la protección del medio ambiente. Actualmente se están realizando muchos esfuerzos para minimizar los riesgos asociados con la síntesis y el uso de nanomateriales y para aprovechar los numerosos beneficios de la nanotecnología. Las organizaciones e instituciones están prestando una atención preferente a este tema, ya que entienden que existen numerosos productos basados en nanopartículas que no llegan a la comercialización debido a la reticencia de los consumidores a su uso, o la falta de control adecuado, o a la legislación vigente (CarbonInspired2.0, 2012). En este sentido, en las últimas décadas, existen numerosos proyectos (GUIDEnano, MARINA, NanoMILE, NANoREG, NanoREG II, GRACIOUS, BIORIMA...) trabajando en diferentes aproximaciones basadas en las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales, como la agrupación o Read-across, para evaluar el peligro de las mismas tanto en la salud humana como ambiental.

Uno de los foros más importantes para el desarrollo de estándares en esta área es la ISO, cuyo Comité Técnico de Nanotecnología está compuesto por 32 países que colaboran en cuatro grupos de trabajo: Terminología y nomenclatura; Medición y caracterización; Aspectos de salud, seguridad y medio ambiente; y Estándares de especificación de materiales para ciertos nanomateriales. Entre sus programas estrella se encuentra el llamado Proyecto Versalles para Estándares y Materiales Avanzados (VAMAS, por sus siglas en inglés), creado en 1982 para acelerar el comercio de productos de “alta tecnología” mediante el desarrollo de bases técnicas para códigos de prácticas y especificaciones para materiales avanzados (<http://www.vamas.org/>). Canadá, Francia, Alemania, Italia, Japón, el Reino Unido y los Estados Unidos se unieron al proyecto en 2008, uniéndose a Corea del Sur, Australia, Brasil, Taiwán, India, México y Sudáfrica (ETCgroup).

La legislación aplicable a las nanopartículas varía según el país, pero en este trabajo nos centraremos en tratar la legislación a nivel europeo y su transposición a nuestro país, ya que esa preocupación nos es más cercana.

9.1. LEGISLACIÓN EN LA UNIÓN EUROPEA

En el seno de la UE, la posición respecto del uso y a la regulación de las nanotecnologías no ha sido pacífica, como veremos más adelante. Para la Comisión Europea (CE) ha habido suficiente legislación sobre el tema, una afirmación que no fue compartida por todos los Estados Miembros, los sindicatos, la sociedad civil, las instituciones públicas de ciencia y los comités científicos que han exigido continuamente la adopción de medidas.

Un punto de inflexión en este aspecto fue hecho por Suecia cuando utilizó su Presidencia del Consejo de la UE en 2009 para tratar de regular más severamente la nanotecnología, proponiendo un plan de cinco puntos para “salvar la falta de conocimiento en nanoseguridad; actualizar los métodos de prueba; promover la nanotecnología sostenible; buscar la implementación de sistemas obligatorios de presentación de informes; y fortalecer la cooperación internacional” (Comisión Europea, 2009).

En esa misma dirección siguió Bélgica, que en 2010 presentó cuatro propuestas (ETCgroup):

- Definir la obligación de informar al consumidor sobre la presencia de nanomateriales en los productos de consumo.
- Identificar la vía reguladora más apropiada dentro del contexto de la UE para la evaluación y la gestión de riesgos.
- Alentar a los Estados Miembros a que asuman su responsabilidad y formulen estrategias nacionales integradas y medidas concretas a favor de la gestión de riesgos.
- Informar, monitorizar y, al mismo tiempo, regular la propiedad intelectual de los nanoproductos.

En abril de 2009, con una abrumadora mayoría, los miembros del Parlamento Europeo criticaron el estudio de la Comisión sobre los aspectos regulatorios de la nanotecnología, considerando que la legislación actual es insuficiente para abordar los

riesgos de la nanotecnología al tiempo que exige la notificación obligatoria de todos los nanomateriales, especialmente los informes obligatorios de seguridad química, e insistió en que los nanomateriales que presentan un riesgo para los trabajadores o los consumidores no deberían recibir aprobación comercial. Por último, el Parlamento notificó a la Comisión su rechazo a los plazos propuestos por ella para la revisión normativa y exigió un registro oficial de los nanoproductos (con evaluaciones de seguridad) y el etiquetado de los nanoproductos para el consumo (ETCgroup).

En vista de esta situación, la Comisión reconoció las deficiencias de la legislación de la UE, su actuación en la promoción de medidas para minimizar la exposición de las personas a los trabajadores, los consumidores y el medio ambiente a partículas nanométricas y su falta de apoyo de investigación a dicha exposición.

Un ejemplo del retraso en la redacción de legislación específica sería que hasta 2011, la UE no había publicado una recomendación específica (Recomendación 2011/696/UE) sobre la definición de nanomaterial, que debería utilizarse en las diversas reglamentaciones europeas.

No existen actualmente normativas europeas específicas sobre el control y regulación de los nanomateriales/nanopartículas, sino que sobre ellos se aplican las normativas generales sobre productos químicos (Reglamentos 1907/2006, 1272/2008 y 649/2012).

Uno de los pasos más importantes en la regulación de esta materia por parte de la UE se ha llevado a cabo principalmente a través del llamado Reglamento REACH (Reglamento 1907/2006) que constituye el marco regulatorio de las sustancias y preparados químicos, incluyendo los nanomateriales, en la Unión Europea. Se trata de un reglamento adoptado para mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los riesgos planteados por los productos químicos, al tiempo que mejora la competitividad de la industria química de la UE. También fomenta métodos alternativos para la evaluación de peligros de sustancias con el fin de reducir el número de ensayos en animales y se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA, <https://echa.europa.eu/es/home>).

En principio, el objetivo de este sistema de registro es garantizar que la carga del ensayo sobre la seguridad de los nanoproductos recaiga en sus fabricantes y procesadores porque, para cumplir con la normativa, las empresas deben identificar y gestionar los riesgos relacionados con las sustancias que se fabrican y comercializan en la UE. Las empresas deben demostrar cómo se puede usar la sustancia de forma segura y deben informar sobre las medidas de gestión de riesgos a los usuarios.

Si no es posible gestionar el riesgo, las autoridades pueden restringir el uso de esas sustancias aplicando, según el caso, diversas limitaciones. A la larga, las sustancias más peligrosas deberían reemplazarse por otras menos dañinas. Con este fin, REACH establece procedimientos para la recopilación y evaluación de información sobre las propiedades y los peligros de las sustancias. Además, las autoridades pueden prohibir sustancias peligrosas si la gestión del riesgo no es posible. También pueden decidir restringir el uso o hacerlo depender de una autorización previa.

Para mejorar el sistema, se apoyaron en la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA), creada en 2006, cuya tarea principal es garantizar el uso

seguro de sustancias químicas y garantizar la aplicación de la legislación de la UE en este ámbito, beneficiosa para la salud humana, el medio ambiente, la competitividad, y la innovación en Europa. Su forma de trabajar es examinar los registros de los productos químicos que reciben de la industria y analizarlos para determinar si cumplen con las regulaciones. También colabora con los gobiernos nacionales de la UE, centrándose en las sustancias más peligrosas y señalando donde se necesita un mayor nivel de gestión del riesgo para proteger a las personas y el medio ambiente. En ciertos campos, la agencia toma sus propias decisiones; en otros, emite opiniones y ofrece consejos para ayudar a la CE en la toma de decisiones (Unión Europea, 2017).

Con respecto a las reglamentaciones específicas actuales relacionadas con la seguridad de los productos químicos a nivel de la UE, además del Reglamento REACH, destacamos lo siguiente.

9.1.1. Reglamento (CE) N.º 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP, Reglamento 1272/2008)

Se ha venido promulgando legislación sobre este tema desde 1967, cuando se reconoció que las disposiciones sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias químicas en el mercado, especialmente los desechos de productos químicos industriales deberían armonizarse dentro de la Comunidad para eliminar las barreras. Desde entonces, se han adoptado varios instrumentos legislativos comunitarios para lograr y mantener un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente en el contexto del mercado interior (MSSI, 2017).

Su objetivo es garantizar una comunicación clara de los peligros de los productos químicos a los trabajadores y consumidores de la UE mediante la clasificación y etiquetado de productos químicos utilizando un método de clasificación y etiquetado de productos químicos basado en el Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas. El sistema es que las empresas deben determinar los riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente de estas sustancias y mezclas antes de la comercialización de sus productos químicos y deben clasificarlos de acuerdo con los peligros identificados. Los productos químicos peligrosos también deben etiquetarse de acuerdo con un sistema armonizado, de modo que los trabajadores y los consumidores tengan información sobre sus efectos antes de manipularlos.

Los peligros de los productos químicos se indican mediante indicaciones estandarizadas y pictogramas en las etiquetas y fichas de datos de seguridad. Por consiguiente, cuando un proveedor identifica una sustancia con “toxicidad aguda de categoría 1 (oral)”, la etiqueta incluirá la indicación “Peligro en caso de ingestión”, la palabra “Peligro” y un pictograma que contenga una calavera y dos tibias entrelazadas.

9.1.2. Reglamento (UE) N.º 649/2012 del consentimiento fundamentado previo (PIC, Reglamento 649/2012)

Es una respuesta al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimen-

tación (FAO) a la creciente preocupación por la producción, comercio y uso creciente de productos químicos.

Esta norma regula la importación y exportación de determinadas sustancias químicas e impone obligaciones a las empresas que desean exportar a terceros países y fue aprobada para aplicar en la UE las disposiciones del Convenio de Rotterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a determinados plaguicidas y productos químicos peligrosos, sujeto al comercio internacional.

El objetivo del reglamento es promover la responsabilidad compartida y los esfuerzos conjuntos en el movimiento internacional de productos químicos peligrosos y proteger la salud humana y el medio ambiente brindando a los países en desarrollo información sobre el almacenamiento, transporte, uso y eliminación de productos químicos peligrosos en condiciones de seguridad. Se aplica a los productos químicos prohibidos o rigurosamente restringidos enumerados en el Anexo I que contienen productos químicos industriales, plaguicidas y biocidas. La exportación de estos productos químicos está sujeta a dos tipos de requisitos: notificación de exportación y consentimiento expreso. El Reglamento PIC entró en vigor el 1 de marzo de 2014, cuando la ECHA asumió la responsabilidad del trabajo administrativo y técnico relacionado con el nuevo Reglamento.

El consentimiento expreso es válido para las exportaciones realizadas durante los siguientes tres años, a menos que se estipule lo contrario en los términos del consentimiento expreso en sí. Durante estos tres años, cualquier empresa de la UE podrá exportar el mismo producto químico al país que haya dado su consentimiento explícito (siempre que los términos del consentimiento lo permitan), pero aún deberá cumplir con los requisitos de notificación y presentación de informes anuales. La ECHA mantiene una base de datos actualizada de todas las notificaciones y respuestas de consentimiento explícito (ECHA, 2017).

9.2. NORMATIVAS DE NANOTECNOLOGÍA EN ESPAÑA

En España las Autoridades Competentes para la aplicación de la legislación química en el ámbito de la Administración General del Estado son el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad en materia de salud humana y el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente con respecto a los aspectos ambientales (MSSI, 2017).

La legislación en nuestro país es básicamente la que existe en Europa, ya sea mediante la aplicación directa de los Reglamentos y Decisiones que se aprueban, dada su vinculación inmediata, o mediante la incorporación en el Derecho español de las Directivas comunitarias.

Un ejemplo de esto es la aplicación directa de los Reglamentos que rigen REACH y la transposición de Directivas en Reales Decretos que adaptan reglamentaciones tales como notificaciones de nuevas sustancias, envases, etc. a los estándares REACH (CarbonInspired, 2012).

9.3. REGULACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA POR SECTORES

Dado que son muchas las áreas en las que las nanopartículas y la nanotecnología se pueden utilizar para la mejora y la eficacia de diferentes productos manufacturados, en la presente revisión nos centraremos específicamente en los sectores de alimentación, cosméticos y medicina, que son aquellos donde quizás exista una mayor preocupación sobre su uso y comercialización, y cuya regulación examinamos detalladamente a continuación.

Alimentación

Desde 2006, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha seguido la evolución de la nanotecnología dentro de su competencia: asesoramiento científico independiente y apoyo técnico a los gestores de riesgos, incluyendo revisiones del estado actual del conocimiento y los últimos avances en nanotecnología en alimentos y piensos. Además, desde 2010, la EFSA, junto con los Estados miembros, han establecido una red de evaluación de riesgos para la nanotecnología en alimentos y piensos (Fúnez *et al.*, 2016).

En lo que respecta a los aditivos para alimentos y piensos y los materiales en contacto con los alimentos, han sido regulados por la Unión Europea en varios reglamentos y se mencionan específicamente en las siguientes normas:

- Reglamento (CE) N.º 450/2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos (Reglamento 450/2009).
- Reglamento (UE) N.º 10/2011 sobre materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con alimentos (Reglamento 10/2011), y sus diversas modificaciones.
- Reglamento (UE) N.º 1169/2011 sobre información alimentaria facilitada al consumidor y modificación de diversas normas comunitarias (Reglamento 1169/2011), y sus modificaciones.
- Reglamento (UE) N.º 2015/2283 sobre nuevos alimentos (Reglamento 2015/2283).

Cosmética

Que Europa progrese lentamente en la regulación de los ingredientes nanométricos de los cosméticos se debe, en gran medida y a nivel institucional, a la insistencia del Parlamento Europeo. Las tácticas dilatorias por parte de la industria, cuando se le solicitó brindar información, han contribuido a la determinación de los parlamentarios, dando lugar a las demandas de etiquetado y un registro público que debería estar operativo desde 2014. Por lo tanto, en 2009 se aprobó el Reglamento (CE) N.º 1223/2009 (Reglamento 1223/2009), que exige un control específico de los productos que pueden contener materiales insolubles o biopersistentes (nanomateriales), que se utilizan en protectores solares o productos para el cabello.

Sin embargo, a pesar de ser un avance, también es cierto que aún no es suficiente, ya que, si bien requiere que cualquier cosmético que contenga nanomateriales deba indicarlo en la etiqueta, esta obligación es limitada y a menudo ineficaz porque bastará

con poner “(nano)” al lado del ingrediente correspondiente en la lista de ingredientes, sin más explicaciones.

Sanidad

La nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología a la ciencia de la salud, que se dedica al estudio, tratamiento y curación de enfermedades a través de instrumentos, estructuras, dispositivos o fármacos de dimensiones nanométricas que permitirán avances muy significativos en todas las áreas y especialmente en el nanodiagnóstico, nanoterapia y medicina regenerativa.

Aquí, como en otros campos, este uso de la tecnología en medicina y farmacia no está exento de peligro. La especialista europea en nanotecnología Ineke Malsch ha destacado la necesidad de una regulación legal sobre su uso, con el desarrollo de leyes globales para esta tecnología, que comenzó a probarse en cosméticos sin haber medido los riesgos para la salud. Según ella, “podemos desarrollar mejores medicamentos, comenzar a combatir las grandes enfermedades de nuestro tiempo como el cáncer y la diabetes, pero igualmente podemos hacer mucho daño por el deseo de satisfacer ciertas ideas, como con el uso de la nanotecnología cosmética. En ese caso, es necesario ver cómo avanzar, antes de desarrollar productos, en mecanismos de evaluación a nivel de toxicidad, por ejemplo” (Unimedios, 2011).

En la UE, la regulación de la industria de medicamentos y dispositivos médicos se basa en las directivas y reglamentos comunitarios. Para la aprobación de medicamentos hay una agencia reguladora a nivel europeo, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), que lleva a cabo la monitorización y control de estos productos (González *et al.*, 2006).

Las directivas y normativas comunitarias más importantes sobre medicamentos y dispositivos médicos son:

- Directiva 2001/83/CE sobre el código comunitario sobre medicamentos para uso humano (Directiva 2001/83) y sus modificaciones. Ha sido completada por varios Reglamentos y transpuesta parcialmente en España por el Real Decreto 686/2013.
- Reglamento (CE) N.º 726/2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario y se crea una Agencia Europea de Medicamentos (Reglamento 726/2004) y sus diversas modificaciones.
- Reglamento (UE) N.º 2017/745 sobre dispositivos médicos (Reglamento 2017/745).
- Reglamento (UE) N.º 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (Reglamento 2017/746).

El sistema legal que se ha configurado en la UE requiere que, para introducir un nuevo producto en el mercado, no solo el recurso debe ser aprobado por las agencias reguladoras de salud, sino que el nuevo producto debe estar sujeto a regulación durante todo su ciclo de vida, que incluye la etapa de producción, desarrollo clínico, seguridad del paciente, eliminación de productos, y seguridad ambiental.

En España, el control y aprobación de los medicamentos se realiza a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Por otro lado, el Instituto de Salud Carlos III, a través de su Agencia para la Evaluación de Tecnologías Sanitarias en coordinación con la Dirección General de Cohesión del Sistema Nacional de Salud y Alta Inspección, decide sobre la introducción sistematizada de nuevas tecnologías en la práctica clínica del Sistema Nacional de Salud. El referente legal inmediato es el Real Decreto 63/1995, de 20 de enero, sobre la prestación sanitaria del Sistema Nacional de Salud, que establece la necesidad de evaluar la seguridad y eficacia clínica. Para el estudio de los aspectos regulatorios y de toxicidad relacionados con la Nanomedicina, la Plataforma Española de Nanomedicina (<http://nanomedspain.net/>) ha creado un grupo específico de trabajo. Además, la seguridad es tratada por cada uno de los grupos de trabajo de la plataforma (González *et al.*, 2006).

En términos de legislación específica, España ha transpuesto las normativas comunitarias a través de diferentes reales decretos y leyes, siendo especialmente importantes los siguientes estándares:

- Real Decreto Legislativo 1/2015 por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios (Real Decreto Legislativo 1/2015).
- Ley 10/2013 por la que se incorporan al ordenamiento jurídico español las Directivas 2010/84/UE sobre farmacovigilancia y 2011/62/UE sobre prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal, y se modifica la Ley 29/2006 de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (Ley 10/2013).
- Real Decreto 1246/2008 que regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de medicamentos veterinarios fabricados industrialmente (Real Decreto 1246/2008).
- Real Decreto 1345/2007 por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente (Real Decreto 1345/2007).

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

- Abudayyak, M.; Guzel, E. y Özhan, G.: "Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells". *Neurochemistry International*, 2017, 108:7-14.
- Akbari, B.; Tavandashti, M.P. y Zandrahimi, M.: "Particle size characterization of nanoparticles: a practical approach". *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, 2011, 8(2):48-56.
- Allahverdiyev, A.M.; Abamor, E.S.; Bagirova, M.; Baydar, S.Y.; Ates, S.C.; Kaya, F.; Kaya, C. y Rafailovich, M.: "Investigation of antileishmanial activities of $\text{Tio}_2@ \text{Ag}$ nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro". *Experimental Parasitology*, 2013, 135(1):55-63.
- Ashton, J.R.; West, J.L. y Badea, C.T.: "In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents". *Frontiers in Pharmacology*, 2015, 6:256.
- Authority, A.P.A.V.M.: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority: Regulatory considerations for nanopesticides and veterinary nanomedicines: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2014. ISBN: 978-1-922188-77-9.
- Babu, A.; Templeton, A.K.; Munshi, A. y Ramesh, R.: "Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer". *American Association of Pharmaceutical Science Technology*, 2014, 15(3):709-721.
- Baer, D.R.; Engelhard, M.H.; Johnson, G.E.; Laskin, J.; Lai, J.; Mueller, K.; Munusamy, P.; Thevuthasan, S.; Wang, H. y Washton, N.: "Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: important needs and challenging opportunities". *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 2013, 31(5):050820.
- Battle, X.; Pérez, N.; Guardia, P.; Iglesias, O.; Labarta, A.; Bartolomé, F.; García, L.M.; Bartolomé, J.; Roca, A.G. y Morales, M.: "Magnetic nanoparticles with bulklike properties". *Journal of Applied Physics*, 2011, 109(7):07B524.
- Bollo, E.: "Nanotechnologies applied to veterinary diagnostics". *Veterinary Research Communications*, 2007, 31(1):145-147.
- Boote, E.; Fent, G.; Kattumuri, V.; Casteel, S.; Katti, K.; Chanda, N.; Kannan, R.; Katti, K. y Churchill, R.: "Gold nanoparticle contrast in a phantom and juvenile swine: models for molecular imaging of human organs using x-ray computed tomography". *Academic Radiology*, 2010, 17(4):410-417.
- Borm, P.J. y Müller-Schulte, D.: "Nanoparticles in drug delivery and environmental exposure: same size, same risks?". *Nanomedicine*, 2006, 1(2):235-249.
- Bulte, J.W. y Modo, M.: "Nanoparticles in biomedical imaging: emerging technologies and applications (Vol. 3)". *Springer Science & Business Media*, 2003, 102(1):63-90.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K.: "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity". *Biointerphases*, 2007, 2(4), MR17-MR71.
- CarbonInspired.: El desarrollo de normativa para la gestión del uso de nanomateriales está ya en marcha. Consulta 14 de abril de 2017, <http://carboninspired2.com/blog/?p=490>.

- CarbonInspired2.0: Regulación de la nanotecnología. Consulta 20 de abril de 2017, <http://carboninspired2.com/blog/?p=451>.
- Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; Braydich-Stolle, L.; Hess, K. L.; Jones, R.L. y Schlager, J.J.: "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species". *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(43):13608-13619.
- Chen, I.C.; Hsiao, I.L.; Lin, H.C.; Wu, C.H.; Chuang, C.Y. y Huang, Y.J.: "Influence of silver and titanium dioxide nanoparticles on in vitro blood-brain barrier permeability". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 47:108-118.
- Chen, N.; Song, Z.M.; Tang, H.; Xi, W.S.; Cao, A.; Liu, Y. y Wang, H.: "Toxicological effects of Caco-2 cells following short-term and long-term exposure to Ag nanoparticles". *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6):974.
- Cheng, Y.; Morshed, R.; Auffinger, B.; Tobias, A.L. y Lesniak, M.S.: "Multifunctional nanoparticles for brain tumor diagnosis and therapy". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 0:42-57.
- Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; y Chan, W.C.: "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells". *Nano Letters*, 2006, 6(4):662-668.
- Cho, E.J., Holback, H., Liu, K.C., Abouelmagd, S.A., Park, J. y Yeo, Y.: "Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies". *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10(6):2093-2110.
- Cnossen, R.G., Lee, S. y Sacco, A.: "Carbon deposition over transition metal alloys-I. Generation of <NiCo>, <FeNi>, and <CoFe> phase diagrams". *Carbon*, 1994, 32(6):1143-1150.
- Comisión Europea.: 12 de noviembre de 2009 *Nanotechnologies for Sustainable Development*. Bruselas, Bélgica. 12 de noviembre de 2012. Informe de la Conferencia.
- Conley, S.M. y Naash, M.I.: "Nanoparticles for retinal gene therapy". *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010, 29(5):376-397.
- Connor, E.E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C.J. y Wyatt, M.D.: "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity". *Small*, 2005, 1(3):325-327.
- Cormode, D.P., Naha, P.C. y Fayad, Z.A.: "Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles". *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2014, 9(1):37-52.
- Cowger, T.A.; Tang, W.; Zhen, Z.; Hu, K.; Rink, D.E.; Todd, T.J.; Wang, G.D.; Zhang, W.; Chen, H. y Xie, J.: "Casein-coated Fe(5)C(2) nanoparticles with superior r(2) relaxivity for liver-specific magnetic resonance imaging". *Theranostics*, 2015, 5(11):1225-1232.
- Crosera, M.; Bovenzi, M.; Maina, G.; Adami, G.; Zanette, C.; Florio, C.; y Filon Larese F.: "Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature". *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2009, 82:1043-1055.
- Cruz, A.A. y Molento, M.B.: "Nanotechnology: meeting the future of veterinary parasitology research". *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2015, 35(10):842-843.
- Dai, C.; Wang, B. y Zhao, H.: "Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 41(2-3):117-120.
- De Salamanca, A.E.; Diebold, Y.; Calonge, M.; García-Vazquez, C.; Callejo, S.; Vila, A. y Alonso, M.J.: "Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, 47(4):1416-1425.
- Devulapally, R. y Paulmurugan, R.: "Polymer nanoparticles for drug and small silencing RNA delivery to treat cancers of different phenotypes". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2014, 6(1):40-60.
- Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Publicado en el "DOUE" núm. 311, 28 de noviembre de 2001.

- Directiva 93/42/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1993, relativa a los productos sanitarios. Publicado en el "DOUE" núm. 169, 12 de julio de 1993.
- Duan, W.X.; He, M.D.; Mao, L.; Qian, F.H.; Li, Y.M.; Pi, H.F.; Liu, C.; Chen, C.H.; Lu, Y.H. y Cao, Z.W.: "NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015, 286(2):80-91.
- Durán, N.; Silveira, C.P.; Durán, M. y Martínez, D.S.T.: "Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review". *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13:55.
- ECHA-European Chemical Agency.: "Qué es el PIC". Consulta 20 de marzo de 2017, <https://echa.europa.eu/es/regulations/prior-informed-consent/understanding-pic>.
- Elnoury, M.A.H.; Azmy, O.M.; Elshal, A.O.I.; Mohamed, A.; Ragab, H. y Elsherbini, E.: "Study of the effects of silver nanoparticles exposure on the ovary of rats". *Life Science Journal*, 2013, 10(2).
- Ema, M.; Okuda, H.; Gamo, M. y Honda, K.: "A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals". *Reproductive Toxicology*, 2017, 30(3):343-352.
- Ernsting, M.J.; Murakami, M.; Roy, A. y Li, S.D.: "Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles". *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2013, 172(3):782-794.
- Estelrich, J.; Sánchez-Martín, M.J. y Busquets, M.A.: "Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents". *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10:1727-1741.
- ETCgroup.: "¿Qué pasa con la nanotecnología? Regulación y Geopolítica". Consulta 17 de abril de 2017, www.etcgroup.org/sites/www.etcgroup.org/files/Nanogeopolí%CC%81tica_4webSep2011.pdf.
- European Commission.: "Representation of a silver nanoparticle". *Results of the first international intercomparison study on silver nanoparticles in food simulants*. 2014, <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/intercomparison-study-silver-nanoparticles-food-simulants>.
- Farrell, E.; Wielopolski, P.; Pavljasevic, P.; Van Tiel, S.; Jahr, H.; Verhaar, J.; Weinans, H.; Krestin, G.; O'Brien, F.J. y Van Osch, G.: "Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(4):1076-1081.
- Feng, L. y Mumper, R.J.: "A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery". *Cancer Letters*, 2013, 334(2):157-175.
- Fernández-Cruz, M.L.; Hernández-Moreno, D.; Catalán, J.; Cross, R.K.; Stockmann-Juvala, H.; Cabellos, J.; Lopes, V.R.; Matzke, M.; Ferraz, N.; Izquierdo, J.J.; Navas, J.M.; Park, M.; Svendsen, C.; Janer, G.: "Quality evaluation of human and environmental toxicity studies performed with nanomaterials-the GUIDEnano approach". *Environmental Science: Nano*, 2018, 5(2):381-397.
- Fúnez, A.A.; Duaso, A.I.H. y Gómez, P.M.: "Nanotecnología en la industria alimentaria II: evaluación del riesgo y legislación". *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2016, 10(2):18.
- Geraldes, C.F. y Laurent, S.: "Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging". *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2009, 4(1):1-23.
- González, J.; López, M. y Ruiz, G.: "Informe de vigilancia tecnológica: nanomedicina. fundación para el conocimiento madrid", CEIM, 2016.
- Goodman, C.M.; McCusker, C.D.; Yilmaz, T. y Rotello, V.M.: "Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains". *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15(4):897-900.
- Goyal, R.; Macri, L.K.; Kaplan, H.M. y Kohn, J.: "Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery". *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2016, 240:77-92.

- Hasan, S.: "A review on nanoparticles: their synthesis and types". *Research Journal of Recent Sciences*, 2015, 4:1-3.
- He, M.; Lu, Y.; Xu, S.; Mao, L.; Zhang, L.; Duan, W.; Liu, C.; Pi, H.; Zhang, Y. y Zhong, M.: "MiRNA-210 modulates a nickel-induced cellular energy metabolism shift by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 in Neuro-2a cells". *Cell Death & Disease*, 2014, 5(2):1090.
- He, M.D.; Xu, S.C.; Zhang, X.; Wang, Y.; Xiong, J.C.; Zhang, X.; Lu, Y.H.; Zhang, L.; Yu, Z.P. y Zhou, Z.: "Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changes induced by nickel in mice". *Neurotoxicology*, 2013, 38:9-16.
- Hong, F.; Ji, L.; Zhou, Y. y Wang, L.: "Chronic nasal exposure to nanoparticulate TiO₂ causes pulmonary tumorigenesis in male mice". *Environmental Toxicology*, 2017, 32(5):1651-1657.
- Hong, F.; Zhao, X.; Chen, M.; Zhou, Y.; Ze, Y.; Wang, L.; Wang, Y.; Ge, Y.; Zhang, Qi. y Ye, L.: "TiO₂ nanoparticles-induced apoptosis of primary cultured sertoli cells of mice". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104(1):124-135.
- Horie, M.; Yoshiura, Y.; Izumi, H.; Oyabu, T.; Tomonaga, T.; Okada, T.; Lee, B.W.; Myojo, T.; Kubo, M. y Shimada, M.: "Comparison of the pulmonary oxidative stress caused by intratracheal instillation and inhalation of NiO nanoparticles when equivalent amounts of NiO are retained in the lung". *Antioxidants*, 2016, 5(1):4.
- Horikoshi, S. y Serpone, N.: "Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications" Introduction to nanoparticles". D.: Introduction to nanoparticles. Weinheim: Wiley Verlag Chemie, 2013, 1-24.
- Hou, X.; Yang, C.; Zhang, L.; Hu, T.; Sun, D.; Cao, H.; Yang, F.; Guo, G.; Gong, C.; Zhang, X.; Tong, A.; Li, R. y Zheng, Y.: "Killing colon cancer cells through PCD pathways by a novel hyaluronic acid-modified shell-core nanoparticle loaded with RIP3 in combination with chloroquine". *Biomaterials*, 2017, 124:195-210.
- Hu, Y.; Wang, Y.; Jiang, J.; Han, B.; Zhang, S.; Li, K.; Ge, S. y Liu, Y.: "Preparation and characterization of novel perfluorooctyl bromide nanoparticle as ultrasound contrast agent via layer-by-layer self-assembly for folate-receptor-mediated tumor imaging". *BioMed Research International*, 2016, 6381464.
- Huang, J.; Zhong, X.; Wang, L.; Yang, L. y Mao, H.: "Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles". *Theranostics*, 2012, 2(1):86-102.
- Interpresas. Nuevo Reglamento europeo sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas: Reglamento (CE) N.º 1272/2008. Consulta 20 de marzo de 2017, Interpresas.net.
- Issa, B.; Obaidat, I.M.; Albiss, B.A. y Haik, Y.: "Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications". *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11):21266-21305.
- Jain, P.K.; Huang, X.; El-Sayed, I.H. y El-Sayed, M.A.: "Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine". *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41(12):1578-1586.
- Kaiser, J.P.; Roesslein, M.; Diener, L.; Wichser, A.; Nowack, B. y Wick, P.: "Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media". *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, 15(1):5.
- Kasten, A.; Grüttner, C.; Kühn, J.P.; Bader, R.; Pasold, J. y Frerich, B.: "Comparative in vitro study on magnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking of adipose tissue-derived progenitor cells". *Plos One*, 2014, 9(9):108055.
- Kemp, M.M. y Linhardt, R.J.: "Heparin-based nanoparticles". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010, 2(1):77-87.

- Kempen, P.J.; Greasley, S.; Parker, K.A.; Campbell, J.L.; Chang, H.Y.; Jones, J.R.; Sinclair, R.; Gambhir, S.S. y Jokerst, J.V.: "Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/magnetic resonance imaging of stem cells". *Theranostics*, 2015, 5(6):631-642.
- Klibanov, A.L.; Maruyama, K.; Torchilin, V.P. y Huang, L.: "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes". *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1990, 268(1):235-237.
- Kompella, U.B.; Amrite, A.C.; Ravi, R.P. y Durazo, S.A.: "Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging". *Progress in Retinal and Eye Research*, 2013, 36:172-198.
- Kragh-Hansen, U.; Chuang, V.T.G. y Otagiri, M.: "Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(6):695-704.
- Lacerda, S.H.D.P.; Park, J.J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M.L.; Karim, A. y Douglas, J.F.: "Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins". *American Chemical Society Nano*, 2009, 4(1):365-379.
- Lee, C.W.; Wong, L.L.Y.; Tse, E.Y.T.; Liu, H.F.; Leong, V.Y.L.; Lee, J.M.F.; Hardie, D.G.; Ng, I. y Ching, Y.P.: "AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells". *Cancer Research*, 2012, 72(17):4394-4404.
- Lee, I.C.; Ko, J.W.; Park, S.H.; Shin, N.R.; Shin, I.S.; Moon, C.; Kim, J.H.; Kim, H.C. y Kim, J.C.: "Comparative toxicity and biodistribution assessments in rats following subchronic oral exposure to copper nanoparticles and microparticles". *Particle and Fibre Toxicology*, 2016, 13(1):56-59.
- Leonas, R.; Noor, Z.; Rasyid, H.N.; Madjid, T.H. y Tanjung, F.A.: "Effect of lead nanoparticles inhalation on bone calcium sensing receptor, hydroxyapatite crystal and receptor activator of nuclear factor-kappa B in rats". *Acta Informatica Medica*, 2016, 24(5):343-346.
- Ley 10/2013, de 24 de julio, por la que se incorporan al ordenamiento jurídico español las Directivas 2010/84/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010, sobre farmacovigilancia, y 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, sobre prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal. Publicado en el "BOE" núm. 177, 25 de julio de 2013.
- Liao, Y.I.; Xu, Q.; Zhang, J.; Niu, J.; Yuan, G.; Jiang, Y.A.O.; He, Y. y Wang, X.: "Cellular response of chondrocytes to magnesium alloys for orthopedic applications". *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 36(1):73-82.
- López, T.; Islas, E.O.; Alvarez Lemus, M.A. y González, R.D.: "Nanostructured Pt(NH₃)₄Cl₂/SiO₂ for nanomedicine: catalytic degradation of DNA in cancer cells". *Nano Reviews*, 2011, 29:70-74.
- Lövestam, G.; Rauscher, H.; Roebben, G.; Klüttgen, B.S.; Gibson, N.; Putaud, J.P. y Stamm, H.: "Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes". *Joint Research Centre: Reference Reports*, 2010, 80004-80001.
- Luo, Y.; Wang, C.; Qiao, Y.; Hossain, M.; Ma, L. y Su, M.: "In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012, 23(10):2563-2573.
- Mailu, S.N.; Waryo, T.T.; Ndagili, P.M.; Ngece, F.R.; Baleg, A.A.; Baker, P.G. y Iwuoha, E.I.: "Determination of anthracene on ag-au alloy nanoparticles/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrodes". *Sensors*, 2010, 10(10):9449-9465.
- McLaughlin, M. F., Woodward, J., Boll, R. A., Wall, J. S., Rondinone, A. J., Kennel, S. J., Mirzadeh, S. & Robertson, J. D.: "Gold coated lanthanide phosphate nanoparticles for targeted alpha generator radiotherapy". *PLoS One*, 2013, 8(1), e54531.

- McShan, D.; Ray, P.C. y Yu, H.: "Molecular toxicity mechanism of nanosilver". *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22(1):116-127.
- Mehrmohamamdi, M.; Qu, M.; Ma, L.L.; Romanovicz, D.K.; Johnston, K.P.; Sokolov, K.V. y Emelianov, S.Y.: "Pulsed magneto-motive ultrasound imaging to detect intracellular trafficking of magnetic nanoparticles". *Nanotechnology*, 2011, 22(41):415105-415105.
- Mo, Y.; Gu, A.; Tollerud, D.J. y Zhang, Q.: "Oxidative stress and biomaterials" D: *Nanoparticle toxicity and environmental impact*. London: Academic Press, 2016, 117-143.
- Mora Raimundo, P.: Nanopartículas de sílice mesoporosa para aplicaciones biomédica. *Trabajo Fin de Grado*. UCM. Madrid, España, 2016.
- Mora-Raimundo, P.; Lozano, D.; Manzano, M.; y Vallet-Regí, M.: "Nanoparticles to knockdown osteoporosis-related gene and promote osteogenic marker expression for osteoporosis treatment". *ACS Nano*, 2019, 13(5):5451-5464.
- MSSI-Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.: Legislación, Sustancias químicas. Consulta 20 de marzo de 2017, <https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/prodQuimicos/legislacion.htm>.
- Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Wang, P.; Wang, L.; Basu, S.; Nagy, J. A.; Oyabu, T.; Myojo, T.; Kawai, K. y Soker, S.: "Antiangiogenic properties of gold nanoparticles". *Clinical Cancer Research*, 2005, 11(9):3530-3534.
- NANODERM: Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles. Final Report (Project Number: QLK4-CT-2002-02678), 2007, <http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/>.
- Nasiruddin, M.; Neyaz, M.K. y Das, S.: "Nanotechnology-based approach in tuberculosis treatment". *Tuberculosis Research and Treatment*, 2017, 2017:12.
- Oberdörster, G.; Oberdörster, E. y Oberdörster, J.: "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles". *Environmental Health Perspectives*, 2005, 823-839.
- Pal, S. L.; Jana, U.; Manna, P.; Mohanta, G. y Manavalan, R.: "Nanoparticle: an overview of preparation and characterization". *International Research Journal of Pharmacy*, 2011, 4(4):228-234.
- Pangi, Z.; Beletsi, A. y Evangelatos, K.: "PEG-ylated nanoparticles for biological and pharmaceutical application". *Advanced Drug Delivery Review*, 2003, 24:403-419.
- Park, E.J.; Lee, G.; Yoon, C. y Kim, D.W.: "Comparison of distribution and toxicity following repeated oral dosing of different vanadium oxide nanoparticles in mice". *Environmental Research*, 2016, 150:154-165.
- Prabakaran, M. y Mano, J.: "Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems". *Drug Delivery*, 2004, 12(1):41-57.
- Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; Yahia, L. y Mahmoudi, M.: *Protein-nanoparticle interactions*. Berlin: Springer, 2013.
- Ramaswamy, S.; Greco, J.B.; Uluer, M.C.; Zhang, Z.; Zhang, Z.; Fishbein, K.W. y Spencer, R.G.: "Magnetic resonance imaging of chondrocytes labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles in tissue-engineered cartilage". *Tissue Engineering. Part A*, 2009, 15(12):3899-3910.
- Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. Publicado en el "BOE" núm. 193, 11 de agosto de 2008.
- Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Publicado en el "BOE" núm. 267, 7 de noviembre de 2007.
- Real Decreto 63/1995, de 20 de enero, sobre ordenación de prestaciones sanitarias del Sistema Nacional de Salud. Publicado en el "BOE" núm. 35, 10 de febrero de 1995.

- Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Publicado en el "BOE" núm. 177, 25 de julio de 2015.
- Recomendación 2011/696/UE de la Comisión, de 18 de octubre de 2011, relativa a la definición de nanomaterial. Publicado en el "DOUE" núm. 275, 20 de octubre de 2011.
- Reglamento (CE) N.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos. Publicado en el "DOUE" núm. 342, 22 de diciembre de 2009.
- Reglamento (CE) N.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) N.º 1907/2006. Publicado en el "DOUE" núm. 353, de 31 de diciembre de 2008.
- Reglamento (CE) N.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. Publicado en el "DOUE" núm. 396, 30 de diciembre de 2006.
- Reglamento (CE) N.º 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. Publicado en el "DOUE" núm. 135, 30 de mayo de 2009.
- Reglamento (CE) N.º 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Publicado en el "DOUE" núm. 136, 30 de abril de 2004.
- Reglamento (UE) N.º 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Publicado en el "DOUE" núm. 12, 15 de enero de 2011.
- Reglamento (UE) N.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Publicado en el "DOUE" núm. 304, 22 de noviembre de 2011.
- Reglamento (UE) N.º 2015/2283 de 25 de noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos. Publicado en el "DOUE" núm. 327, 11 de diciembre de 2015.
- Reglamento (UE) N.º 2017/745 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios. Publicado en el "DOUE" núm. 117, 5 de mayo de 2017.
- Reglamento (UE) N.º 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Publicado en el "DOUE" núm. 117, 5 de mayo de 2017.
- Reglamento (UE) N.º 649/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de julio de 2012, relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos. Publicado en el "DOUE" núm. 201, de 27 de julio de 2012.
- Ruiz-Moreno, J.M.; Montero, J.A.; Barile, S. y Zarbin, M.A.: "Photodynamic therapy and high-dose intravitreal triamcinolone to treat exudative age-related macular degeneration: 1 year outcome". *Retina*, 2006, 26(6):602-612.
- Scott, N.: "Nanoscience in veterinary medicine". *Veterinary Research Communications*, 2007, 31(1):139-144.
- Sela, H.; Cohen, H.; Elia, P.; Zach, R.; Karpas, Z. y Zeiri, Y.: "Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB)". *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13:71.

- Senoh, H.; Hirokazu, K.; Suzuki, M.; Ohnishi, M.; Kondo, H.; Takanobu, K.; Umeda, Y. y Fukushima, S.: "Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats". *Journal of Occupational Health*, 2016, 59(2):112-121.
- Shan, X.; Xu, T.; Liu, Z.; Hu, X.; Zhang, Y.D. y Wang, B.: "Safety and toxicology of the intravenous administration of Ang2-siRNA plasmid chitosan magnetic nanoparticles". *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(2):736-742.
- She, W.; Li, N.; Luo, K.; Guo, C.; Wang, G.; Geng, Y. y Gu, Z.: "Dendronized heparin-doxorubicin conjugate based nanoparticle as pH-responsive drug delivery system for cancer therapy". *Biomaterials*, 2013, 34(9):2252-2264.
- Shenoy, D.; Fu, W.; Li, J.; Crasto, C.; Jones, G.; DiMarzio, C.; Sridhar, S. y Amiji, M.: "Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly (ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery". *International Journal of Nanomedicine*, 2006, 1(1):51-57.
- Shi, S.; Chen, F. y Cai, W.: "Biomedical applications of functionalized hollow mesoporous silica nanoparticles: focusing on molecular imaging". *Nanomedicine*, 2013, 8(12):2027-2039.
- Sung, J.H.; Ji, J.H.; Park, J.D.; Song, M.Y.; Song, K.S.; Ryu, H.R.; Yoon, J.U.; Jeon, K.S.; Jeong, J.; Han, B.S.; Chung, Y.H.; Chang, H.K.; Lee, J.H.; Kim, D.W.; Kelman, B.J. y Yu, I.J.: "Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles". *Particle and Fibre Toxicology*, 2011, 8:16.
- Tarn, D.; Ashley, C.E.; Xue, M.; Carnes, E.C.; Zink, J.I. y Brinker, C.J.: "Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: biofunctionality and biocompatibility". *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46(3):792-801.
- Tian, C.; Zhu, L.; Lin, F. y Boyes, S.G.: "Poly (acrylic acid) bridged gadolinium metal-organic framework-gold nanoparticle composites as contrast agents for computed tomography and magnetic resonance bimodal imaging". *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(32):17765-17775.
- Toropova, Y.G.; Golovkin, A.S.; Malashicheva, A.B.; Korolev, D.V.; Gorshkov, A.N.; Gareev, K.G.; Afonin, M.V. y Galagudza, M.M.: "In vitro toxicity of FemOn, FemOn-SiO₂ composite, and SiO₂-FemOn core-shell magnetic nanoparticles". *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12:593-603.
- Toy, R.; Bauer, L.; Hoimes, C.; Ghaghada, K.B. y Karathanasis, E.: "Targeted nanotechnology for cancer imaging". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 0:79-97.
- Unimedios: "Leyes internacionales regularían la nanotecnología". *Agencia de Noticias Unimedios: Ciencia & Tecnología*, 2011, 836.
- Unión Europea. Agencia europea de los productos químicos. Consulta 26 de marzo de 2017, https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/echa_es.
- Unión Europea. Recomendación (UE) 2011/696 de la Comisión, de 18 de octubre de 2011, relativa a la definición de nanomateriales. Diario Oficial de la Unión Europea L 275, 20 de octubre de 2011, pp. 38-40.
- Upadhyay, R.K.: "Drug delivery systems, cns protection, and the blood brain barrier". *BioMed Research International*, 2014, 2014:37.
- Vaughan, S.: Laying down the law on nanotechnology. 2012, <http://www.theguardian.com/law/2012/jun/11/law-nanotechnology-regulation>.
- Waknine-Grinberg, J.H.; Even-Chen, S.; Avichzer, J.; Turjeman, K.; Bentura-Marciano, A.; Haynes, R.K.; Weiss, L.; Allon, N.; Ovadia, H. y Golenser, J.: "Glucocorticosteroids in nano-sterically stabilized liposomes are efficacious for elimination of the acute symptoms of experimental cerebral malaria". *Plos One*, 2013, 8(8):72722.

- Wang, C.; Cheng, K.; Zhou, L.; He, J.; Zheng, X.; Zhang, L.; Zhong, X. y Wang, T.: "Evaluation of long-term toxicity of oral zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in mice". *Biological Trace Element Research*, 2017, 1-7.
- Wang, J.J.; Zeng, Z.W.; Xiao, R.Z.; Xie, T.; Zhou, G.L.; Zhan, X.R. y Wang, S.L.: "Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers". *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6(9):765-774.
- Williams, D.; Amman, M.; Autrup, H.; Bridges, J.; Cassee, F.; Donaldson, K.; Fattal, E.; Janssen, C.; De Jong, W. y Jung, T.: "The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies". *Report for the European Commission Health and Consumer Protection Directorate General by the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*. 2005.
- Xiang, Y.; Bai, Z.; Zhang, S.; Sun, Y.; Wang, S.; Wei, X.; Mo, W.; Long, J.; Liu, Z. y Yang, C.: "Lead adsorption, anticoagulation and in vivo toxicity studies on the new magnetic nanomaterial Fe₃O₄@ SiO₂@ DMSA as a hemoperfusion adsorbent". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017, 13(4):1341-1351.
- Ye, L.; Hong, F.; Ze, X.; Li, L.; Zhou, Y. y Ze, Y.: "Toxic effects of TiO₂ nanoparticles in primary cultured rat sertoli cells are mediated via a dysregulated Ca²⁺/PKC/p38 MAPK/NF-κB cascade". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017, 105(5):1374-1382.
- Zhang, K.; Chen, H.; Guo, X.; Zhang, D.; Zheng, Y.; Zheng, H. y Shi, J.: "Double-scattering/reflection in a single nanoparticle for intensified ultrasound imaging". *Scientific Reports*, 2015, 5:8766.
- Zhang, X.D.; Wu, H.Y.; Wu, D.; Wang, Y.Y.; Chang, J.H.; Zhai, Z.B.; Meng, A.M.; Liu, P.X.; Zhang, L.A. y Fan, F.Y.: "Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes". *International Journal of Nanomedicine*, 2010, 5:771-781.
- Zhang, X.F.; Liu, Z.G.; Shen, W. y Gurunathan, S.: "Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches". *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9):1534.
- Zhang, Y.; Gao, G.; Liu, H.; Fu, H.; Fan, J.; Wang, K.; Chen, Y.; Li, B.; Zhang, C.; Zhi, X.; He, L. y Cui, D.: "Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs". *Theranostics*, 2014, 4(2):154-162.
- Zhong, G.Q. y Zhong, Q.: "Preparation of soft magnetic Fe-Ni-Pb-B alloy nanoparticles by room temperature solid-solid reaction". *The Scientific World Journal*, 2013, 2013:6.
- Zhu, D.; Liu, F.; Ma, L.; Liu, D. y Wang, Z.: "Nanoparticle-based systems for t(1)-weighted magnetic resonance imaging contrast agents". *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(5):10591-10607.

