

---

# Nanotecnología y sistema inmunitario

---

A. González-Fernández, M. Peleteiro-Olmedo, T. Lozano-Fernández,  
R. Simón-Vázquez y B. Díaz-Freitas

Inmunología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Universidad de Vigo, Vigo (Pontevedra).  
Red de Inmunoterapia "IMMUNONET" (SUDOE-Feder)

---

**Resumen:** *En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología está encontrando muchas aplicaciones en diversos campos, como por ejemplo la industria textil, la automoción, la energía, la alimentación, el medio ambiente y también la medicina. Las nanoestructuras pueden ofrecer muchas ventajas en el área de la biomedicina: marcapasos más pequeños y seguros, catéteres con recubrimientos antibacterianos y nuevas estructuras para terapia regenerativa. Asimismo, han contribuido en el diagnóstico in vitro (lab-on a chip, técnicas de multidetección o necesidad de menor cantidad de muestra) y en el diagnóstico in vivo, y en tratamientos en los cuales la nanotecnología puede ofrecer fármacos de liberación controlada, de terapia dirigida y con multifunción (transporte de fármaco, imagen, hipertermia, magnético). Sin embargo, aunque las nanoestructuras en aplicaciones biomédicas pueden mostrar claros beneficios, hay algunos aspectos muy importantes a considerar, como son su toxicidad y su inmunogenicidad. Además, el tamaño nanométrico hace que puedan interactuar mejor con los sistemas biológicos, por lo que resulta necesario un completo estudio de su biocompatibilidad y biodistribución en el organismo. El potencial que tiene la gran variedad de nanoestructuras en el campo biomédico es enorme, y ofrece una gran diversidad de propiedades biológicas y físico-químicas. Sin embargo, puesto que pueden interactuar y afectar a los sistemas biológicos, es necesaria una compleja y extensa caracterización previa, y llevar a cabo estudios de biocompatibilidad e inmunogenicidad.*

**Palabras clave:** Nanotecnología – Inmunogenicidad – Biocompatibilidad – Nanomedicina – Nanoestructuras – Funcionalización con anticuerpos.

---

## Nanotecnología

---

El prefijo "nano" deriva del griego y significa "enano". En ciencia se utiliza como unidad de medida de longitud, para determinar una milmillonésima parte de un metro, y por tanto  $10^{-9}$  m es 1 nm, que es decenas de miles de veces más pequeño que el grosor de un cabello humano.

Los recientes avances de la comunidad científica que permiten observar, controlar y manipular a escala nanométrica, han abierto un nuevo campo de investigación: la nanotecnología. Las posibles aplicaciones de esta nueva ciencia basada en el desarrollo de ma-

teriales nanoestructurados y de nuevas herramientas que actúan a este nivel, ha generado un área con gran potencial y con un enorme impacto social y económico.

Para comprender las posibilidades que ofrece esta nueva tecnología es clave saber que las nanoestructuras son mucho más pequeñas que las células humanas (de unas 10 a 20  $\mu$  de diámetro) y que muchos de sus orgánulos. Las nanopartículas son similares, en tamaño, a las grandes macromoléculas biológicas tales como enzimas y receptores. Por ejemplo, la hemoglobina tiene un diámetro de 5 nm, la bicapa lipídica que rodea a las células es del orden de 6 nm de espesor (McNeil,

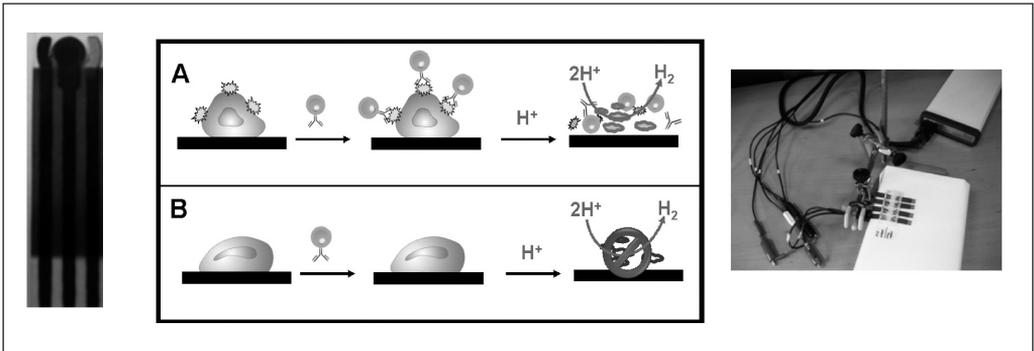


Figura 1. Fundamento de un biosensor para detectar células tumorales con nanopartículas de oro y anticuerpos. Sobre la superficie de un electrodo (imagen izquierda) se depositan células tumorales que expresan un determinado marcador de membrana (A) o células que no lo expresan (B). Posteriormente se realiza una detección electroquímica (De la Escosura-Muñiz et al., 2009). (Técnica patentada.)

2005), y un anticuerpo IgG tiene un tamaño de  $12 \times 15$  nm.

## Nanomedicina

Uno de los sectores más sensibles donde se espera que la nanotecnología tenga un gran potencial es en el campo biomédico, tanto en el diagnóstico in vitro como in vivo, en el desarrollo de nuevos materiales para prótesis, suturas, etc., e incluso en terapéutica. Esta nueva ciencia, denominada Nanomedicina, ofrece oportunidades únicas para el diseño de nuevos instrumentos clínicos y para mejorar los ya existentes, así como para el desarrollo de nuevos biosensores; sobre todo, las nanopartículas se han propuesto para ser utilizadas con fines biomédicos debido a su gran versatilidad como transportadores de fármacos, como adyuvantes en vacunas, para la destrucción de células tumorales mediante hipertermia y como agentes de contraste.

En el campo de la detección, la nanotecnología ofrece unas posibilidades inmensas, bien con el uso de nanopartículas solas o combinadas con anticuerpos. Como ejemplo, nuestro grupo, en colaboración con el del Dr. Arben Merçoçi del Instituto Catalán de Nanoelectrónica (De la Escosura-Muñiz et al.,

2009), ha desarrollado un biosensor capaz de detectar células tumorales sobre la superficie de electrodos de carbono utilizando nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpos (Fig. 1).

Dentro del campo terapéutico, numerosos grupos de investigación están desarrollando nanopartículas con multitud de aplicaciones (Tabla I), como la liberación de fármacos de forma controlada, que destruyan de forma específica células tumorales, que atraviesen la barrera hematoencefálica, que actúen como adyuvantes y permitan el diseño de nuevas vacunas, que posibiliten la utilización de hipertermia o terapia fotodinámica, y un largo etcétera (Koping-Hoggard et al., 2005; Lee et al., 2007; Valdivia Uría et al., 2007). Su tamaño nanométrico les permite atravesar muchas estructuras e interactuar fácilmente con las biomoléculas en la superficie y en el interior celular. Al poder interactuar con estructuras de una célula viva, como receptores, ácidos nucleicos, factores de transcripción y otras proteínas de señalización, podrían usarse para comprender las complejas redes de señalización y los procesos de transporte que regulan el comportamiento celular y los cambios que sufren durante los procesos de enfermedad.

Las nanopartículas, en comparación con las terapias convencionales, pueden ofrecer im-

TABLA I. Resumen de las principales características y posibles aplicaciones de los diferentes tipos de nanopartículas en biomedicina.

Nanoestructuras	Características	Posibles aplicaciones biomédicas
Nanoshells	10-300 nm, formadas por un núcleo de sílice y una capa de un compuesto metálico	Agentes de contraste y liberación de fármacos
De carbono		
Nanotubos	Compuestos alargados de carbono de 1 nm de diámetro, con una o varias capas concéntricas	Agentes de contraste, terapia génica, transporte de fármacos, biosensores y vacunas
Fullerenos	Compuestos constituidos por 60 átomos de carbono formando un espacio cerrado y simétrico con forma de balón de fútbol	Transporte de fármacos, agentes de contraste, antioxidantes y bactericidas
Poliméricas	Formadas por polímeros no biodegradables y biodegradables, de origen natural o sintético, o mezcla de ambos tipos	Liberación de fármacos, vacunas
Dendrimeros	Estructuras globulares generadas por repetición de polímeros sintéticos compuestas por un núcleo y varias capas con grupos terminales activos	Liberación de fármacos
Metálicas		
De oro	Formadas por oro, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Biosensores, agentes de contraste y termoablación
QD	Estructura fluorescente de 2 a 10 nm, constituida por un núcleo de algún elemento de los grupos II-VI y por una capa de ligandos o polímeros anfipáticos	Diagnóstico por la imagen y tratamiento del cáncer
Magnéticas	Compuestas por un núcleo inorgánico de óxido de hierro u otros metales, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Agentes de contraste
Nanoliposomas y nanomicelas	Vesículas esféricas cerradas formadas principalmente por fosfolípidos	Transporte de agentes bioactivos, liberación de fármacos y tratamiento del cáncer

portantes ventajas, como son una disminución en los efectos secundarios de los fármacos tradicionales, una mayor versatilidad en el diseño de las formulaciones debido a que pueden unirse a diversos compuestos tales como fármacos, anticuerpos, péptidos, DNA, hidratos de carbono, etc. (Vicent y Duncan, 2006).

Además, sus propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas pueden emplearse para matar células tumorales mediante tratamientos

de hipertermia utilizando longitudes de onda dentro del rango del infrarrojo cercano (Hirsch et al., 2003). Recientemente se ha aprobado un tratamiento local con nanopartículas ferromagnéticas para pacientes con tumores cerebrales empleando hipertermia combinada con radioterapia (Maier-Hauff et al., 2011).

Mientras que el desarrollo de nuevos nanomateriales no biodegradables está creciendo exponencialmente, aunque con lenta intro-

Tabla II. Agentes terapéuticos basados en nanopartículas aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos.

Composición	Nombre (compañía)	Indicación	Vía
<b>Liposomas</b>			
L. amfotericina B	<i>Abelcet</i> <sup>®</sup> (Enzon)	Infecciones fúngicas	i.v.
L. amfotericina B	<i>AmBisome</i> <sup>®</sup> (Gilead Sciences)	Hongos y protozoos	i.v.
L. citarabina	<i>DepoCyt</i> <sup>®</sup> (SkyePharma)	Meningitis criptocócica	i.t.
L. daunorubicina	<i>DaunoXome</i> <sup>®</sup> (Gilead Sciences)	Sarcoma de Kaposi	i.v.
L. doxorubicina	<i>Myocet</i> <sup>®</sup> (Zeneus)	Cáncer de mama	i.v.
Vacuna liposómica IRIV	<i>Epaxal</i> <sup>®</sup> (Berma Biotech)	Hepatitis A	i.m.
Vacuna liposómica IRIV	<i>Inflexal</i> <sup>®</sup> (Berma Biotech)	Gripe	i.m.
L. morfina	<i>DepoDur</i> <sup>™</sup> (SkyePharma, Endo)	Analgésico poscirugía	e.
L. verteporfina	<i>Visudyne</i> <sup>®</sup> (QLT, Novartis)	Degeneración macular	i.v.
L con PEG doxorubicina	<i>Doxil</i> <sup>®</sup> / <i>Caelyx</i> <sup>®</sup> (Ortho Biotech, Schering-Plough)	Sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y ovárico	i.m.
Micela estradiol	Estrasorb <sup>™</sup> (Novavax)	Menopausia	t.
<b>Polímeros</b>			
Copolímero de L-Glu, L-Ala, L-Lys y L-Tir	<i>Copaxone</i> <sup>®</sup> (TEVA Pharmaceuticals)	Esclerosis múltiple	s.c.
Metoxi-PEG-poli (D,L-lactido) taxol	<i>Genexol-PM</i> <sup>®</sup> (Samyang)	Cáncer de mama	i.v.
PEG-ADA	<i>Adagen</i> <sup>®</sup> (Enzon)	Inmunodeficiencia grave combinada	i.m.
PEG-antiVEGF apramer	<i>Macugen</i> <sup>®</sup> (OSI Pharmaceuticals)	Degeneración macular	i.r.
PEG- $\alpha$ interferón 2a	<i>Pegasy</i> <sup>®</sup> (Nektar, Hoffmann-La Roche)	Hepatitis B y C	s.c.
PEG-GCSF	<i>Neulasta</i> <sup>®</sup> (Amgen)	Neutrocitopenia	s.c.
PEG-HGF	<i>Somavert</i> <sup>®</sup> (Nektar, Pfizer)	Acromegalia	s.c.
PEG-L Asn	<i>Oncaspar</i> <sup>®</sup> (Enzon)	Leucemia linfoblástica aguda	i.v., i.m.
Poli(clorhidrato de alilamina)	<i>Sevelamer</i> <sup>®</sup> (Genzyme)	Enfermedad renal	v.o.
<b>Otros soportes</b>			
Paclitaxel-albúmina	<i>Abraxane</i> <sup>®</sup> (Abraxis, Bioscience, AstraZeneca)	Cáncer de mama	i.v.
Nanocristales de aprepitant	<i>Emend</i> <sup>®</sup> (Elan, Merk)	Antiemético	v.o.
Nanocristales de fenofibrato	<i>Trico</i> <sup>®</sup> (Elan, Abbott)	Antihiperlipidémico	v.o.
Nanocristales de sirolimús	<i>Rapamune</i> <sup>®</sup> (Elan, Wyeth Pharmaceuticals)	Inmunosupresor	v.o.

ADA: adenosina desaminasa; e.: epidural; GCSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; i.m.: intramuscular; i.r.: intravítrea; IRIV: *Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes*; i.t.: intratecal; i.v.: intravenosa; PEG: polietilenglicol; s.c.: subcutánea; t.: tópica; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; v.o.: vía oral.

ducción en clínica, numerosos agentes terapéuticos basados en nanopartículas biodegradables, como son los liposomas, los polímeros u otros compuestos, llevan ya tiempo en el mercado (Tabla II).

**Toxicidad**

En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados se centran en la obtención de nuevas nanopartículas y en su caracterización físico-química, pero es necesario también diseñar y establecer técnicas normalizadas que nos permitan evaluar de una forma fidedigna su posible toxicidad. Por ejemplo, no hay muchos datos sobre sus posibles efectos tóxicos en células humanas, y muchas de las nanoestructuras están destinadas a su uso en humanos por vía intravenosa, por lo que entrarán en contacto con las células del endotelio y de la sangre periférica (hematíes y células leucocitarias) y con otros componentes sanguíneos (plaquetas, proteínas de la cascada de la coagulación, del complemento, etc.); también podrían entrar por vía inhalada, por lo que es crucial conocer su comportamiento sobre células pulmonares, o si lo hacen por otras vías (como por ejemplo vía cutánea, ocular, etc.). Se hace imprescindible realizar estudios de

toxicidad y biocompatibilidad de estas nanopartículas en distintos tipos celulares antes de su uso in vivo (Fig. 2).

Otro de los problemas en la evaluación de la posible toxicidad es la gran diversidad de protocolos utilizados en los trabajos publicados, que dificulta la comparación entre los distintos estudios y la determinación de si la citotoxicidad observada es fisiológicamente relevante (Lewinski et al., 2008). La Comunidad Económica Europea ha puesto en marcha proyectos de investigación y redes con el fin de iniciar la estandarización de métodos y la búsqueda de patrones de nanopartículas. Nuestro grupo se encuentra integrado en un proyecto europeo denominado HINAMOX (*Health Impact of Engineered Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Response, Bioimaging and Distribution at Cellular and Body Level*) para estudiar el efecto de nanopartículas metálicas y óxido-metálicas en la salud humana. En este sentido, es importante destacar que las características físico-químicas de las nanopartículas, el tipo celular utilizado y el método para evaluar la toxicidad son factores clave a la hora de diseñar el estudio.

La actividad biológica de las nanopartículas depende de sus características físicas y químicas, tales como el tamaño y la forma, la composición superficial (carga e hidrofobi-

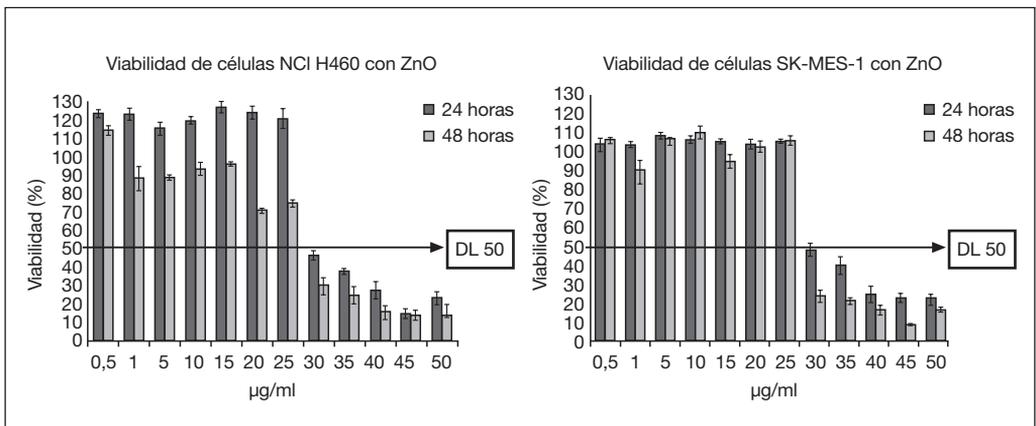


Figura 2. Estudio de muerte celular (dependiente de la dosis) inducida por nanopartículas de óxido de zinc en células NCI H460 y SK-MES-1 (Lozano et al., 2011). DL50: dosis letal 50.

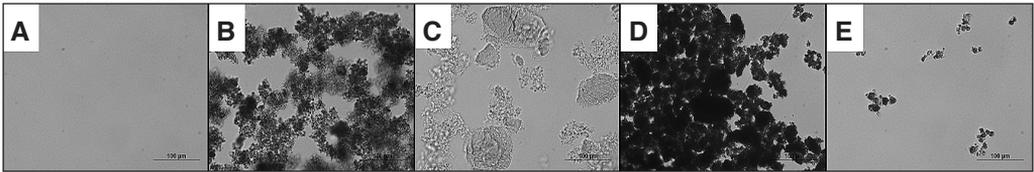


Figura 3. Microscopía óptica (objetivo 40x) de distintas nanopartículas en medio con suero bovino fetal: A: sólo medio; B: nanopartículas de FeOx; C: nanopartículas de TiOx; D: nanopartículas de CeO<sub>2</sub>; E: nanopartículas de ZnO.

cidad), el grado de dispersión o agregación, la composición química, la solubilidad, la dosis, la pureza, etc. (Powers et al., 2006). Muchas de estas características pueden ser modificadas como resultado del contacto entre la cubierta externa de las nanopartículas y los fluidos biológicos, e influye en su posterior interacción con los componentes sanguíneos. Por ejemplo, es muy frecuente observar que nanopartículas estables en agua o etanol se agreguen en presencia de medios fisiológicos y suero (Lozano et al., 2011) (Fig. 3).

Por otra parte, las proteínas sanguíneas, como la albúmina, las apolipoproteínas, las inmunoglobulinas y las moléculas de la cascada de activación del complemento y de la coagulación, entre otras, pueden unirse inespecíficamente a la superficie de los nanomateriales y provocar su opsonización (Gessner et al., 2003; Salvador-Morales et al., 2006), fa-

voreciendo la fagocitosis de las nanopartículas por parte de los macrófagos (Fig. 4) (Díaz et al., 2008). Esto puede dar lugar a una reducción en la vida media de las nanopartículas en el sistema circulatorio y alterar su estabilidad, induciendo su precipitación y agregación.

La adsorción de las proteínas a la superficie de las nanopartículas depende de las características de la cubierta, de la composición y del método de síntesis de la nanopartícula en cuestión. Se sabe que alterando la carga de la superficie añadiendo diferentes grupos funcionales pueden modificarse las propiedades hidrófilas de la nanopartícula y su vida media, a la vez que disminuye la interacción con proteínas o receptores que estimulan la fagocitosis (Dobrovolskaia y McNeil, 2007). Por ejemplo, las nanopartículas con su superficie recubierta de polietilenglicol (PEG) unen menos proteínas que las que no poseen esta modificación en su superficie, y en algunos casos también disminuyen su toxicidad (Díaz et al., 2008) (Fig. 5).

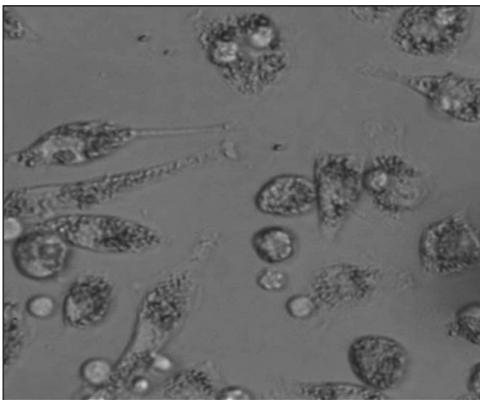


Figura 4. Macrófagos móridos que han fagocitado nanopartículas de hierro y zeolita.

## Esterilidad

Otro factor muy importante es la esterilidad de las nanopartículas. Previamente a su uso in vivo hay que asegurarse de que las nanopartículas son estériles y de que no contienen endotoxinas bacterianas contaminantes. Algunos de los ensayos para determinar la presencia de endotoxinas ampliamente utilizados interfieren con las propias nanopartículas, lo que hace necesario diseñar nuevos métodos.

Con respecto a qué tipo de esterilización utilizar, depende de la composición, del tama-

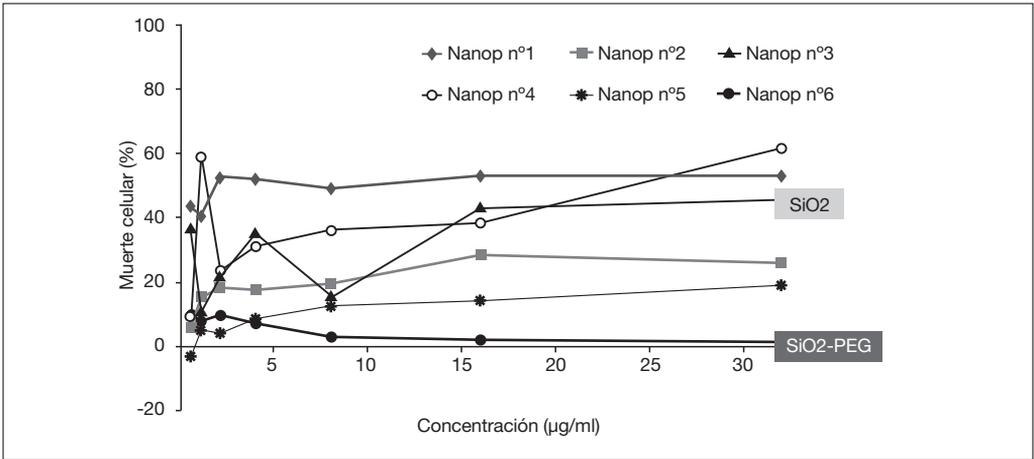


Figura 5. Porcentaje de muerte en células humanas incubadas con distintas dosis y tipos de nanopartículas. El recubrimiento con polietilenglicol (PEG) hace que la nanopartícula de sílice disminuya su toxicidad (Díaz et al., 2008).

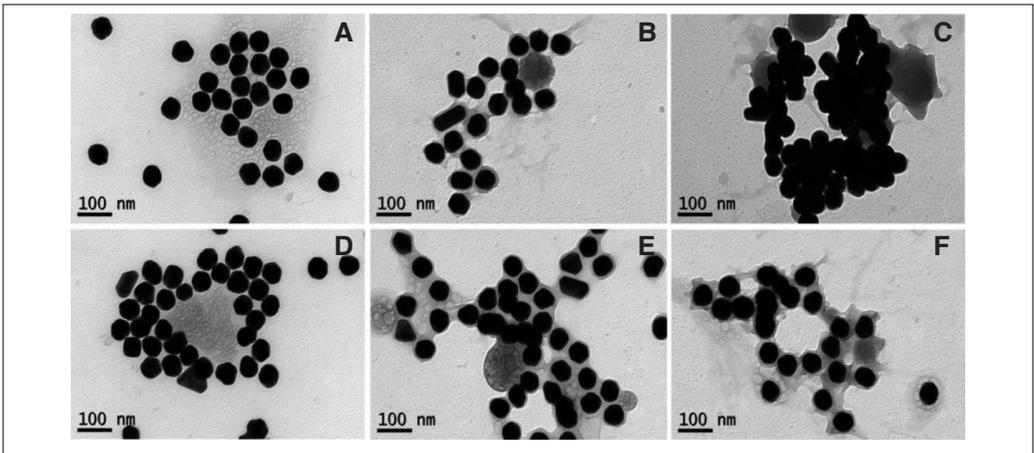


Figura 6. Nanopartículas de oro antes (A) y después de ser esterilizadas mediante radiación ultravioleta (B), gas plasma (C), óxido de etileno (D), formaldehído (E) y autoclave (F) (Franca et al., 2010).

ño y del recubrimiento de la nanopartícula, ya que cada clase de método puede afectar a un tipo u otro. En un estudio realizado por nuestro grupo, nanopartículas de oro recubiertas con PEG fueron sometidas a cinco procedimientos de esterilización diferentes (Fig. 6) y se observó que el gas plasma las afectaba de

forma importante (produciendo coalescencia y agregación), por lo que este método, muy utilizado en diversos centros hospitalarios, no podría usarse para esta nanoestructura en concreto (Franca et al., 2010). Sin embargo, otras nanopartículas de oro de menor tamaño y recubiertas de tioipronina no se afectaban



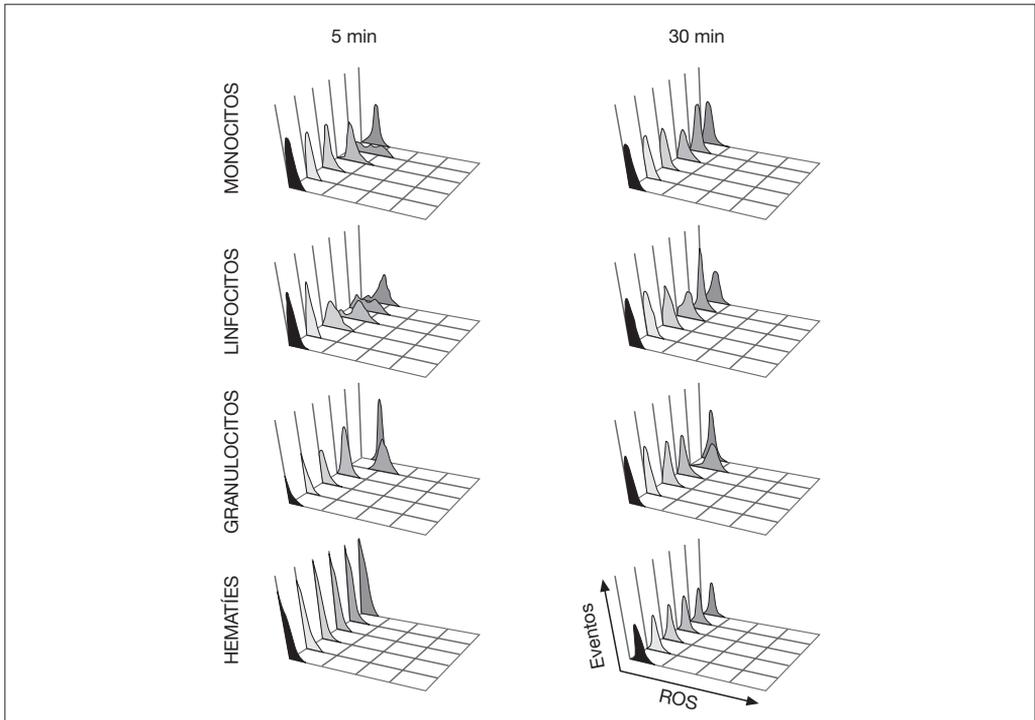


Figura 8. Producción de ROS por parte de distintas células humanas de sangre periférica en presencia de cinco nanopartículas diferentes. Como control negativo se utilizaron células solas (en negro) (Díaz, et al., 2008).

estrés oxidativo. Los excesos de ROS pueden oxidar varias moléculas (DNA, proteínas y lípidos) y conducir a la muerte celular y a daño en los tejidos, tal como ocurre en distintos procesos fisiopatológicos como la inflamación, la hipoxia, los trastornos inmunitarios, el metabolismo de drogas y alcohol, la exposición a radiaciones ultravioleta o terapéuticas, y en casos de deficiencia de vitaminas antioxidantes (Amer et al., 2003).

### Activación del complemento

Se ha detectado que determinadas nanoestructuras como los liposomas, o nanopartículas recubiertas de PEG, pueden llevar a una activación de la cascada del complemento (Mosqueira et al., 2001; Bertholon et al., 2006).

Este proceso puede inducir respuestas inflamatorias, con liberación de anafilotoxinas, atracción de células inmunitarias a la zona de inoculación y posterior destrucción celular. Puesto que el complemento puede activarse por varias cascadas (clásica, alternativa y por la vía de las lectinas), puede estudiarse la degradación del factor C3 (Lozano et al., 2011), común a las tres vías, como indicativo de su activación. Esto puede detectarse mediante Western blot o ELISA (Fig. 9).

### Nanoestructuras como adyuvantes en vacunas

Ya que muchas nanoestructuras pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario como extrañas, podemos hacer de este hecho una

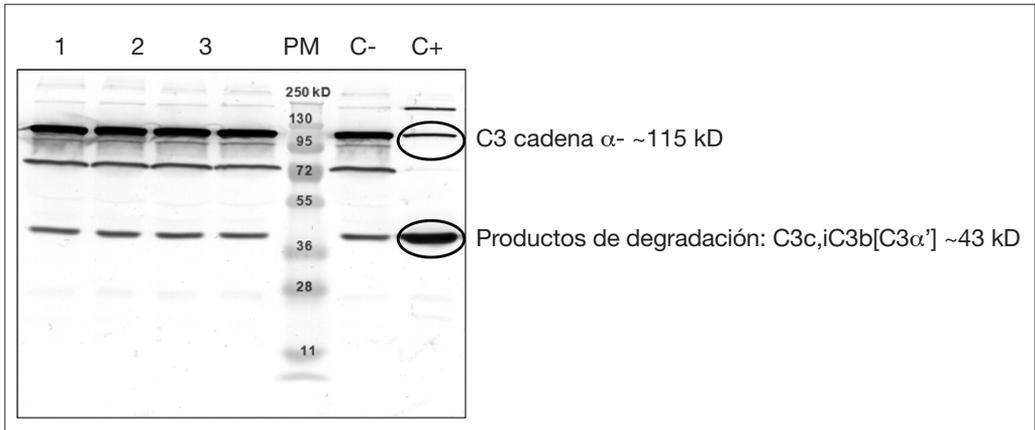


Figura 9. Detección del factor C3 y de sus productos de degradación en plasma humano mediante Western blot, en ausencia (C-) o en presencia de nanopartículas. Como control positivo (C+) se empleó veneno de serpiente (Lozano, et al., 2011).

ventaja y diseñarlas para que potencien la respuesta inmunitaria, bien para destruir un tumor (en el hígado, por ejemplo, donde gran parte de las nanopartículas son rápidamente captadas por los macrófagos hepáticos) o para el desarrollo de nanovacunas (Prego et al., 2010).

En el campo concreto de las vacunas, las nanopartículas pueden ofrecer ventajas a las ya existentes en varias características. Por una parte, pueden incrementar su eficacia, con un efecto adyuvante más potente; también podrían generarse vacunas más termoestables, que mantuvieran su eficacia sin verse afectadas por la rotura de la cadena del frío (uno de los problemas habituales con las vacunas actuales); que no necesitaran de inyección al utilizar sustancias mucoadhesivas que permitieran su inoculación por otras vías (intranasal, oral, vaginal, ocular...); y vacunas de liberación controlada que no requirieran administrar varias dosis.

## Conclusión

De todo lo expuesto se concluye que el campo de la nanotecnología puede ofrecer una gran variedad de productos con un enorme poten-

cial en el ámbito biomédico, pero es necesaria una correcta y completa caracterización para asegurar su biocompatibilidad e inmunogenicidad.

## Bibliografía

- Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur J Haematol.* 2003;70:84-90.
- Bertholon I, Vauthier C, Labarre D. Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharm Res.* 2006;23:1313-23.
- Díaz B, Sánchez-Espinel C, Arruebo M, Faro J, de Miguel E, Magadán S, et al. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small.* 2008;4:2025-34.
- De la Escosura-Muñiz A, Sánchez-Espinel C, Díaz-Freitas B, González-Fernández A, Maltezda Costa M, Merkoçi A. Rapid identification and quantification of tumor cells using an electrocatalytic method based on gold nanoparticles. *Anal Chem.* 2009;81:10268-74.
- Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol.* 2007;2:469-78.

- Foucaud L, Wilson MR, Brown DM, Stone V. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett.* 2007;174:1-9.
- Franca A, Peláez B, Sánchez Espinel C, Hernández A, Fernández-López C, Grazú V, et al. Sterilization matters: consequences of different sterilization techniques on gold nanoparticles. *Small.* 2010;6:89-95.
- Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Müller RH. Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65:319-26.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:13549-54.
- Koping-Hoggard M, Sánchez A, Alonso MJ. Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4:185-96.
- Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HT, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med.* 2007;13:95-9.
- Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008;4:26-49.
- Lozano T, Rey M, Moya S, Donath E, Gao C, Antipov A, et al. Cytotoxicity effect of metal oxide nanoparticles in human tumor cell lines. *Journal of Physics: Conference Series.* 2011;304. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012046.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011;103:317-24.
- McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol.* 2005;78:585-94.
- Mosqueira VC, Legrand P, Gulik A, Bourdon O, Gref R, Labarre D, et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials.* 2001;22:2967-79.
- Nimesh S, Goyal A, Pawar V, Jayaraman S, Kumar P, Chandra R, et al. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Control Release.* 2006;110:457-68.
- Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci.* 2006;90:296-303.
- Prego C, Paolicelli P, Díaz B, Vicente S, Sánchez A, González-Fernández A, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine.* 2010;28:2607-14.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green ML, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol.* 2006;43:193-201.
- Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, et al. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5914-22.
- Valdivia Uría JG, Ibarra García MR, Fernández Pacheco R, Vilorio A, Higuera T, Laborda A, et al. Estudio experimental sobre quimioterapia focalizada en riñón mediante arpón magnético y administración intravenosa de nanopartículas ferrocarrónicas. *Arch Esp Urol.* 2007;60:5-14.
- Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nano-sized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* 2006;24:39-47.
- Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* 2010;151:458-65.

## DISCUSIÓN

**A. RIBAS:** ¿Qué tipo de nanopartículas usáis en vuestra empresa?

**A. GONZÁLEZ:** Nuestra empresa, la *spin off* Nano-Immuntech, tiene dos secciones: productos y servicios. En la primera desarrollamos pro-

ductos para funcionalizar nanopartículas, es decir, para conjugar anticuerpos, DNA, aptámeros, azúcares o péptidos sobre la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, en la sección de servicios ofrecemos la caracterización físico-química y biológica de nanopar-

tículas. Estamos trabajando muy activamente en la toxicidad de las nanopartículas y en su inmunogenicidad.

**R. PUJOL:** Para crear nanopartículas se habla mucho del uso de oro, hierro, carbono, etc. ¿Puede crearse una nanopartícula completamente proteica?

**A. GONZÁLEZ:** Sí pueden crearse nanopartículas completamente proteicas, como el empleo de albúmina para rodear fármacos antitumorales. También existen nanopartículas biodegradables que no son por completo proteicas, pero que pueden combinar elementos. Por ejemplo, pueden usarse polisacáridos (como el quitosano) u otras estructuras oleosas (como emulsionantes) que en determinadas condiciones adoptan estructuras esféricas, pequeñas y bastantes estables, en las cuales pueden acoplarse antígenos proteicos o proteínas en el exterior. Por otro lado, las partículas de oro, que no son biodegradables, tienen unas propiedades ópticas y térmicas ideales, son muy fáciles de sintetizar y puede controlarse su tamaño durante la síntesis (nosotros hemos empleado distintas nanoestructuras de oro, desde 20 hasta 150 nm). Además, pueden ponerse cubiertas empleando otros compuestos (por ejemplo, sílice) y acoplar más elementos. El problema de estas nanopartículas, y en general de todas aquellas no biodegradables, es que no conocemos su tasa de acumulación, su biodistribución, dónde se excretan y eliminan, etc. Por ello, para poder usar nanopartículas en terapéutica son necesarios estudios de biodistribución, excreción y eliminación. El problema de estos estudios es que, aunque se marquen radiactivamente las proteínas asociadas a las nanopartículas, cuando éstas entran en el organismo pueden soltarse de la nanopartícula y entonces se observa la radiactividad de la proteína y no la de la estructura no biodegradable. Hay que resolver los problemas técnicos antes de poder generalizar el uso de este tipo de partículas no biodegradables en terapéutica.

**L. ÁLVAREZ-VALLINA:** En primer lugar, ¿qué características crees que deberían tener las nanopartículas para su uso en terapia antitumoral, es decir, tipos y número de moléculas de anticuerpos, tamaño, etc.? Y en segundo lugar, ¿existe alguna estrategia para fomentar el desensamblado in vivo de estas partículas?

**A. GONZÁLEZ:** En relación con la primera pregunta, para uso terapéutico recomendaría nanopartículas biodegradables que contengan fármaco en su interior. Las estructuras acopladas en su superficie deberían ser anticuerpos muy pequeños, ácido fólico, transferrina o albúmina (que permitiría una mejor entrada de las nanopartículas en el tumor y mejoraría su eficiencia). Además, las partículas deberían estar dirigidas y ser inertes para el sistema inmunitario (enmascararlas con PEG u otros compuestos), porque si no es así casi todas serán reconocidas y fagocitadas por los macrófagos hepáticos y esplénicos. En relación con la segunda pregunta, no hay muchos datos sobre los mecanismos de ensamblado y desensamblado de los nanomateriales in vivo. Se dispone de información sobre las interacciones in vitro (por ejemplo la interacción de nanomateriales con proteínas séricas, células y otros materiales), por lo que no podría decir qué interacciones concretas se darían entre nanopartículas y entre éstas y los sistemas biológicos in vivo. Por otro lado, sí se conocen las toxicidades de los materiales usados en las nanopartículas (por ejemplo, del cadmio o del zinc), y se están empezando a conocer de muchas nanoestructuras. Sin embargo, considerando los riesgos que implique su uso, ante una aplicación terapéutica concreta habrá que sopesar si los beneficios compensan la toxicidad propia de las nanopartículas.

**A. CELADA:** Hay una gran variedad de partículas de oro y no todas son fagocitadas por los macrófagos. Las partículas de oro que preparamos en mi grupo sólo son fagocitadas si las acoplamos a péptidos dirigidos de un determinado modo, en concreto hacia péptidos

presentes en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer. De esta manera, los macrófagos pueden activarse mediante los receptores *toll-like* 4 y fagocitar las nanopartículas que nosotros queramos. Actualmente estamos en los inicios del uso de las nanopartículas, a pesar de que ya hay una gran variedad de partículas de oro.

**A. GONZÁLEZ:** Estoy totalmente de acuerdo, no se puede simplificar y hablar simplemente de oro, titanio, etc. Se dispone de una gran variedad de partículas, tipos de síntesis, tamaños, recubrimientos, etc. Y cada una de estas variedades se comportará de manera diferente a las demás. Gracias a esta nueva tecnología podremos conocer mejor nuestra propia biología, tanto extracelular como intracelular.

**J. ARAMBURU:** En un futuro las nanopartículas serán fruto de aplicaciones biológicas o bien contaminantes que proceden de otros procesos, como los industriales. Es por ello que tendremos que estudiar tanto su biodistribución en los organismos vivos como las consecuencias indeseables derivadas de su uso industrial, por ejemplo la posible acumulación en el ambiente debido a que no todas las nanopartículas serán biodegradables.

**A. GONZÁLEZ:** Estoy de acuerdo con lo que comentas. Hay tanto para estudiar, que las

agencias reguladoras están analizando diversos aspectos (ambiental, médico, alimentación, cosmética, vertidos...), ya que van a diferir mucho unos escenarios de otros: una exposición ambiental continuada, una accidental con grandes dosis por vía inhalatoria o una aplicación in vivo con dosis controladas, así como la vía de entrada (oral, nasal, intravenosa, cutánea...) en el organismo.

**A. RIBAS:** Para intentar responder a una de las preguntas anteriores me gustaría comentar que hace 1 año publicamos un estudio (*Nature*. 2010;464:1067-70) en el cual por primera vez administramos nanopartículas de ciclodextranos, totalmente inertes con pegilación y transferrina, para conseguir estabilizar y vehicular siRNA en tumores. Esto permitiría administrar un fármaco mediante una plataforma que podría bloquear cualquier mRNA de cualquier proteína. La necesidad de desarrollar este tipo de partículas es muy importante, aunque aún estamos en sus inicios y el proceso es muy largo. A raíz de este primer estudio, creo que las nanopartículas de oro y de liposomas no son la mejor opción por la dificultad de vehicularlas, ya que las partículas de liposomas siempre van al hígado, independientemente de si se dirigen o no; por ello, creo que las nanopartículas preparadas con polímeros tienen unas propiedades farmacocinéticas muy superiores.