

Nanotoxicidad en los tiempos de la nanotecnología

Amalia Ruiz, Marta Marín Barba y Estefanía Lozano Velasco

University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, Norfolk, UK

INTRODUCCIÓN

El comienzo del siglo XXI abrió las puertas a los productos basados en nanomateriales (NMs). Indiscutibles ventajas como la posibilidad de diseñar herramientas de trabajo para la escala nanométrica, ser capaces de modificar la superficie de una nanopartícula (NP) con determinada molécula, explotar las nuevas propiedades ópticas o magnéticas que aparecen en un material nanoestructurado o el beneficio de la elevada relación área superficial/volumen constituyeron el motor impulsor de un mercado creciente para los productos y herramientas nanotecnológicos. Para el año 2018 se espera un crecimiento global en el mercado de los NMs aproximado a los 4.4 billones de dólares. Sin embargo, la explotación comercial de la nanotecnología trae consigo importantes interrogantes relacionados con la seguridad en el uso y manejo de estos. Sus efectos recaerán sobre la salud tanto del trabajador expuesto durante el proceso productivo, como del consumidor con acceso a dicho producto, junto con las posibles consecuencias medioambientales.

Entonces la pregunta inicial para los trabajadores, consumidores o agentes reguladores sería si dichos materiales nanoparticulados son seguros o no, y cuáles serían las propiedades y los mecanismos a través de los cuales producen toxicidad. La pregunta constituye en sí un gran reto: el estudio de la toxicidad de los NMs no es posible afrontarlo empleando únicamente los métodos de la

toxicología clásica. Todavía queda mucha investigación por realizar, como ponen de manifiesto las previsiones del *Nanosafety Cluster* de la Unión Europea, que no sitúa hasta 2025 la consecución de algunos objetivos imprescindibles, como son la disponibilidad de métodos para la caracterización físico-química de NMs complejos, la validación y estandarización de nuevos modelos biológicos para la caracterización toxicológica y ecotoxicológica, y la diseminación del conocimiento más allá de la comunidad científica, dígase la industria, agentes reguladores, etcétera. La investigación en nanotoxicología requiere un enfoque multidisciplinar (toxicología, ciencia de los materiales, medicina, biología molecular, bioinformática, etcétera) para establecer correlaciones entre captación, transformación e impacto de los NMs una vez que entran en contacto con células u organismos, que permita llegar a proponer un modelo genérico de nanotoxicidad. A día de hoy, la evidencia científica disponible sobre la interacción de las NPs y los NMs en los sistemas vivos y en particular sobre la salud humana, es suficiente para adoptar el principio de precaución y considerarlos como potencialmente peligrosos (*Savolainen 2013*).

¿CÓMO ENTRAMOS EN CONTACTO CON LAS NANOPARTÍCULAS?

Importantes estudios sobre la caracterización toxicológica de diferentes NPs han sido llevados a cabo en la última década, prestando especial atención a los efectos en

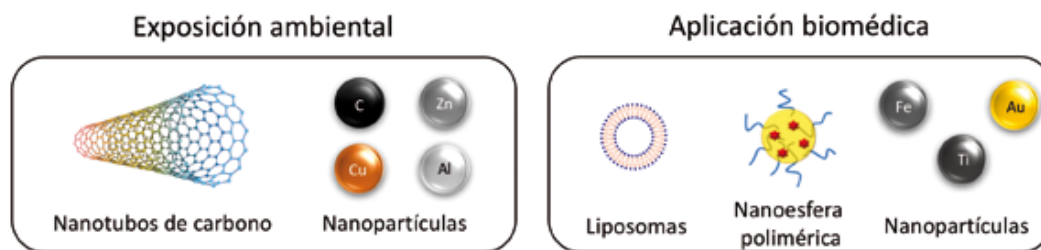
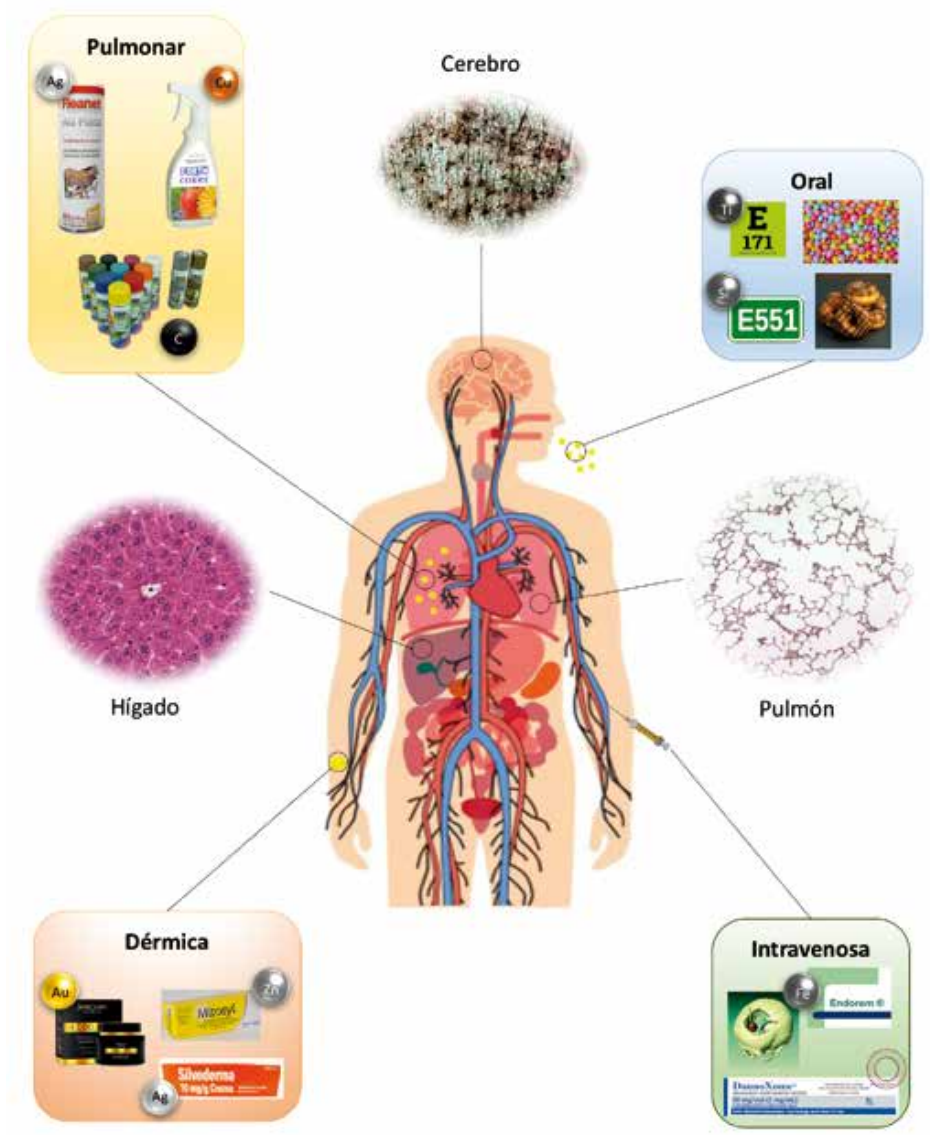


Figura 1

Ilustración esquemática de diferentes materiales nanoestructurados que pueden ser incorporados al organismo mediante diferentes formas de exposición. Panel izquierdo: NMs basados en carbono en forma de NPs o nanotubos así como partículas de óxidos metálicos como el zinc, aluminio o cobre pueden incorporarse por exposición ambiental. Panel derecho: NPs diseñadas para determinados tipos de aplicaciones en productos alimentarios, cosméticos o farmacéuticos.

Figura 2

Ilustración esquemática de diferentes materiales nanoestructurados que pueden ser incorporados al organismo mediante diferentes formas de exposición. Panel izquierdo: NMs basados en carbono en forma de NPs o nanotubos así como partículas de óxidos metálicos como el zinc, aluminio o cobre pueden incorporarse por exposición ambiental. Panel derecho: NPs diseñadas para determinados tipos de aplicaciones en productos alimentarios, cosméticos o farmacéuticos.



el tracto respiratorio debido al historial de enfermedades respiratorias asociadas a la exposición de aerosoles. NPs dispersadas en forma de aerosol pueden llegar hasta los alvéolos pulmonares y diferentes publicaciones han descrito cómo pueden pasar a la zona intersticial y, a través de la sangre, alcanzar órganos secundarios. Ejemplo de ello son los nanotubos de carbono de los cuales se ha descrito que inducen fibrosis intersticial, y específicamente estudios con nanotubos multilaminares han mostrado cómo estos pueden inducir el desarrollo del cáncer. A través de esta vía también se ha descrito la acumulación de NPs en el sistema nervioso central tras su paso por el bulbo olfatorio. La inhalación se considera la principal vía de penetración ya que partículas insolubles no suelen atravesar la piel a no ser que exista un daño en la misma. Sin embargo, NPs liposolubles presentes en cremas u otros productos tópicos pueden transitar por el espacio intercelular de la capa córnea de la piel, pasar a través de los folículos capi-

lares o de las glándulas sudoríparas, y una vez absorbidas pueden alcanzar el torrente sanguíneo. Una vez en el sistema circulatorio las NPs se pueden acumular en diferentes órganos como el hígado, bazo, riñón, corazón y cerebro o en ganglios linfáticos. Los estudios de toxicidad también se han centrado en evaluar posibles daños o alteraciones provocados por NPs administradas por vía intravenosa. Esta forma de exposición es fundamental para NMs diseñados para aplicaciones biomédicas, como es el caso de las NPs de óxido de hierro. Estas NPs han sido aprobadas por las agencias reguladoras de medicamentos para su uso en humanos como agentes de contraste para resonancia magnética nuclear o para el tratamiento de determinados tipos de cáncer mediante hipertermia. También existen numerosas formulaciones farmacéuticas basadas en NPs lipídicas (ej. Liposomas) o poliméricas cuyo objetivo es la liberación controlada de fármacos en determinados órganos o tejidos (P. Schulte 2016). >>>

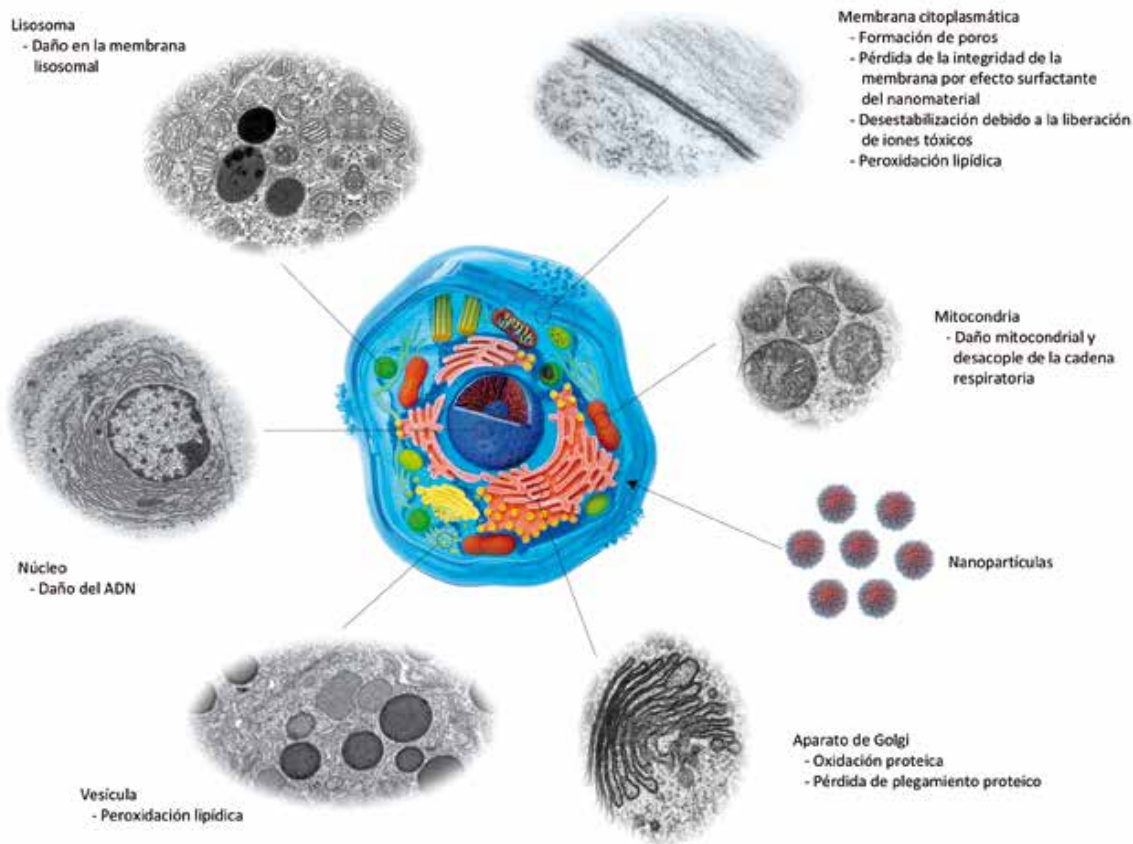


Figura 3

Posibles efectos citotóxicos derivados de la interacción célula-nanopartícula.

¿CÓMO EVALUAMOS LA NANOTOXICIDAD?

»» Con el impacto de la nanotecnología en la biomedicina, se hace cada vez más necesaria la profundización en estudios asociados a la toxicidad de estos materiales, así como la estandarización de dichos ensayos. Una de las herramientas más empleadas para el estudio de la toxicidad de NPs, antes de su aplicación *in vivo*, son los cultivos celulares (*in vitro*). Estos poseen una serie de ventajas con respecto a los estudios *in vivo*: menor complejidad, costes y cuestiones éticas. Por otra parte presentan un mayor control sobre el ambiente que rodea a las células y homogeneidad tanto a nivel morfológico como de composición, permitiendo profundizar más fácilmente en la comprensión de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar durante los tratamientos. La desventaja fundamental de los ensayos *in vitro* radica en que las dosis de estudio son puntuales y elevadas en comparación a una dosis crónica a bajas concentraciones, más similar a la que podríamos estar sometidos de forma natural.

Las NPs pueden interactuar de distintas formas con las células dependiendo de sus propiedades físico-químicas,

de modo que las técnicas que se utilizan para evaluar la toxicidad estudian desde la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés), la integridad de la estructura celular tanto de membranas como organelos, los posibles daños en el material genético o el desencadenamiento de señales bioquímicas como es la estimulación de la respuesta inflamatoria. Es necesario señalar que para un análisis riguroso del fenómeno de citotoxicidad se requiere la combinación de varios métodos ya que cada uno aporta información diferente, por ejemplo: azul tripán, actividad enzimática de lactato deshidrogenasa, medidas de resistencia eléctrica transepitelial (TEER, siglas en inglés), permiten evaluar la integridad de la membrana celular; rojo neutro, la integridad de la membrana lisosomal; yoduro de propidio, la ausencia de daños en el ADN; MTT, la integridad mitocondrial; ensayo con monoclorobimán o cuantificación de ROS con diclorofluoresceína, el estrés oxidativo; BrdU y EdU, la proliferación celular; y tinción inmunohistoquímica para α -tubulina, vinculina, F-actina o faloidina, la arquitectura del citoesqueleto. La microscopía confocal o electrónica de transmisión también ha permitido describir el proceso de internalización, ubicación subcelular y degradación de diferentes tipos de NPs.

Conviene resaltar que estas técnicas no fueron desarrolladas para el estudio de la toxicidad asociada a tratamientos con NPs o NMs, de modo que el empleo de estos métodos requiere su optimización y validación para la evaluación de la nanotoxicidad. De forma general, los efectos citotóxicos observables en un tratamiento basado en NPs podrían ser de dos tipos: los que son independientes de la interacción célula-NP y los asociados al proceso de internalización y transformación intracelular de las NPs. En el primer caso este tipo de citotoxicidad se debe a la interacción de las NPs con el medio de cultivo. Debido a la reactividad superficial de las NPs, estas tienden a formar una “corona de biomoléculas” que secuestra proteínas, nutrientes y factores de crecimiento presentes en el medio y puede afectar la viabilidad celular. Además, la adición de partículas al medio de cultivo puede modificar el pH o la presión osmótica y provocar indirectamente la muerte celular. Para evitar confundir estos posibles resultados de citotoxicidad no asociada a la interacción célula-NP se recomienda incluir en el protocolo de trabajo la incubación previa de las NPs, su decantación y resuspensión en medio de cultivo fresco. Por otra parte se recomienda también realizar estudios de citotoxicidad empleando inhibidores del proceso de endocitosis o con tipos celulares con muy baja capacidad endocítica (ej. Eritrocitos) para confirmar que los resultados observados se deben a un fenómeno de toxicidad indirecta provocada por las NPs en el medio de cultivo (Laurent 2012).

A través de otros ensayos *in vitro* se ha podido determinar cómo las características físico-químicas de las NPs determinan su interacción con la célula y por tanto, su citotoxicidad. Se ha observado que el hierro es un material mucho menos tóxico que el níquel, cobalto, cadmio o la plata. Por otra parte, la internalización de NPs de CdSe y liberación de iones cadmio en el citosol de hepatocitos primarios provoca muerte celular, mientras que la adhesión de NPs a la membrana de células madres puede interferir con la adhesión celular a la superficie. Por otra parte la degradación de las NPs en la célula, puede traer como consecuencia la creación de ROS. Estos radicales provocan daño celular a partir de la degradación de proteínas, lípidos, enzimas y ácidos nucleicos lo que conduce a procesos de necrosis o apoptosis.

A pesar del coste, el tiempo y las consideraciones éticas, se hacen necesarios también estudios toxicológicos en modelos *in vivo*. Esto incluye ensayos de farmacocinética, biodistribución, absorción, metabolismo y excreción. Esta información permite conocer las posibles consecuencias inmunológicas, neurológicas, reproductivas, cardiovasculares y carcinogénica, debi-

do a la administración intravenosa, oral, dérmica o por inhalación de las NPs. Entre los aspectos más importantes a estudiar está la biocompatibilidad de las NPs en sangre, su estabilidad y efectos en el proceso de coagulación, la respuesta inflamatoria del organismo, así como el análisis de la expresión genética de factores relacionados con el estrés oxidativo (Farcal 2015).

La detección y cuantificación de NPs en una matriz biológica, es una tarea compleja ya que se hace necesaria la combinación de varias técnicas para obtener datos cuantitativos de la presencia de las NPs y de sus propiedades estructurales, así como de los procesos de transformación que tienen lugar a largo plazo. Dependiendo de las propiedades ópticas, térmicas o magnéticas de las NPs se puede monitorizar su farmacocinética y biodistribución en el organismo utilizando, por ejemplo, técnicas de imagen por resonancia magnética nuclear o imagen

LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

de las nanopartículas como la naturaleza química del material, el tamaño partícula, el tamaño de agregado, la carga superficial y la cristalinidad condicionan su comportamiento *in vivo*. Por ejemplo, el tamaño es un parámetro que influye de manera directa en la farmacocinética de las nanopartículas.

de fluorescencia si las NPs contienen en su estructura alguna sonda de este tipo. Otras técnicas como el análisis elemental, los estudios histológicos, el marcaje con radioisótopos o técnicas de Resonancia de Spin del Electrón, Resonancia Ferromagnética o Susceptibilidad AC son utilizadas frecuentemente en los estudios de detección de NPs en muestras de células o tejidos.

Las propiedades físico-químicas de las NPs como la naturaleza química del material, el tamaño partícula, el tamaño de agregado, la carga superficial y la cristalinidad condicionan su comportamiento *in vivo*. Por ejemplo, el tamaño es un parámetro que influye de manera directa en la farmacocinética y biodistribución de las NPs en los tejidos. Las NPs de tamaños cercanos a los 200 nm se acumulan rápidamente en el hígado donde son detectadas por macrófagos y eliminadas por el sistema reticuloendotelial, mientras que partículas más pequeñas son inmediatamente filtradas por el riñón. Si disminuye el tamaño de partícula se observa que aumenta su tiempo de vida media en sangre. Bajo condiciones no patológicas, partículas ~10 nm no podrían atravesar el endotelio, sin embargo, en el caso de procesos inflamatorios o infiltración tumoral, la permeabilidad de los tejidos aumenta y admite el paso de partículas de hasta 700 nm. >>>

»» Finalmente, en el análisis integral de la nanotoxicidad asociada a la exposición a NMs/NPs se debe incluir la validación de protocolos de transcriptómica, proteómica y metabolómica que permitan dibujar el cuadro global de qué sucede a largo plazo con determinada partícula en un sistema biológico y de ahí proponer un modelo genérico de toxicidad.

CONCLUSIONES

La investigación en nanotoxicología durante más de una década ha abierto una ventana a un mundo que solo será

LA NANOTECNOLOGÍA no hará más que aumentar la complejidad de dichos nanoobjetos, transformándolos en nanoproducidos con estructuras cada vez más "activas" e integradas en nanosistemas. Esto significa que los métodos para evaluar la seguridad de dichos nanoproducidos deberán evolucionar a la par que el desarrollo tecnológico.

cada vez más complejo. Por el momento, nos enfrentamos al reto de entender qué sucede con NPs o NMs que entran en contacto con células u organismos. Sin embargo esta es solo la primera generación de nanoobjetos, los cuales son en su mayoría nanoestructuras "pasivas". La nanotecnología de cara al futuro no hará más que aumentar la complejidad de dichos nanoobjetos, transformándolos en nanoproducidos con estructuras cada vez más "activas" e integradas en nanosistemas. Esto significa que los métodos para evaluar la seguridad de dichos nanoproducidos deberán evolucionar a la par que el desarrollo tecnológico. La toxicología en los tiempos de la nanotecnología tiene un reto urgente: desarrollar nuevos modelos biológicos que permitan caracterizar de forma rápida, precisa y a menor coste la avalancha de nanoproducidos que a día de hoy ya están disponibles en el mercado global. La evolución de la toxicología como ciencia irá en el sentido de integrar cada vez más información

con el desarrollo de la bioinformática y la ampliación de bases de datos que permitan dar un gran salto cualitativo hacia una toxicología predictiva en función de las características físico-químicas del NM.

Todo este volumen de información deberá traducirse en la toma de medidas para garantizar espacios de trabajo o productos seguros y medioambientalmente sostenibles. Muestra de la importancia en este tema, son los esfuerzos emprendidos por los gobiernos de Estados Unidos, Europa y Japón que han destinado grandes recursos al desarrollo de programas de evaluación de riesgos y bioseguridad de dichos nanoproducidos. Tal es el caso de la asignación de 31 millones de euros repartidos entre 13 proyectos durante el 6º Programa Marco y de 43 proyectos (106 millones de euros) dentro del 7º Programa Marco de la Unión Europea a diferentes consorcios como *Nanosolutions*, *Nanomile*, *Marina*, *NanoValid*, o *NanoRegulatory Testing* para el desarrollo y validación de métodos de caracterización de NMs, identificación y manejo del riesgo asociado a su exposición y la propuesta de una hoja de ruta hasta 2025 para la regulación en el uso de los mismos. ■

PARA LEER MÁS

Farcas L. Comprehensive in vitro toxicity testing of a panel of representative oxide nanomaterials: First steps towards an intelligent testing strategy. *PLoS ONE* 10 (2015) e0127174.

Laurent S. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and cell vision. *PLoS One* 7 (2012) e9997.

Savolainen K, Backman U, Brouwer D, Fadeel B, Fernandes T, Kuhlbusch T, Landsiedel R, Lynch I, Pylkkänen L. Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations. EDITA, Helsinki 2013.

Schulte P. Taking stock of the occupational safety and health challenges of nanotechnology: 2000-2015. *J Nanopart Res* 18 (2016) 159.