



Trabajo Fin de Grado
Grado en Medicina

Nanopartículas como agentes teranósticos

Autor:

Julen Landín Basterra

Director:

Ignacio García-Alonso Montoya



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

Facultad de Medicina y Odontología

GRALaren ZUZENDARIAREN AMAIERAKO TXOSTENA INFORME FINAL DEL DIRECTOR DEL TFG

Nanopartículas como agentes teranósticos

Egilea/Autor:

Julen Landín Basterra

Zuzendaria/Director:

Ignacio García-Alonso Montoya

Kalifikazioa/ Calificación:

Zenbakiaz/ En número (0-10)	10
Letraz/ En letra	Diez

Zuzendariaren Oharrak eta balorazioak /
Consideraciones y valoraciones del Director:

Ha realizado el estudio con gran profundidad, siguiendo adecuadamente las indicaciones recibidas y proponiendo alternativas con un grado de iniciativa adecuado a su formación. Ha demostrado un alto grado de comprensión de la materia objeto de estudio, constatado durante las sesiones de dirección mantenidas.

Lekua eta data / Lugar y fecha: En Leioa, a veintisiete de abril de 2016

Firmado/Izenpea:
GRALeko zuzendaria / Director del TFG

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. NANOPARTÍCULAS ORIENTADAS AL DIAGNÓSTICO.....	4
2.1. NANOSISTEMAS DE IMAGEN.....	5
2.2. NANOBIOSENSORES.....	7
2.2.1. Biosensores nanofotónicos.....	9
2.2.2. Biosensores nanoplasmónicos.....	10
2.2.3. Biosensores nanomecánicos.....	12
2.2.4. Sistemas “laboratorio-en-un-chip”.....	14
3. NANOPARTÍCULAS ORIENTADAS A LA TERAPÉUTICA.....	16
3.1. SELECTIVIDAD DEL DEPÓSITO.....	16
3.1.1. La orientación pasiva.....	16
3.1.2. La orientación activa con agentes de direccionamiento.....	17
3.1.3. Orientación activa mediante un campo magnético externo.....	18
3.2. VEHICULIZACIÓN DE FÁRMACOS.....	18
3.3. HIPERTERMIA MEDIANTE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	19
3.3.1. La hipertermia como inductora de necrosis / apoptosis tumoral.....	23
4. BIBLIOGRAFÍA.....	30

1. INTRODUCCIÓN

La nanomedicina, aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud, es la rama de la nanotecnología que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. La detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y un preciso seguimiento posterior de su evolución serán posibles en los próximos años gracias a la aplicación de las herramientas nanotecnológicas que se están desarrollando actualmente. Los importantes avances en este campo podrían dar lugar a sistemas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia que los existentes, lo que redundaría en una mayor calidad de vida para el hombre.

Desde hace unos años la nanotecnología se está perfilando como un área emergente en ciencia y tecnología que nos está conduciendo a una nueva revolución industrial. La nanotecnología se define como el «desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm (ver **Figura 1**), para obtener una comprensión fundamental de fenómenos y materiales en dicha escala nanométrica y para crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño». Nanómetro (del latín nanus, enano) significa la milmillonésima parte de 1 metro. Lo más interesante de la nanotecnología no es la posibilidad de trabajar con materiales de reducidas dimensiones, sino el cambio a menudo radical que sufren las propiedades físicas y químicas de la materia cuando se trabaja a esta escala: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia o la elasticidad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hace el material volumétrico.

Figura 1. Las medidas de la nanotecnología. (Lechuga, 2011).



Por ello, la nanotecnología tiene gran aplicación en diferentes campos, entre los que destacan los materiales, la electrónica, la medicina y la energía. Se han alcanzado ya avances significativos en la fabricación de materiales de mayor dureza y resistencia, ordenadores más veloces y con mayor capacidad de procesamiento gracias a los microprocesadores con componentes nanotecnológicos, diagnósticos médicos más eficaces o la obtención de energía a bajo coste y respetuosa con el medio ambiente. Ya existen multitud de productos «nanotecnológicos» en el mercado, como cosméticos más eficaces y protectores, raquetas de tenis más flexibles y resistentes, gafas que no se rayan, ropa que no se arruga ni se mancha, por citar algunos ejemplos.

La irrupción de la nanotecnología en las ciencias de la salud ha dado lugar a una nueva disciplina denominada nanomedicina, cuyo objetivo principal es el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades cuando están todavía en estados poco avanzados o en el inicio de su desarrollo. La nanomedicina estudia interacciones a nanoescala y para ello utiliza dispositivos, sistemas y tecnologías que incluyen nanoestructuras capaces de interactuar a escala molecular y que se interconectan a nivel micro para interactuar en el nivel celular. Uno de los grandes retos en este proceso reside en el desarrollo de «nanoterapias», dirigidas específicamente a los tejidos y órganos enfermos, evitando dañar a las células sanas circundantes y, por tanto, evitando los temidos efectos secundarios de los tratamientos actuales.

En los orígenes de la nanotecnología se llegó a predecir la fabricación de «nanorobots», que se inyectarían directamente y atacarían selectivamente los tejidos dañados, incluso protegiendo de ataques externos y reparando posibles desperfectos. A pesar de que esto sigue siendo ciencia ficción, sí se puede afirmar que se ha avanzado notablemente en el diseño de nanoestructuras que incorporan distintas funcionalidades y pueden desempeñar un papel muy similar.

El progresivo aumento que se observa de graves dolencias como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, o las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, para las que no existen tratamientos definitivos, hacen necesarios nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos más rápidos, eficaces y específicos que los actuales y que además reduzcan al máximo los costes implicados.

La nanomedicina promete resolver algunos de estos grandes retos mediante la capacidad de detectar de forma precoz la presencia de enfermedades como el cáncer o la capacidad de regenerar los órganos y tejidos que estén dañados dentro del organismo proporcionando un diagnóstico precoz, una terapia adecuada y un seguimiento posterior efectivo de la evolución del paciente. En un futuro próximo se podrá incluso disponer de tratamientos individualizados a distancia en el propio hogar o lugar de trabajo del paciente.

La nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos (nanoterapia) y la medicina regenerativa. El nanodiagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles tanto in vivo como in vitro. La nanoterapia pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios. La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas.

Dado que es imposible abarcar con profundidad todas las tecnologías que pueden surgir de conceptos basados en nanomateriales y nanodispositivos, se han seleccionado para esta revisión algunos ejemplos clave de avances conseguidos en las dos primeras líneas principales de la nanomedicina, haciendo especial hincapié en el área de la nanoterapia por hipertermia.

2. NANOPARTÍCULAS ORIENTADAS AL DIAGNÓSTICO

El objetivo del nanodiagnóstico es la identificación de enfermedades en sus estadios iniciales en el nivel celular o molecular e, idealmente, al nivel de una sola célula, mediante la utilización de nanodispositivos y sistemas de contraste. Una identificación temprana permitiría una rápida capacidad de respuesta y la inmediata aplicación del tratamiento adecuado, ofreciendo así mayores posibilidades de curación.

Los nanosistemas de diagnóstico se pueden utilizar *in vitro* o *in vivo*. El diagnóstico *in vivo* normalmente requiere que los dispositivos puedan penetrar en el cuerpo humano para identificar e idealmente cuantificar la presencia de un determinado patógeno o de células cancerígenas, por ejemplo. Esto conlleva una serie de problemas asociados con la biocompatibilidad del material del dispositivo, pero además requiere de un sofisticado diseño para asegurar su eficacia y minimizar los posibles efectos secundarios. Por su parte, el diagnóstico *in vitro* ofrece una mayor flexibilidad de diseño, ya que se puede aplicar a muestras muy reducidas de fluidos corporales o de tejidos, a partir de los cuales se puede llevar a cabo una detección específica (de patógenos o defectos genéticos, p. ej.) en tiempos muy cortos, con gran precisión y sensibilidad. Debido a estas diferencias fundamentales, se prevé que la detección *in vitro* usando nanodispositivos llegue al mercado de una forma mucho más rápida y se pueda consolidar más fácilmente que los métodos *in vivo*.

Dentro del nanodiagnóstico, dos son las principales áreas de trabajo: los nanosistemas de imagen y los nanobiosensores, dispositivos capaces de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad y selectividad agentes químicos y biológicos. Los principales sistemas de nanodiagnóstico dentro de estas dos grandes áreas se recogen en la **Tabla**

1.

Principales sistemas de nanodiagnósticos

Diagnóstico por imagen

- Resonancia magnética nuclear
- Espectroscopia y fluorescencia
- Microscopios de campo próximo (AFM, STM)
- Microscopia y tomografía electrónica
- Marcadores y agentes de contraste
 - Puntos cuánticos
 - Nanopartículas magnéticas
 - Nanopartículas metálicas

Dispositivos de nanodiagnóstico

- Nanobiosensores
- Biochips genómicos y proteómicos
- Lab-on-a-chip

Tabla 1. Resumen de los sistemas de nanodiagnósticos más desarrollados. (Lechuga, 2011).

2.1. NANOSISTEMAS DE IMAGEN

Estos sistemas se basan en el uso de nanopartículas, generalmente, semiconductoras, metálicas o magnéticas, como agentes de contraste para marcaje in vivo. Estos nuevos sistemas permiten aumentar la sensibilidad y dan mayor contraste en las técnicas de imagen.

Uno de los primeros sistemas de nanopartículas que se han propuesto para marcaje celular e identificación de zonas dañadas o tumores son las nanopartículas de semiconductores, también conocidas como «puntos cuánticos» (quantum dots).

Cuando el tamaño de estos semiconductores se reduce a unos pocos nanómetros (típicamente entre 1 y 10 nm), se produce una modificación de su estructura electrónica, de tal manera que se pierde la característica estructura de bandas y surgen niveles electrónicos discretos. Esta nueva estructura electrónica les confiere una respuesta óptica (fluorescencia, en particular) que varía con el tamaño. Por lo tanto, se pueden fabricar puntos cuánticos del mismo material que emiten luz en diferentes longitudes de onda (con distintos colores) dependiendo de su tamaño, por lo que son extremadamente útiles como marcadores biológicos (**Figura 2**).

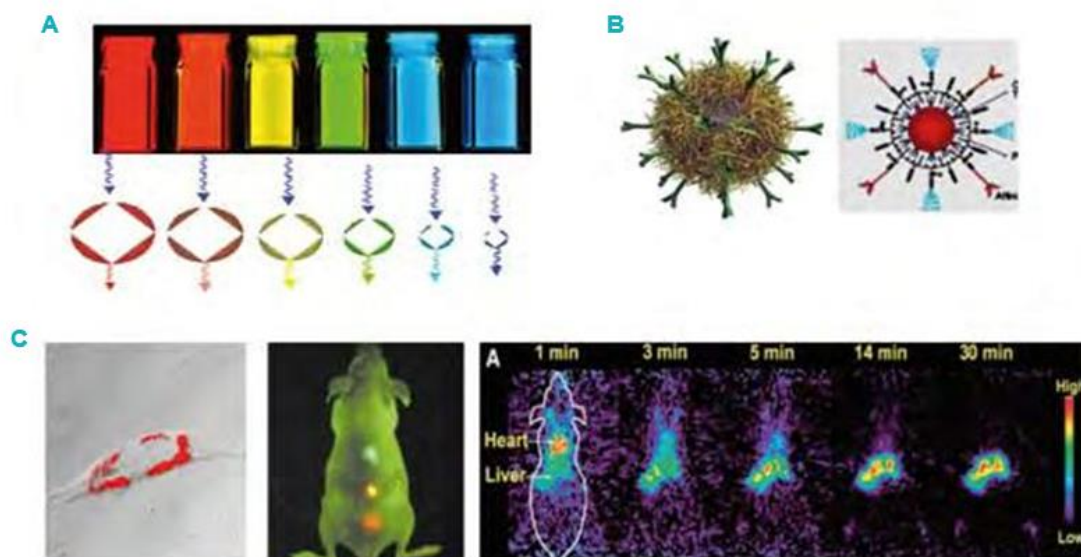


Figura 2. A) Disoluciones de puntos cuánticos de distintos tamaños, con color de fluorescencia característico para cada tamaño. B) Esquema de funcionamiento de un punto cuántico. C) Imágenes de experimentos en los que se han inyectado puntos cuánticos y cómo se acumulan en células u órganos dañados. (Lechuga, 2011).

De entre la gran variedad de materiales que se han estudiado, los semiconductores más utilizados son los de CdSe y CdTe, ya que se pueden producir en grandes cantidades mediante procesos químicos, con un excelente control del tamaño, lo que permite obtener bandas de emisión estrechas e intensas en una amplia variedad de colores y con un tiempo de vida muy prolongado. Todas estas características, a las que se puede añadir que la excitación de puntos cuánticos de distintos tamaños se puede realizar con una única lámpara (permitiendo así realizar marcajes múltiples de forma simultánea), han promovido su desarrollo como competencia a los marcadores moleculares habituales. Existen ya múltiples demostraciones de la utilidad de los puntos cuánticos para la localización de pequeños tumores, lo cual significa que se podría proceder a su extirpación inmediata. En la **Figura 2** se muestran algunos ejemplos.

Sin embargo, el diseño de los puntos cuánticos, al igual que otros sistemas de nanopartículas, es bastante más complicado. No es suficiente con obtener un material de alta luminiscencia y estabilidad, la nanopartícula también debe llegar a su destino de forma selectiva e, idealmente, debe eliminarse del organismo una vez realizada su función para evitar efectos secundarios. Uno de los problemas a resolver es la captación de las nanopartículas por los macrófagos antes de alcanzar la zona afectada. Para ello es necesario recubrir las nanopartículas con materiales que actúen como una capa de invisibilidad, p. ej., con polímeros como el polietilenglicol (PEG). Este proceso es conocido como “pegilación”. Una vez resuelto este problema, es preciso indicarles cómo localizar el tumor, y para ello hay que recubrir su superficie con biomoléculas (biorreceptores, como anticuerpos monoclonales) con afinidad selectiva hacia un compuesto específico de la zona a reconocer (p. ej., la célula cancerosa). Así, hay ciertas proteínas o moléculas que se encuentran en mayor proporción en la membrana de las células cancerosas (como los receptores de ácido fólico o la hormona luteinizante) y son características de cada tipo de cáncer. Cuando los puntos cuánticos en función con el biorreceptor específico se acercan a una muestra que contiene dicha proteína, se produce una reacción de reconocimiento biomolecular (**Figura 2**), de forma que se acumularán allí, permitiendo la detección mediante iluminación con luz ultravioleta y observación de la emisión de fluorescencia característica del punto cuántico empleado. La eliminación de las nanopartículas a través del hígado o los riñones parece ser bastante eficiente para los tamaños de los puntos cuánticos, pero

pueden existir problemas ligados a procesos de agregación, que es necesario resolver en algunos casos.

Hasta ahora, los experimentos in vivo con puntos cuánticos se han realizado con animales, pero se prevé que una vez superados los controles de las agencias de salud, se puedan realizar estos ensayos en seres humanos.

Otra posibilidad para los agentes de contraste es emplear nanopartículas metálicas, ya que su frecuencia de resonancia (el color) es muy sensible a su tamaño y a su forma, lo cual permite diseñarlas para que absorban o dispersen luz en la región espectral que interese. Por ejemplo, se pueden fabricar nanopartículas de oro que sean muy eficientes absorbiendo o reflejando luz en el infrarrojo cercano (700-900 nm), donde los tejidos son más transparentes, de forma que es posible diseñar métodos de marcaje celular, en una forma similar a lo que se ha descrito para los puntos cuánticos. Uno de los métodos utilizados se denomina tomografía de coherencia óptica (optical coherence tomography, OCT), y permite obtener mapas tridimensionales de los tejidos y detectar las zonas en las que se han acumulado las nanopartículas.

Otra posibilidad es utilizar nanopartículas magnéticas (típicamente óxidos de hierro como la magnetita) para aumentar el contraste en medidas de resonancia magnética. Estas nanopartículas podrían sustituir a los marcadores actuales de metales pesados, reduciendo su toxicidad. Además, el carácter magnético de estos materiales podría facilitar su transporte a través del organismo mediante la utilización de un campo magnético externo (como un imán).

2.2. NANOBIOSENSORES

Dentro del nanodiagnóstico, los principales dispositivos de análisis que se están desarrollando son los nanobiosensores, dispositivos capaces de detectar en tiempo real, sin necesidad de marcadores fluorescentes o radioactivos y con una alta sensibilidad y selectividad, todo tipo de sustancias químicas y biológicas.

Un biosensor es un dispositivo integrado por un receptor biológico (enzimas, ADN, anticuerpos, etc.) preparado para detectar específicamente una sustancia y un

transductor o sensor, capaz de medir la reacción de reconocimiento biomolecular y traducirla en una señal cuantificable (**Figura 3**).

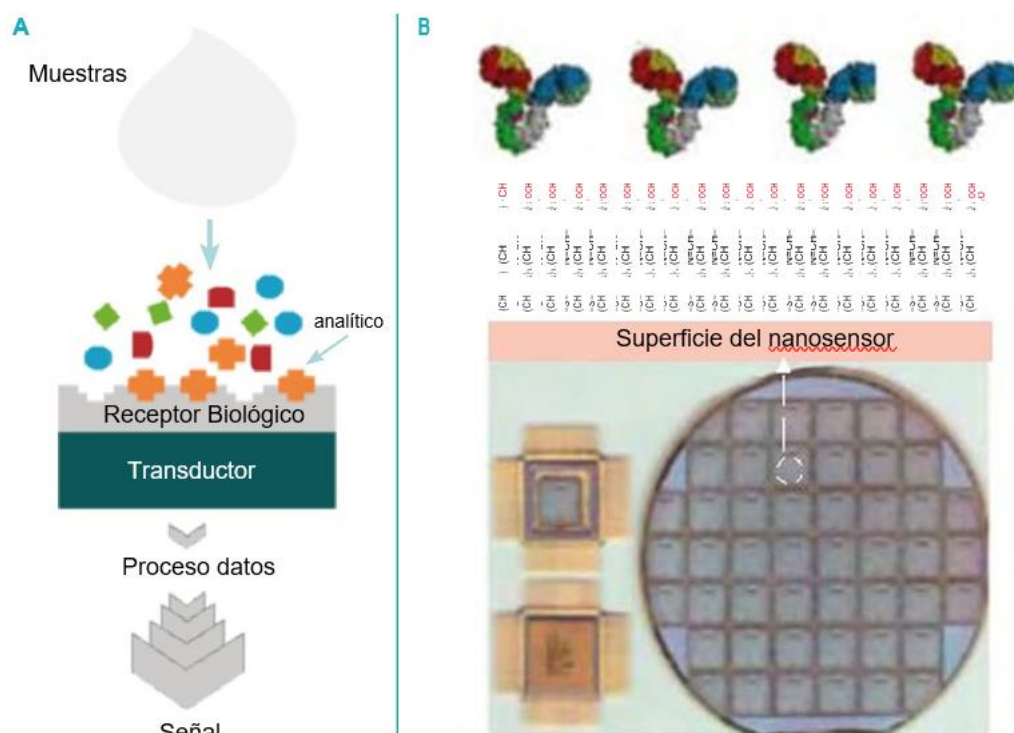


Figura 3. A) Esquema del funcionamiento de un biosensor. B) Fabricación de nanobiosensores con tecnología microelectrónica. El biosensor está formado por un transductor similar a los circuitos integrados de silicio y una capa biorreceptora para el análisis específico. (Lechuga 2011).

Los dos constituyentes del biosensor están integrados conjuntamente y es precisamente esta íntima unión la que le confiere a los dispositivos biosensores sus especiales características de sensibilidad y selectividad. Otra de las características fundamentales que hace atractivos a los biosensores es la posibilidad de realizar el análisis de la sustancia a determinar en tiempo real y de forma directa (sin necesidad de marcador) a diferencia de cualquier análisis biológico o clínico que siempre requiere un marcador (ya sea fluorescente o radioactivo).

Todo ello confiere a los biosensores la posibilidad de realizar no sólo un análisis cualitativo (sí/no) y cuantitativo, sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación, etc.) y, por tanto, elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Las técnicas de análisis

de laboratorio más habituales, ya sea de sustancias químicas o biológicas, suelen ser laboriosas, con-sumen mucho tiempo y en la mayoría de las ocasiones requieren personal especializado para su empleo. Frente a ellas, los biosensores ofrecen la posibilidad de hacer medidas directas, continuas, de forma rápida y con alta sensibilidad.

El término «nanobiosensor» designa a los biosensores cuyas propiedades vienen moduladas por la escala nanotecnológica con la que están fabricados. Los nanobiosensores pueden mostrar una sensibilidad mucho mayor que la de los dispositivos convencionales y además ofrecen las ventajas del pequeño tamaño y la portabilidad, lo que posibilita su utilización en cualquier lugar, como el hogar o la consulta del médico. Con estos nanodispositivos la cantidad de muestra para hacer el análisis es relativamente baja (de micro a nanolitros), lo que significa que los métodos de extracción de muestras de pacientes pueden ser menos invasivos y menos traumáticos. Además, podrían ser fácilmente introducidos en el interior del cuerpo humano, proporcionando datos mucho más fiables del estado de salud real de un paciente.

Dentro de los desarrollos de nanobiosensores son de destacar los nanobiosensores fotónicos, nanoplasmónicos, basados en nanoestructuras (nanopartículas, nanotubos de carbono, nanoalambres, etc.), los biosensores nanomecánicos y los “lab-on-a-chip”.

2.2.1. Biosensores nanofotónicos

Los biosensores nanofotónicos han demostrado un nivel de sensibilidad extremo para la detección directa de proteínas y ADN. En estos sensores (también llamados de onda evanescente) se hace uso de la forma particular en que se transmite la luz en el interior de los circuitos ópticos; esta transmisión tiene lugar a lo largo de la guía óptica mediante múltiples reflexiones internas. A cada reflexión, una componente de la luz, denominada onda evanescente, se propaga en el medio que envuelve a la guía. La longitud de penetración de la onda evanescente es de unos cientos de nanómetros y ofrece una oportunidad única e ideal para medir cualquier interacción biomolecular que tenga lugar en su interior. Con estos sensores es posible evaluar concentraciones

de proteínas en el nivel picomolar o variaciones de una única base en el ADN en tan sólo unos minutos, necesitando volúmenes de muestra del orden de microlitros y, en ocasiones, las muestras a analizar (orina, suero) no necesitan un pretratamiento previo.

Los nanosensores fotónicos también permiten la medida en el interior de una única célula de su estado metabólico. Para este fin existen nanosensores que consisten en una fibra óptica muy afilada (su extremo final tiene sólo 30-50 nm) lo que le permite penetrar a través de la membrana celular sin causar ningún daño y sin alterar el funcionamiento normal de la célula. La fibra óptica se biofuncionaliza con receptores específicos antes de su introducción. Una vez dentro, la nanosonda puede detectar especies químicas y señalar procesos moleculares en localizaciones específicas del interior de la célula. La detección se realiza a través de la interacción del campo evanescente de la luz que circula por la fibra óptica con la interacción biomolecular, debida al biorreceptor específico anclado en la superficie del extremo final de la fibra. Con esta técnica se abre la posibilidad de identificar cambios patológicos dentro de una célula individual e incrementar el conocimiento sobre las funciones celulares in vivo, como la división celular, la apoptosis, el funcionamiento de las nanomáquinas biológicas, etc.

2.2.2. Biosensores nanoplasmónicos

El biosensor de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) está basado en la variación de reflectividad de una capa metálica en contacto con un medio biológico. El biosensor SPR ha sido ampliamente desarrollado, cientos de publicaciones aparecen cada año en la literatura especializada y numerosas compañías lo comercializan en diferentes versiones. Este sensor permite detectar de forma directa concentraciones en el rango nanomolar de forma directa y sin necesidad de marcadores fluorescentes.

En este sensor se deposita una capa metálica delgada (generalmente una capa de oro de 50 nm de espesor) sobre un material dieléctrico (p. ej., un cristal). Excitando la interfase del metal y el dieléctrico en condiciones de reflexión interna total, se obtiene una resonancia plasmónica para un cierto ángulo de incidencia de la luz, resonancia que se manifiesta en una absorción de la luz y, por tanto, un mínimo agudo en la

intensidad de la luz reflejada. La característica más interesante de este efecto es que el ángulo de resonancia al que se genera la onda plasmónica (de carácter evanescente) es muy sensible a cualquier variación que tenga lugar en la superficie metálica, como puede ser una inmunorreacción o cualquier otro tipo de interacción biomolecular. La interacción se detecta entonces como una variación del ángulo de resonancia. En la **Figura 4** se muestra el esquema de un sensor de SPR y su mecanismo de funcionamiento.

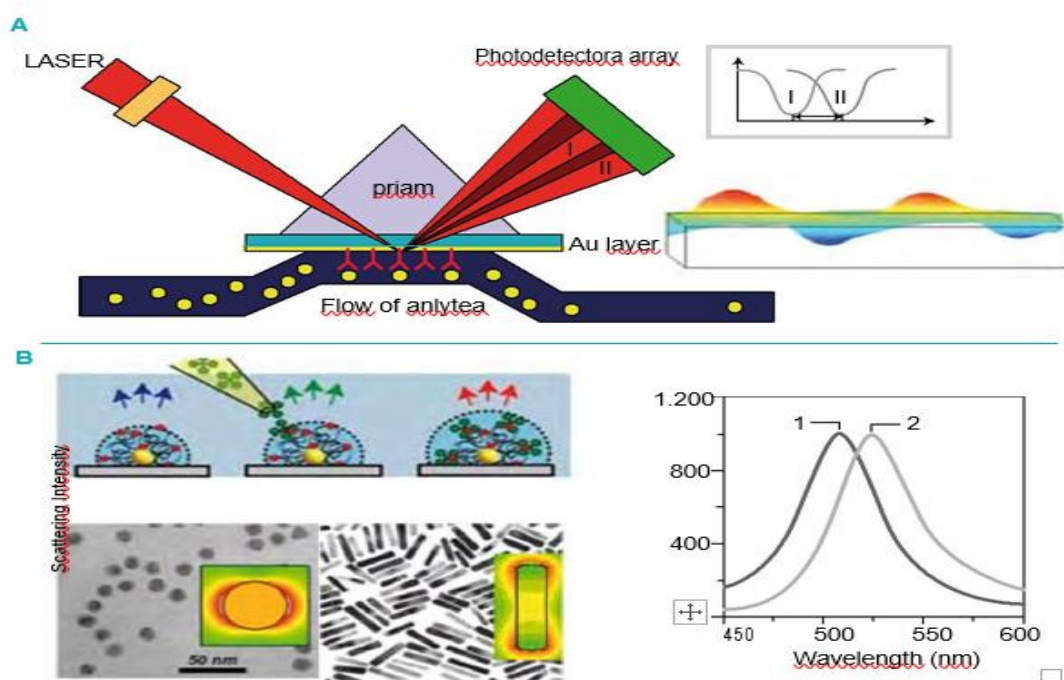


Figura 4. A) Funcionamiento de un biosensor SPR. La interacción biomolecular que tiene lugar sobre el oro se detecta mediante el desplazamiento de la curva plasmónica. B) Fotografías de microscopía electrónica de nanopartículas de oro (esferas y cilindros) y la localización de la resonancia plasmónica. La resonancia varía cuando se colocan los analitos en la superficie. (Lechuga 2011).

Como alternativa, se están desarrollando actualmente biosensores basados en el fenómeno de resonancia de plasmón en nanopartículas. En el caso de éstas, y debido a su pequeño tamaño, la oscilación de los electrones está muy localizada en ciertas zonas de las nanopartículas (ver mapas de intensidad en la **Figura 4**), por lo que el fenómeno se denomina resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR). Tal como se indica en la figura 4, la adsorción de (bio)moléculas sobre las nanopartículas provoca cambios de color, que se pueden emplear para la detección. A pesar de que los límites

de detección podrían ser similares que los obtenidos con los biosensores SPR, el sistema experimental es mucho más sencillo en LSPR, ya que se mide transmisión en lugar de reflexión y además se puede facilitar la miniaturización.

En ambos casos, los dispositivos permiten portabilidad y requieren una cantidad de muestra relativamente baja (de micro a nanolitros) para hacer el análisis y ya se ha demostrado su utilidad en la detección de proteínas en el nivel nanomolar en muestras de pacientes (orina, suero) sin necesidad de pretratarlas o de mutaciones puntuales en las cadenas de ADN sin necesidad de marcadores fluorescentes.

Existen otros métodos de detección que hacen uso del fenómeno de LSPR de una forma diferente. Por ejemplo, se han desarrollado detectores de ADN basados en los cambios de color que se producen debido a la agregación de nanopartículas de oro marcadas con cadenas de ADN complementarias a la que se intenta reconocer.

2.2.3. Biosensores nanomecánicos

Otro tipo de nanobiosensor con grandes perspectivas en nanodiagnóstico son los biosensores nanomecánicos, que emplean como sistema de transducción la deflexión nanométrica de una micropalanca o el desplazamiento de su frecuencia de resonancia al interactuar con el sistema biológico. El cambio en la posición y movimiento de la micropalanca inducido por el reconocimiento molecular ocurre a escala de unos pocos nanómetros, y de aquí deriva el nombre de biosensores «nanomecánicos». La **Figura 5** muestra las imágenes de algunos de estos sensores.

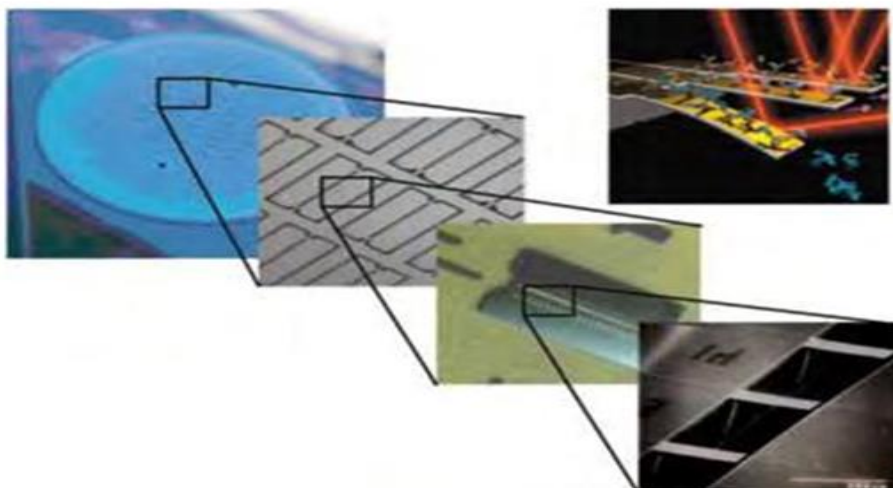


Figura 5. Biosensores nanomecánicos empleados en nanodiagnóstico. Las micropalancas se doblan unos nanómetros cuando tiene lugar una reacción de reconocimiento molecular en su superficie. El nanobiosensor de matrices de micropalancas puede emplearse como biochip de ADN o proteómico según la biofuncionalización. (Lechuga 2011).

Las micropalancas tienen un área sensora muy pequeña (del orden de $1.000 \mu\text{m}^2$), lo que permite el análisis de cantidades de sustancia inferiores al femtomol. Además, se fabrican con tecnología microelectrónica estándar, lo que proporciona producción en masa a bajo coste y permite la fabricación de miles de micropalancas en un mismo proceso, que podrían ser empleadas para la detección simultánea de miles de analitos de la misma muestra.

Desarrollos como los nanosensores fotónicos o los nanomecánicos, fabricados a miles gracias a la tecnología microelectrónica, abren un camino para la fabricación de nanobiochips genómicos y proteómicos, que a diferencia de los actuales biochips, llevan incorporado un sistema de transducción de la interacción (no se necesitarían marcadores fluorescentes), con los que sería posible conseguir en muy poco tiempo una inmensa cantidad de información genética y proteómica que permitirá elaborar vacunas, identificar mutaciones indicativas de enfermedades, identificar nuevos fármacos, identificar patógenos, etc. de forma mucho más rápida que utilizando las tecnologías convencionales.

2.2.4. Sistemas “laboratorio-en-un-chip”

La integración en sistemas «lab-on-a-chip» será otra de las áreas fundamentales de trabajo, que permitirá la descentralización de las medidas. El término «lab-on-a-chip» (o «laboratorio en un chip») describe el desarrollo de plataformas integradas y miniaturizadas donde tienen lugar complejas reacciones químicas y bioquímicas. Estas plataformas se están constituyendo como una tecnología revolucionaria en el sector clínico. Las micro y las nanotecnologías han proporcionado las herramientas necesarias para llevar a cabo esta innovación en el diagnóstico molecular, al permitir la fabricación e integración de micro/nanobiosensores, microcanales, microactuadores, etc. en un mismo chip. El empleo de estos dispositivos aporta las ventajas de rapidez en el análisis, reducido volúmenes de muestra, alto grado de automatización y su carácter portátil y desechable.

Un simple microsistema con nanosensores incorporados podría ofrecer un diagnóstico completo a partir de una gota de sangre mediante la identificación (de otra manera imperceptible) de cambios moleculares; esto implica que los análisis podrían hacerse a domicilio. Cuando se empiecen a reemplazar los caros y lentos análisis de laboratorio por estos análisis de microchips más baratos, rápidos y cómodos, el impacto en organizaciones sanitarias y sus pacientes será muy importante.

Pero, a pesar de estos incipientes desarrollos, todavía queda mucho camino por recorrer y para el futuro, sería deseable contar con nanodispositivos que cumplieran la mayoría de los siguientes requisitos: robusto, barato, posibilidad de multianálisis, detección a niveles de pico/femtomolar o incluso en el nivel de una sola molécula, rápidos y directos, portátiles, de fácil manejo por parte de personal no especializado, de multiuso o suficientemente barato para ser de un único uso.

El trabajo futuro se encamina tanto al desarrollo de nuevas estrategias de inmovilización y de protección, para permitir nanobiosensores completamente reversibles y regenerables y que puedan funcionar in situ en muestras complejas (como es la sangre) y que sean biocompatibles para ser implantados in vivo. La inclusión de los nanodispositivos en el interior del cuerpo preservando su funcionalidad será un logro paradigmático en nanodiagnóstico. Los nanobiosensores implantados podrían funcionar como «centinelas» dentro del cuerpo humano y emitir una señal de alarma

ante la aparición de las primeras células enfermas. Ya se han obtenido pequeños avances (a nivel micro), como píldoras con cámaras de imagen que pueden tragarse, sensores que pueden realizar medidas in vivo durante operaciones, etc. Está será sin duda una de las grandes áreas de trabajo de la nanomedicina en los años venideros. La **Figura 6** recoge una visión del empleo futuro de los dispositivos nanobiosensores.



Figura 6. Futuro de la utilización de nanobiosensores como sistemas de nanodiagnóstico. Adaptado de General Electric por (Lechuga, 2011).

3. NANOPARTÍCULAS ORIENTADAS A LA TERAPÉUTICA

El otro campo genérico de las nanopartículas en medicina es su aplicación a la terapéutica. Es especialmente relevante su potencial utilidad el campo de la medicina oncológica debido a sus particulares propiedades físico-químicas que podrían hacer posible dirigir las específicamente a los tejidos tumorales y bien transportar y liberar en ellas un fármaco quimioterápico o bien utilizarlas directamente como tratamiento una vez acumuladas selectivamente en el tejido enfermo. Con este último enfoque, los intentos más prometedores y que han cobrado más auge en oncoterapia se basan en crear una hipertermia localizada al someter las nanopartículas magnéticas a un campo magnético alterno. Sea cual fuere la forma, el objetivo final será crear una terapia dirigida con efectos secundarios mínimos o nulos en los tejidos sanos circundantes al tumor, así como tratar las micrometástasis que aún no sean detectables por los medios habituales de imagen.

3.1. SELECTIVIDAD DEL DEPÓSITO

La focalización de las nanopartículas magnéticas, en su acrónimo inglés “magnetic nanoparticles” (MNS), en los tejidos tumorales localizados es crítica tanto para el diagnóstico de imagen como para la terapéutica. Dado que la unión no específica a las células puede poner el tejido sano en riesgo, las MNS han sido diseñadas para acumularse en los tejidos tumorales a través de enfoques dirigidos pasivos y activos.

3.1.1. La orientación pasiva

La orientación pasiva utiliza las propiedades físico-químicas predeterminadas de las MNS para migrar específicamente a determinados tejidos. El ejemplo más común de orientación pasiva se da gracias a la permeabilidad y el efecto de retención (EPR) por los cuales las MNS menores que 200 nm se pueden acumular pasivamente en muchos tejidos tumorales sólidos. La vasculatura comprometida de un tumor sólido facilita pasiva MNS extravasación de la circulación en el intersticio del tumor (**Figura 7**).

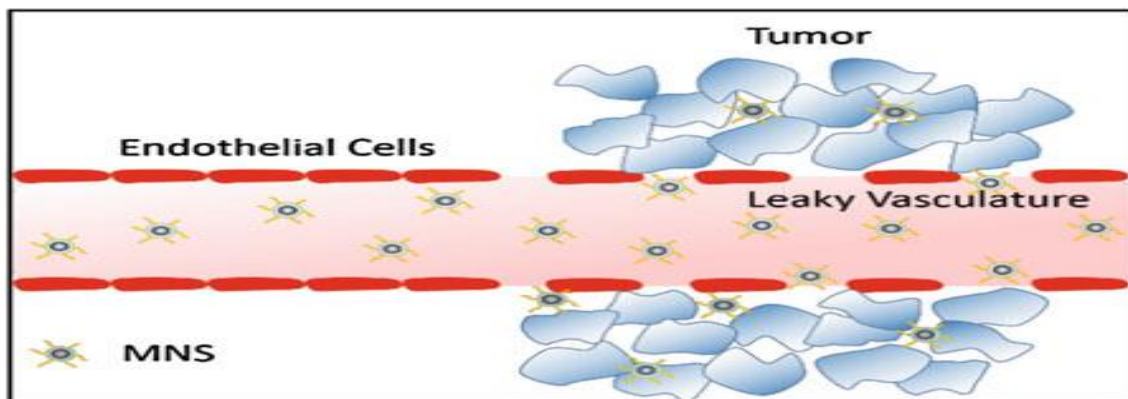


Figura 7. Orientación pasiva de las MNS debido a una mayor permeabilidad y efecto de retención (EPR). La vasculatura comprometida de un tumor sólido facilita la extravasación de las MNS de tamaño inferior a 200 nm de la circulación al intersticio del tumor, mientras que en el tejido sano las células endoteliales están estrechamente empaquetadas y presentan una barrera que impide la penetración de MNS. (Nandwana et al., 2015)

Por el contrario, las células endoteliales de los vasos normales del tejido sano están estrechamente empaquetadas y presentan una barrera que impide la penetración de las MNS. Sin embargo, la orientación pasiva se limita a tumores específicos ya que el éxito de efecto EPR depende de una serie de factores tales como la tasa de drenaje linfático, el grado de trastorno capilar, y el flujo sanguíneo que varía en diferentes tipos de tumores.

3.1.2. La orientación activa con agentes de direccionamiento

Debido a que la orientación pasiva está disponible sólo para ciertos tipos de tumores y no necesariamente garantiza la internalización de las MNS en las células diana, se pueden modificar las MNS con antígenos tumorales selectivos para orientarlas activamente. Estos antígenos son complementarios a los receptores únicos propios de las células tumorales o a antígenos que se sobreexpresan en ellas. Se han utilizado una gran variedad de antígenos para direccionar las MNS, dependiendo del objetivo específico. Algunos de los estudios incluyen: pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, proteínas y los anticuerpos. La densidad y la organización molecular de estos ligandos influyen significativamente en la unión de las MNS a las células diana debido a un fenómeno de multivalencia. Algunos de los antígenos de direccionamiento pueden

utilizarse para facilitar la internalización de las MNS en las células, principalmente a través de endocitosis. Sin embargo, la síntesis de estos antígenos de direccionamiento es costosa e implica una química compleja. Por lo tanto, el proceso de generalización de esta síntesis es un reto y puede ser un obstáculo para el desarrollo de aplicaciones clínicas.

3.1.3. Orientación activa mediante un campo magnético externo

La acumulación de las MNS se puede realizar mediante la aplicación de un campo magnético externo en el sitio diana, una característica única para las MNS.

La orientación magnética se ha estudiado para una serie de modelos de tumores. Esta técnica se aplicó con éxito en un ensayo clínico para entregar un quimioterapéutico, la doxorubicina, a las células de un hepatocarcinoma. (Chertok et al., 2010) han explorado la orientación magnética de tumores cerebrales mediante MNS conjugadas con polietilenimina (PEI). Aunque exitosa, la eficacia de la orientación magnética por el momento se limita al tejido diana que está cerca de la superficie del cuerpo, ya que la intensidad del campo magnético disminuye con la distancia desde la fuente magnética.

3.2. VEHICULIZACIÓN DE FÁRMACOS

La nanomedicina se ha propuesto como una posible solución para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos. La idea consiste en utilizar nanoestructuras que transporten el fármaco hasta la zona dañada y, solamente cuando han reconocido esa zona, lo liberen como respuesta a un cierto estímulo. Para ello es necesaria la previa encapsulación o desactivación de los fármacos para que no actúen durante su tránsito por el cuerpo hasta llegar al lugar afectado, de forma que mantengan intactas sus propiedades físico-químicas y que se minimicen posibles efectos secundarios en otras zonas del cuerpo. Una vez que el fármaco ha llegado a su destino, debe liberarse a una velocidad apropiada para que sea efectivo, lo cual se puede hacer mediante una variación de ciertas condiciones (pH o temperatura, p. ej.) en la zona dañada, o mediante un control preciso de la velocidad de degradación del material encapsulante, permitiendo que la liberación del fármaco sea controlada.

Para la administración de fármacos se ha propuesto una gran variedad de nanoestructuras, como nanopartículas, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas, nanotubos, conjugados poliméricos, microgeles, etc. (**Figura 8**).

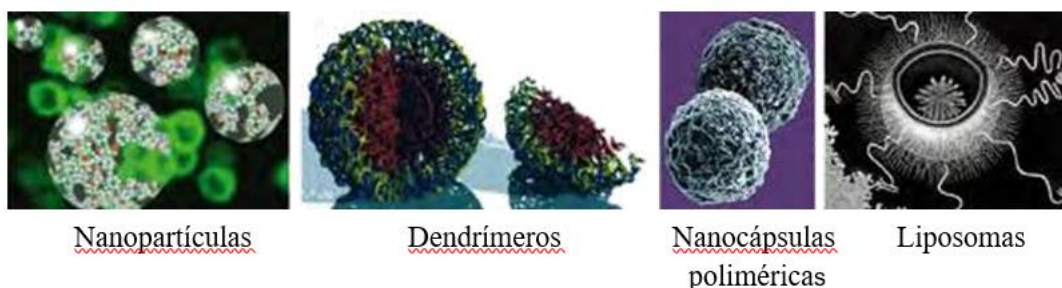


Figura 8. Diferentes tipos de nanosistemas que pueden emplearse en la dosificación de fármacos. (Lechuga, 2011).

La nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que estos nanosistemas pueden atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja es que la efectividad del medicamento se ve incrementada mediante el control preciso de la dosis requerida y del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto.

3.3. HIPERTERMIA MEDIANTE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La hipertermia es la exposición durante un periodo de tiempo de un tejido enfermo a temperaturas elevadas, típicamente se intenta buscar temperaturas entre los 41°C y 46°C. Ha sido considerada durante mucho tiempo como un tratamiento prometedor para el cáncer y otras enfermedades. Se sabe que las células son susceptibles al daño por calor ya que como energía que es, interrumpe las vías celulares, especialmente a través de sus efectos sobre la estructura y la función de las proteínas. Dependiendo de la dosis térmica, definida como "tiempo-a-temperatura", la hipertermia induce una respuesta de choque térmico en las células, lo que les lleva a la muerte celular a través de una serie de cambios bioquímicos dentro de la célula. El calor también aumenta los efectos terapéuticos de los agentes contra el cáncer tales como la radiación ionizante, a menudo produciendo una citotoxicidad combinada que es significativamente mayor que la que surge de cualquier agente por sí solo. Se ha observado que el calor inhibe la reparación del daño de ADN, las células no pueden recuperarse de los efectos de la

radiación ionizante y culminan en muerte celular o senescencia. Además, la fisiología aberrante del tumor proporciona una ventaja para la hipertermia como tratamiento eficaz del cáncer. Los tumores normalmente poseen una estructura de tejido más heterogénea que sus tejidos vecinos normales, debido al crecimiento menos regulado o no regulado. También a menudo muestran una vascularización caótica, una alta presión del fluido intersticial, depósitos significativos de estroma denso y fibroso, y regiones privadas crónicamente de oxígeno (hipoxia). Todas las cuales contribuyen a la resistencia a las terapias estándar. La hipertermia aminora estos efectos mediante el aumento de la perfusión de sangre y la modificación de la estructura del tejido, con lo que mejora la eficacia de la terapia al permitir una mejor penetración de los agentes terapéuticos.

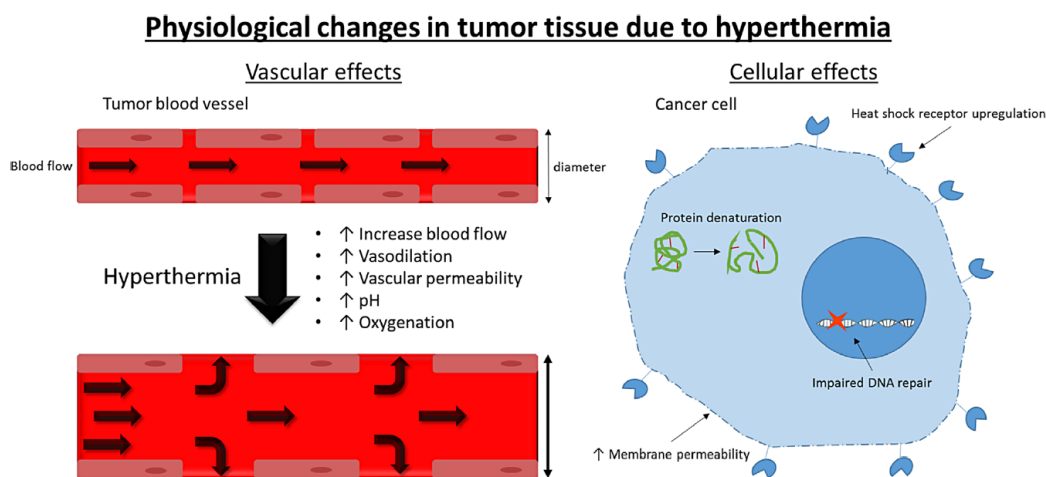


Figura 9. Efectos vasculares y celulares de la hipertermia en el tejido tumoral calentado. Los efectos vasculares incluyen la vasodilatación, el consecuente aumento de flujo sanguíneo y la separación de las células endoteliales de los vasos tumorales ya de por sí habitualmente más fenestrados. (Franzier et al., 2015).

La aplicación clínica de la hipertermia requiere poder dirigirla selectivamente al tumor con una dosis eficaz para provocar una respuesta medible. El motivo de la entrega selectiva es que la dosis depositada en las células sanas y tejidos cercanos se debe minimizar para evitar efectos secundarios deletéreos. Con los años han ido surgiendo muchas estrategias para dirigir ese calor y producir hipertermia exclusivamente en el tejido tumoral, con éxito variable. Hay dispositivos de energía directos que exponen tejidos a ultrasonido, a fuerzas mecánicas o a energía electromagnética (láser, radio-

frecuencia o microondas) que es absorbida directamente por el tejido creando calor a través de varios mecanismos potenciales dependiendo de la frecuencia de la energía.

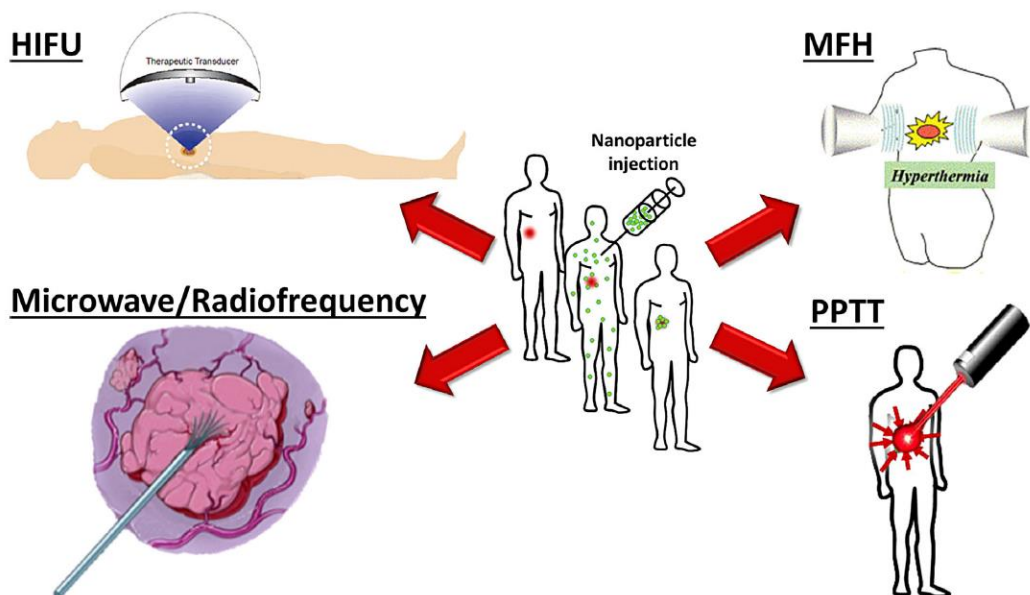


Figura 10. Varios métodos para inducir hipertermia. Leyenda: High-intensity focussed ultrasound (HIFU), magnetic fluid hyperthermia (MFH), microwave/radiofrequency, and plasmonic photothermal therapy (PPTT). (Franzier et al., 2015).

Debido a que la energía debe ser dirigida o enfocada a la región apropiada, los problemas surgen del control específico en el tejido produciendo exceso de tratamiento de algunas zonas y la falta de tratamiento en otras.

Otro enfoque general combina propiedades específicas de los materiales para absorber preferentemente una energía aplicada externamente, convirtiéndola en calor localmente. Tales materiales susceptibles generan calor de manera más eficiente con la energía aplicada que el tejido circundante, y proporcionan un calentamiento local a través de un proceso físico. Los ejemplos incluyen implantes metálicos o "semillas" y materiales magnéticos a escala nanométrica. Específicamente, la hipertermia por nanopartícula magnética (MNH), es una terapia del cáncer por la cual las nanopartículas magnéticas se dirigen de forma sistémica a través de la orientación o mediante inyección directa a un tumor y luego se someten a un campo magnético alterno (AMF). Este método, también conocido como hipertermia magnética de

(MFH) o hipertermia de partículas magnéticas (MPH), fue propuesto por primera vez por Gilchrist en 1957 y es una promesa para producir hipertermia en tejidos concretos, ya que ofrece la posibilidad de un control preciso de la dosis y de la especificidad del tejido. En general, los materiales magnéticos suministran calor por medio de la histéresis cuando son expuestos a un campo magnético alterno (AMF). Dado que el tejido es débilmente diamagnético, no atenúa ni dispersa los campos magnéticos estáticos o de baja frecuencia, lo que permite estrategias de imagen y terapia que utilizan energía magnética. El AMF en las frecuencias de radio, sin embargo, dirige la energía indiscriminadamente a los tejidos a través de calentamiento por efecto Joule por medio de corrientes de Foucault inducidas. La extensión de esta absorción de energía por los tejidos depende de la frecuencia y la magnitud de la AMF. Por lo tanto, si la promesa ofrecida por la combinación de materiales magnéticos con AMF para las terapias a base de calor ha de ser una realidad clínica, se deben superar los retos para proporcionar suficiente material magnético que mediante dicho AMF se localice exclusivamente en la zona de tratamiento para permitir una hipertermia beneficiosa y no perjudicial para el resto de tejidos.

El éxito de la MNH depende del desarrollo de nanopartículas magnéticas que tengan propiedades físicas y magnéticas que puedan ser controladas con precisión. Para optimizar la eficacia de las propiedades de dichas nanopartículas magnéticas para producir hipertermia, es necesario desarrollar una comprensión de los parámetros primarios que producen calor. Por lo tanto, es necesaria una evaluación teórica de los mecanismos responsables del calentamiento por nanopartículas magnéticas para hallar las propiedades magnéticas y estructurales óptimas y adaptar los métodos de síntesis para la frecuencia de un AMF específico y las condiciones de amplitud. Esto proporcionará un rendimiento fiable y la capacidad de predicción de la dosimetría térmica para permitir la planificación del tratamiento y translación clínica. El cálculo del calor disipado por las nanopartículas magnéticas que están sometidas a un AMF está siendo, pues, objeto de una intensa investigación recientemente. Llegamos así al concepto denominado SAR (Specific Absorption Rate o tasa de absorción específica) que se definiría como la cantidad de energía/potencia absorbida por una muestra por unidad de masa [W/kg]. Como la potencia absorbida por el coloide magnético, suponiendo un sistema adiabático, es igual al calor generado por unidad de tiempo, el

SPA (Specific Power Absortion) se puede definir también como la cantidad de energía convertida en calor por unidad de tiempo y de masa. Es por esto que en muchos documentos los términos SAR y SPA se usan indistintamente y son muchos los autores que intentan describir modelos informáticos y métodos para cuantificar esta tasa de absorción específica y controlar de esta forma la temperatura generada para las terapias (Lebrun, 2013) y (Andreu, 2013).

3.3.1. La hipertermia como inductora de necrosis / apoptosis tumoral

Se han producido notables avances en los últimos años en los modelos teóricos que explican los mecanismos de calentamiento de las MNPs cuando se someten a campos magnéticos de corriente alterna. Sin embargo, la aplicación de estos modelos no es sencilla. Una de las razones de esta dificultad es la falta de conocimiento preciso del estado final de las MNPs una vez que entran en la célula, como por ejemplo el grado de aglomeración; el tamaño hidrodinámico, y/o la distribución intracelular final. En la actualidad se ha visto que la idea de que las MNPs entren en las células individualmente durante la captación es una simplificación excesiva, ya que en el medio de cultivo celular la opsonización provoca la aglomeración y por tanto mayores tamaños hidrodinámicos. Afortunadamente, la mayoría de los mecanismos de captación de los diferentes tipos de células son capaces de hacer frente a estos mayores tamaños de agrupación, incluso a tamaños de varias micras.

Debido a la compleja naturaleza de la interacción entre las MNPs y los medios biológicos, todavía hay muchos aspectos de la MFH que quedan por explorar en relación con la forma en que la liberación de la fuente local de las MNPs podría afectar a las estructuras celulares y las vías biológicas in vitro en la MFH. Se acepta que las interacciones de células y nanopartículas están influenciadas por la presencia de proteínas absorbidas a partir de fluidos biológicos en la nanopartícula, pero los efectos de la superficie de las nanopartículas en la adsorción de proteínas aún no se entienden completamente, pregunta que debe ser respondida antes de una comprensión completa de cómo se establece la dinámica de células MNP.

El conocimiento de la distribución intracelular definitiva de las MNPs (antes y después de la MFH) es otra pieza clave para conseguir la comprensión precisa de los mecanismos biológicos implicados. Los estudios detallados en este sentido son escasos, por lo que la cuestión de si las MNPs de captación se incorporan al interior o se unen a las estructuras/orgánulos subcelulares todavía está abierta. Con la creciente literatura sobre diversos sistemas biológicos, se está haciendo evidente que el destino de las MNPs intracelulares dependerá en gran medida tanto de su tipo de formulación como de la línea celular implicada. Los cambios en estos parámetros modifican las propiedades de calentamiento de las MNPs, y aunque se han propuesto algunos modelos, en realidad no hay formulaciones teóricas completas para las propiedades de calentamiento de los cúmulos intracelulares. Debido a que este “efecto in vitro” de agrupación de las MNPs estará presente para prácticamente cualquier experimento basado en células, se ha de ser muy cauteloso cuando se hable de las propiedades de calentamiento de las MNPs intracelulares en términos de sus propiedades como partículas libres en el coloide magnético.

Independientemente de las características detalladas de los mecanismos de calentamiento de las MNPs bajo los campos de corriente alterna, se conocen los efectos de la hipertermia para complementar los de la radio-quimioterapia ya que las células tumorales son sensibilizadas por ella. Desde los primeros estudios sobre el efecto del calor sobre las células en fase S radorresistentes asociado con la inducción de alteraciones cromosómicas, un gran número de experimentos in vitro de hipertermia ha permitido la identificación de la base termodinámica de este proceso. Por ejemplo, respecto a la termodinámica de la progresión de la muerte celular en función de la temperatura, se sabe que el aumento de la temperatura de 1°C requiere una disminución del tiempo de tratamiento por un factor de 2 para un isoeffecto. A partir de esta relación, el valor obtenido de 140 kcal/mol para la energía de activación puede estar relacionado con la desnaturalización de las proteínas como un posible mecanismo en el daño por hipertermia. Dado que los efectos térmicos desempeñan un papel en la hipertermia, se ha propuesto una cuantificación precisa mediante el concepto de “dosis térmica”, como un factor clave para determinar su eficacia. La expresión estándar para la dosis térmica involucrada en protocolos de hipertermia se basa en una relación de equivalencia de tiempo-temperatura para una temperatura de referencia, a saber, el equivalente de

minutos para acumular 43 °C (CEM43). Se han propuesto varios modelos teóricos para el análisis de los experimentos de termoterapia a temperatura leve, incluyendo modelos numéricos avanzados basados en procesos paralelos para analizar el daño térmico, pero aún no hay disponible ningún modelo teórico para describir los parámetros clave que determinan la eficacia de calentamiento para un tipo dado de MNPs cuando se incorporan por una línea celular. Por otra parte, no está claro si un solo modelo podría aplicarse para diferentes tipos de células, o en qué medida la función de las células puede determinar cuáles son los parámetros clave a tener en cuenta. Utilizando un diseño experimental ingenioso para la hipertermia in vitro, (Fortin et al., 2007) primero demostraron que las propiedades magnéticas de las MNPs determinan la eficacia del calentamiento intracelular, y también que la eficacia del calentamiento producido por las MNPs puede ser modificado por el cambio de los parámetros fisicoquímicos del medio intracelular.

La diferencia más significativa entre los datos disponibles sobre la hipertermia in vitro está relacionada con la observación de la falta de efectos térmicos durante algunos de los experimentos: la ausencia de aumento de la temperatura hasta la temperatura umbral requerida para la apoptosis podría implicar que se estén llevando a cabo efectos directos de la radiación de RF en el medio celular. Algunos de estos trabajos en diversas líneas celulares se enumeran en la **Tabla 2** junto con los parámetros de MFH correspondientes en cada caso.

Tabla 2. Resultados de experimentos “in vitro” de inducción de hipertermia mediante nanopartículas magnéticas en diferentes tipos celulares. Tomada de (Goya et al., 2016).

Cell line	T-increase	f (kHz)	H (kA/m)
A549 and MDA-MB-231	Yes	386	6
ECA-109	Yes	110	50–110
Caco-2 and MCF-7	Yes	238	20
MCF-7	Yes	250	N/A
Caco-2	Yes	237	20
BT20	Yes	520	13.2
PC3	Yes	700	24.7
WEHI-164	No	265	26.7
MDA-MB-468 and MCF-7	No	233	37.5
He-La	No	100	11.9
MDA-MB453	No	148	87.5
Dendritic cells	No	260	12.7

En todos los casos, se informó de una inviabilidad celular desde moderada a casi completa de las células previamente cargadas con MNPs y luego expuestas a la MFH. Se deben tener en cuenta dos aspectos; la presencia o ausencia de efectos térmicos y si la muerte celular es necrótica o apoptótica. Algunos autores han descrito una muerte celular necrótica cuando las células se incubaron con MNPs de 12 nm y se expusieron a una MFH (6 kA/m, 386 kHz) durante 30 minutos, consiguiendo unas tasas de mortalidad de células mayores en comparación con los 30 minutos de hipertermia en agua caliente (46°C). Una vez más, las diferencias en la muerte celular cuando se comparan la MFH y la hipertermia en agua caliente se mostraron en las líneas celulares Caco-2 y MCF-7 (Rodríguez-Luccioni et al., 2011), en donde se observó un mecanismo de muerte celular por apoptosis después de la MFH y una reducción significativa de la viabilidad celular por la MFH en comparación con hipertermia en agua caliente.

Basándonos en las diferencias conocidas en las vías metabólicas de las MNPs para los diferentes tipos de células, parece razonable suponer que los mecanismos de muerte celular que participan durante los protocolos de MFH deben depender de la línea celular investigada. También es probable que algunos de los parámetros experimentales, tales como la cantidad de MNPs incorporadas por célula, y la amplitud y la frecuencia de la MFH, podrían desencadenar diferentes mecanismos de muerte celular. Por lo tanto, los intentos de fusionar diferentes datos experimentales para configurar una suerte de “mapa del mecanismo universal de muerte celular” son posiblemente inútiles.

Las diferencias comentadas previamente en los mecanismos de muerte celular que se han observado después de la MFH respecto a la hipertermia por baño de agua caliente, para un mismo tipo de células y condiciones experimentales, sugieren con fuerza que la muerte celular producida por un campo magnético alterno (AMF) no se debe sólo a una cuestión de aumento de la temperatura, sino que podrían estar también presentes diversos mecanismos activados por el AMF, que estuvieran produciendo una vía de muerte celular diferente. Esto es consistente con las observaciones, informadas por varios grupos, de la muerte celular medible, después de los tratamientos de AMF, sin observar ningún aumento de temperatura macroscópica. Por ejemplo, (Villanueva et

al., 2010) han demostrado que los experimentos con MFH en células HeLa utilizando las MNPs basadas en perovskita, han tenido como resultado la muerte celular por apoptosis después de 30 minutos de la AMF ($f \frac{1}{4}$ de 100 kHz, $H \frac{1}{4}$ 15 mT) antes de que se observara un aumento de la temperatura en el medio de cultivo de menos de $0,5^{\circ}\text{C}$. También, exposiciones más largas a un AMF (es decir, hasta 2 horas a $37,5 \text{ kA} / \text{m}$, 233 kHz) resultó en una reducción significativa de la viabilidad celular (99%) para MDA-MB-468 y las células MCF-7 cargadas con material magnético sin aumento de la temperatura perceptible.

Los experimentos en células de la línea WEHI-164 (Jadhav et al., 2013) cargadas con MNPs basadas en magnetita expuestas a un AMF (265 kHz, $26 \text{ kA} / \text{m}$) durante 10 min, han demostrado una disminución de la viabilidad celular con un aumento de temperatura de solamente $5,5^{\circ}\text{C}$ a partir del valor inicial (28°C) del medio de cultivo. Resultados similares han sido reportados en las células dendríticas cargadas magnéticamente (DC) cuando se someten a un AMF (260 kHz y $12,7 \text{ kA} / \text{m}$) durante 15 min; en este caso se observó casi el 100% de muerte celular con solamente un aumento de temperatura de uno o dos grados del cultivo celular. Por otra parte, la cantidad de muerte celular podría ser controlada cambiando o bien la amplitud o el tiempo de aplicación del AMF. Curiosamente, se demostró que la toxicidad del sobrenadante de las células expuestas al AMF tenía el potencial de matar las células de control (véase la **Figura 11**).

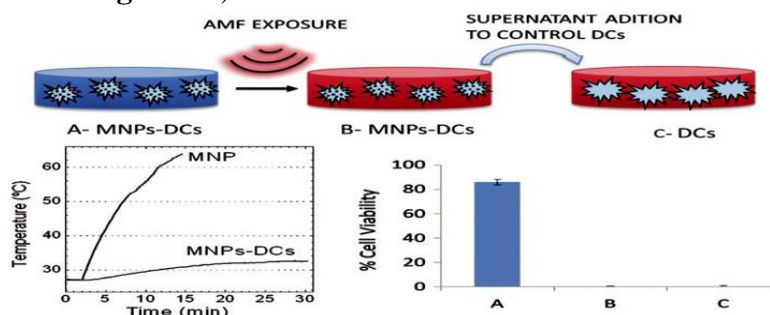


Figura 11. Dibujo del experimento propuesto para probar la toxicidad de los sobrenadantes de cultivo de células cargadas con NPs después de la exposición a un AMF. La muestra A fue sometida a AMF y el sobrenadante de las células tratadas (muestra B) se recogió. La muestra C consistía en células viables sin ningún tipo de contacto con las nanopartículas magnéticas o AMF que recibieron los sobrenadantes de las muestras B y se incubaron 30 min. Panel inferior izquierdo: Aumento de la temperatura observada para (MNP) y para un cultivo de células magnéticamente cargado (NPM - DC) bajo el mismo AMF. Panel inferior derecho: La viabilidad celular medida en cada grupo 15 minutos después de la aplicación de la AMF. (Goya et al., 2016).

Para explicar estos resultados, se propuso que las MNPs confinadas en las vesículas/lisosomas endocíticos pueden provocar la ruptura de las membranas de dichas vesículas durante la exposición al AMF, liberando su contenido tóxico a la región citoplasmática y desencadenando la muerte celular.

También se ha visto que se pudieron estar produciendo efectos no térmicos cuando los tejidos implicados en fracturas o heridas fueron sometidos a campos electromagnéticos alternos de baja frecuencia.

Los mecanismos por los que estas ondas de RF mejoran la respuesta de las células parecen estar relacionados con las vías de señalización CaM dependientes del óxido nítrico. En una serie de meticulosos experimentos en condrocitos articulares humanos, (Pilla et al., 2011) demostraron que un pulso de RF de baja frecuencia puede ser diseñado y configurado como un disparador no térmico para actuar como primer mensajero en las vías de señalización dependientes de CaM, incluyendo al NO y a los nucleótidos cíclicos relevantes para el crecimiento, reparación y mantenimiento del tejido.

Dentro de un marco experimental diferente, también se han reportado efectos no térmicos del AMF a baja/media frecuencia para afectar a la integridad de la membrana celular en células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-453. Usando grandes amplitudes del AMF ($f \approx 148$ kHz, $H \approx 87,5$ kA / m), (Thomas et al., 2011) demostraron que las MNPs delimitadas por células pueden producir un modesto aumento en la permeabilidad de la membrana celular por mecanismos no térmicos. Sin embargo, los resultados posteriores del mismo grupo (Thomas et al. 2013), utilizando células de cáncer de próstata DU145, revelaron que cuando estas células, que tienen hasta 199 pg (Fe)/célula, fueron sometidas al AMF, el calentamiento observado de hasta aproximadamente 43°C aumentaba consecuentemente con lo esperado a partir de un modelo de difusión de calor de medios continuos. Sin embargo, un modelo de material continuo parece demasiado ingenuo para dar cuenta de la complejidad de la respuesta de las células. Por ejemplo, se han sugerido cambios en la fluidez de la membrana celular debido a la hipertermia para desencadenar una respuesta de estrés que podría influir en la respuesta de choque térmico y por lo tanto en la

termorresistencia de las células tumorales, lo que afectaría sinérgicamente a la eficacia de las terapias contra el cáncer.

Una posible explicación para los resultados discutidos anteriormente se basa en un mecanismo no térmico propuesto recientemente por (Carrey et al., 2013). Este grupo ha demostrado teóricamente que las MNPs pueden generar ondas de ultrasonido cuando se someten a un AMF, siempre que se cumplan algunas condiciones generales.

Si se corrobora experimentalmente, la producción de ondas de ultrasonido de las MNPs bajo un AMF podría abrir nuevas posibilidades a las aplicaciones terapéuticas basadas en este nuevo paradigma.

La esencia de los resultados experimentales descritos anteriormente sugiere que, para un determinado tipo de células y condiciones experimentales, la aplicación de un AMF podría activar tanto mecanismos térmicos como no térmicos. Aunque aún no identificadas, parece plausible que las condiciones experimentales que producen uno y otro proceso dependerían del tipo celular. Para aquellas células que tienen la capacidad de incorporar grandes cantidades de MNPs, es probable que los efectos térmicos se observen según los mecanismos de difusión de calor clásicos. Por otra parte, como las MNPs son capaces de afectar a las membranas celulares por las que están delimitadas, esto podría dar lugar a mecanismos de muerte celular no térmicos a través de la interrupción de las vías vitales de la red metabólica celular.

Como observación final, es interesante mencionar que las aplicaciones in vivo de estos mecanismos podrían tener un profundo impacto en la nanomedicina. Tal concepto revolucionario respecto a los protocolos clínicos actuales probablemente se base en el diseño de nuevos nanomateriales diseñados específicamente según las características de las células y tejidos diana.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu, I., & Natividad, E. (2013). Accuracy of available methods for quantifying the heat power generation of nanoparticles for magnetic hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 739-751.
2. Bae, K. H., Chung, H. J., & Park, T. G. (2011). Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Molecules and cells*, 31(4), 295-302.
3. Chertok, B., David, A. E., & Yang, V. C. (2010). Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials*, 31(24), 6317-6324.
4. Dennis, C. L., & Ivkov, R. (2013). Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 715-729.
5. Dutz, S., & Hergt, R. (2013). Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 790-800.
6. Fortin, J. P., Wilhelm, C., Servais, J., Ménager, C., Bacri, J. C., & Gazeau, F. (2007). Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9), 2628-2635.
7. Frazier, N., & Ghandehari, H. (2015). Hyperthermia approaches for enhanced delivery of nanomedicines to solid tumors. *Biotechnology and bioengineering*, 112(10), 1967-1983.
8. Goya, G. F., Asín, L., & Ibarra, M. R. (2013). Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: Current state and perspectives. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 810-818.
9. Grüttner, C., Müller, K., Teller, J., & Westphal, F. (2013). Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 777-789.
10. Ivkov, R. (2013). Magnetic nanoparticle hyperthermia: A new frontier in biology and medicine?. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 703-705.
11. Kolosnjaj-Tabi, J., Di Corato, R., Lartigue, L., Marangon, I., Guardia, P., Silva, A. K., ... & Decuzzi, P. (2014). Heat-generating iron oxide nanocubes: subtle "destructorators" of the tumoral microenvironment. *ACS nano*, 8(5), 4268-4283.

12. Kozissnik, B., Bohorquez, A. C., Dobson, J., & Rinaldi, C. (2013). Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 706-714.
13. LeBrun, A., Manuchehrabadi, N., Attaluri, A., Wang, F., Ma, R., & Zhu, L. (2013). MicroCT image-generated tumour geometry and SAR distribution for tumour temperature elevation simulations in magnetic nanoparticle hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 730-738.
14. Lechuga LM. (2011). Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnología Aplicada a la Salud Humana*, 9, Edición, 100-102.
15. Nandwana, V., De, M., Chu, S., Jaiswal, M., Rotz, M., Meade, T. J., & Dravid, V. P. (2015). Theranostic Magnetic Nanostructures (MNS) for Cancer. In *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer* (pp. 51-83). Springer International Publishing.
16. Nandwana, V., De, M., Chu, S., Jaiswal, M., Rotz, M., Meade, T. J., & Dravid, V. P. (2015). Theranostic Magnetic Nanostructures (MNS) for Cancer. In *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer* (pp. 51-83). Springer International Publishing.
17. Raouf, M., Cisneros, B. T., Corr, S. J., Palalon, F., Curley, S. A., & Koshkina, N. V. (2013). Tumor selective hyperthermia induced by short-wave capacitively-coupled RF electric-fields. *PloS one*, 8(7), e68506.
18. Ryu, J. H., Koo, H., Sun, I. C., Yuk, S. H., Choi, K., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Tumor-targeting multi-functional nanoparticles for theragnosis: new paradigm for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 64(13), 1447-1458.
19. Salas, G., Veintemillas-Verdaguer, S., & Morales, M. D. P. (2013). Relationship between physico-chemical properties of magnetic fluids and their heating capacity. *International journal of hyperthermia*, 29(8), 768-776.
20. Shubayev, V. I., Pisanic, T. R., & Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 467-477.