

## CAPÍTULO 6

### Los procesos LADME y la nanotecnología

*milia Alberdi, Alan Talevi*

#### Explicaciones para el actual interés en la nanotecnología

La *Nanotecnología* es la tecnología aplicada al control, manipulación, estudio y manufactura de estructuras y dispositivos en la escala nanométrica, es decir, utilizando materiales cuyo tamaño se encuentra, en al menos una dimensión, entre 1 y 1000 nanómetros. Implica la intervención a nivel atómico, molecular y supramolecular para crear y emplear sistemas con características que difieren marcadamente de las propiedades de un mismo material en escalas superiores. Al disminuir el tamaño de un material a la nanoescala, la relación área/volumen aumenta, siendo la superficie expuesta, por lo tanto, muy importante. La gran área superficial permite la manifestación de peculiares fenómenos de superficie. Por otra parte, por debajo de cierto tamaño crítico los materiales manifiestan propiedades ópticas y electrónicas particulares en tanto, a esa escala, las mismas pueden estar dominadas por fenómenos cuánticos. Tales propiedades novedosas posibilitan múltiples e inesperadas aplicaciones de materiales ya conocidos. Por ejemplo, sustancias opacas se vuelven transparentes (cobre); materiales inertes se transforman en catalizadores (platino); materiales estables se transforman en combustibles (aluminio); sólidos se vuelven líquidos a temperatura ambiente (oro); aislantes se vuelven conductores (silicona).

Si bien desde el punto de vista físico el comportamiento diferencial de los nanomateriales se observará hasta aproximadamente tamaños de 100 nm, en un contexto biológico las nuevas propiedades (generalmente vinculadas a la distribución del nanoobjeto en el organismo) pueden mantenerse hasta por lo menos los 200-300 nm. La definición de "nanoobjeto" excluye moléculas cuya estructura no está manipulada en la nanoescala para conseguir nuevas propiedades dependientes de su tamaño.

#### Transporte de fármacos

El desarrollo de medicamentos cuyos principios activos sean transportados de manera selectiva hacia sitios específicos del cuerpo (terapias dirigidas), de manera de maximizar la

seguridad y eficacia del tratamiento, es uno de los grandes desafíos actuales de las Ciencias Farmacéuticas.

Hoy día gran número de fármacos de potencial uso en terapéutica poseen características biofarmacéuticas inadecuadas, las cuáles dificultan su llegada a la biofase en tiempo y forma.

Una estrategia para mejorar las limitaciones intrínsecas de tales activos es el empleo de vehículos o vectores que mejoren sus perfiles biofarmacéutico y farmacocinético, sorteando inconvenientes tales como: escasa solubilidad, inestabilidad fisicoquímica, rápida eliminación, o incapacidad del fármaco de atravesar ciertas barreras biológicas. Adicionalmente, el empleo de vehículos adecuados permitiría limitar la toxicidad inespecífica (*off target*, fuera del blanco molecular) del tratamiento.

Los objetivos anteriores no siempre se consiguen empleando los vehículos y formas farmacéuticas convencionales, planteándose la necesidad de recurrir a otros sistemas innovadores, que denominaremos sistemas de liberación avanzada o de última generación. Debe destacarse que los nanovehículos descritos con posterioridad en el presente capítulo no son los únicos sistemas de liberación avanzada que se han estudiado para la entrega de agentes terapéuticos. Particularmente, podemos mencionar el uso de vectores virales como vehículo para el transporte de agentes terapéuticos de origen biotecnológico (tales como terapias génicas). No obstante, la descripción de tales vectores excede los alcances de este volumen, que se enfocará en vehículos para el transporte y liberación de pequeñas moléculas tipo-fármaco, es decir, de ingredientes farmacéuticos activos convencionales.

## **La nanotecnología y el transporte de fármacos: las posibilidades de la distribución y liberación dirigidas**

Los *nanosistemas* son sistemas transportadores de fármacos en los que el vehículo es un dispositivo de escala nanométrica (nanovehículo).

La expectativa generada en relación al transporte de fármacos empleando la nanotecnología se explica por el hecho de que una vez que el principio activo se encuentra incorporado o conjugado al nanovehículo, su farmacocinética y biodistribución dejarán de depender exclusivamente de su propia estructura molecular, para ser función del tamaño, composición, carga y estructura superficial del nanovehículo.

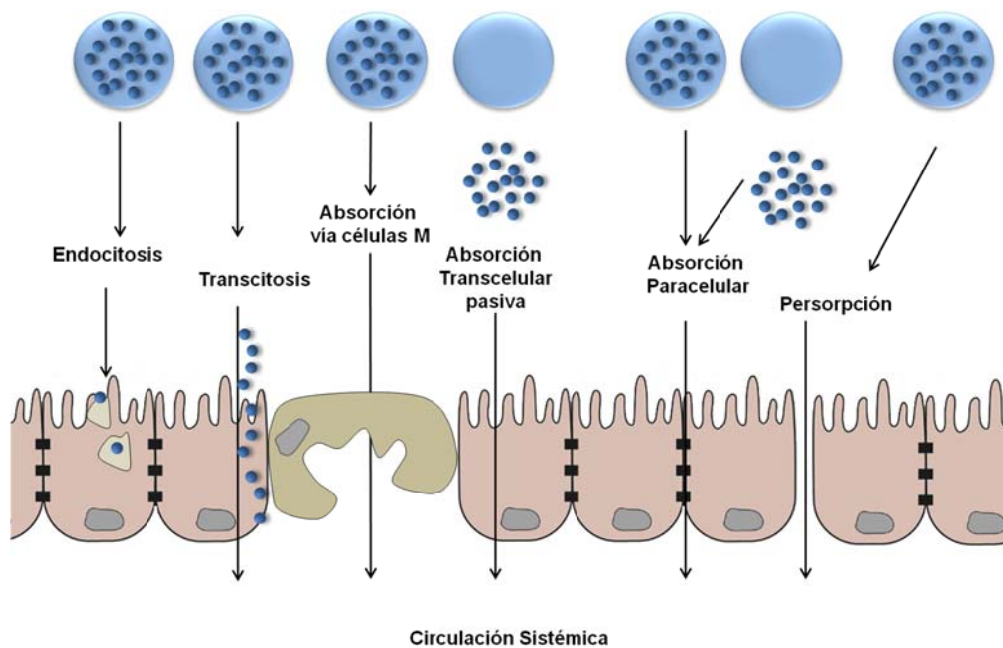
En contacto con un sistema biológico, las propiedades diferenciales de una nanoobjeto no necesariamente se acotarán a la manifestación de fenómenos puramente fisicoquímicos (superficiales o electrónicos), sino que también serán relevantes sus propiedades en relación a los procesos LADME, incluidos su reconocimiento y captura por mecanismos de fagocitosis y pinocitosis celulares y su capacidad para atravesar barreras anatómicas y/o fenomenológicas, como la pared intestinal, la piel o la barrera hematoencefálica.

Cuando se emplean nanotransportadores para administrar un fármaco, el activo puede alcanzar la circulación sistémica en un estado que no es el de fármaco libre. *En otras palabras, la liberación del fármaco desde un nanovehículo podría acontecer luego de su absorción.* En estas circunstancias, y por primera vez en la historia, un vehículo farmacéutico tendría incidencia directa

sobre la distribución y eliminación de un principio activo en el organismo. La nanotecnología abre la posibilidad de trasladar el paradigma tradicional de liberación-absorción-distribución por el de absorción-distribución-liberación. Esto explica que un fármaco incorporado en un nanovehículo pueda ver su perfil farmacocinético completamente modificado.

Debe subrayarse una vez más que los sistemas de liberación convencionales restringían al fármaco a una distribución básicamente inespecífica: para que el ingrediente activo accediese al sitio de acción, todo el organismo era potencialmente expuesto al mismo. Naturalmente, para compensar esta distribución inespecífica el activo debía ser administrado en dosis mucho mayores que las necesarias para el hipotético caso de conseguir una distribución absolutamente específica (en cuyo caso el fármaco sólo estaría presente en la biofase). Más aún, tejidos ajenos al blanco terapéutico se veían expuestos al fármaco, con la consiguiente posibilidad de que se produjeran interacciones inespecíficas. Se desprende que los vehículos tradicionales presentaban limitaciones intrínsecas desde el punto de vista de la toxicidad del tratamiento (eventos inespecíficos) y también desde el punto de vista económico (necesidad de administrar dosis altas para compensar volúmenes de distribución elevados surgidos de la distribución inespecífica).

Como ya se sugirió, además de la posibilidad de lograr una distribución dirigida el uso de nanotransportadores podría permitir la superación de ciertas barreras bioquímicas como por ejemplo los transportadores de eflujo poliespecíficos de la superfamilia ABC. Dicho de otro modo, la incidencia de la nanotecnología en el proceso de distribución no se limita únicamente a la posibilidad de lograr una distribución dirigida específicamente hacia los tejidos blanco del tratamiento, sino que también comprende la posibilidad de superar ciertas barreras biológicas accediendo a tejidos que, anteriormente, estaban vedados para ciertos ingredientes farmacéuticos activos. A continuación discutiremos las características particulares de los procesos LADME para nanovehículos de uso farmacéutico.



**Figura 7.1.** Esquema de diferentes procesos de absorción de fármacos administrados mediante nanovehículos.

## Absorción de fármacos administrados mediante nanovehículos

Las características del proceso de *absorción* de un fármaco incorporado a un nanosistema dependerán de la vía de administración elegida y de las características fisicoquímicas del nanovehículo en cuestión. Al igual que en el caso de formas farmacéuticas convencionales, si el nanosistema se administra por vía intravenosa, no experimentará absorción, pues ya se encontrará en la vía sistémica inmediatamente luego de ser administrado.

Las vías más comúnmente estudiadas para la administración de nanosistemas son: intravenosa, intraperitoneal, intranasal, pulmonar, tópica y, con menor frecuencia, la oral.

Las barreras iniciales que debe atravesar el nano-sistema dependerán de la vía elegida. Por ejemplo, el tamaño suele ser el principal determinante en el caso de nanosistemas dirigidos hacia el tejido pulmonar, mientras que las estrategias para el éxito de la vía oral se concentran en preservar la estabilidad del sistema a lo largo de las condiciones del tracto gastrointestinal.

El complejo fármaco-nanotransportador puede alcanzar la circulación sistémica a través de mecanismos como la transcitosis y la ruta paracelular. En el caso de administración oral, se ha discutido que el nanovehículo podría alcanzar el sistema linfático vía células M (una ruta de absorción poco estudiada hasta el momento) (Figura 7.1).

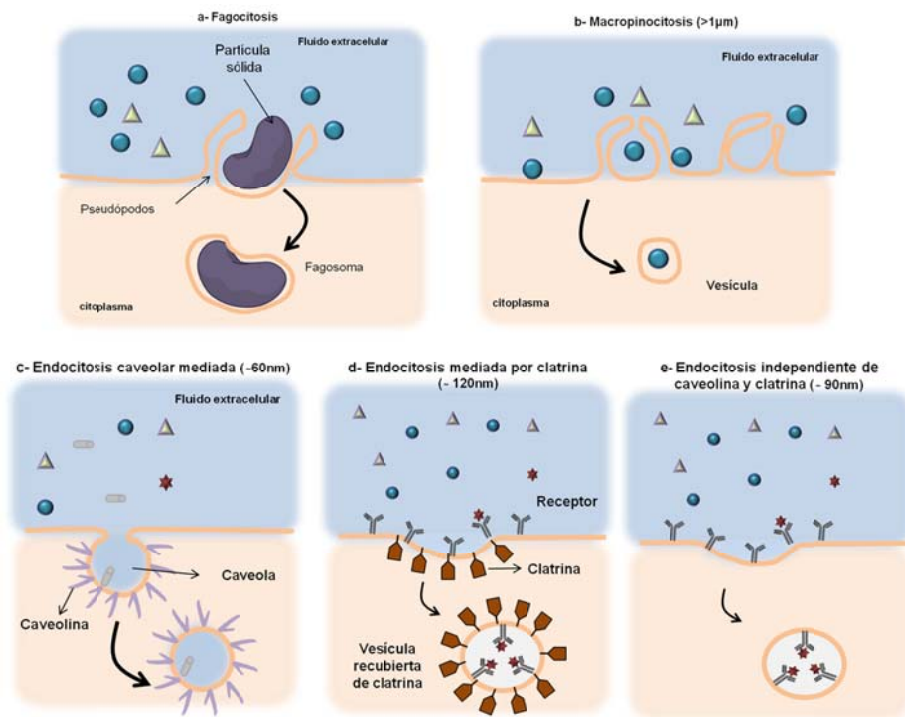
Una vez en contacto con los tejidos biológicos, los nanosistemas podrían interactuar con la membrana plasmática de células y desencadenar su internalización; la *endocitosis* es el mecanismo más frecuentemente postulado para la captación celular del nanovehículo.

Se trata de un proceso biológico altamente conservado a través de las especies y los diferentes tipos de células, por medio del cual éstas internalizan (incluidos en vesículas denominadas *endosomas*) nutrientes y señales de transducción y modulan la composición de la membrana plasmática. Este proceso comienza con la invaginación de la membrana para incorporar el objeto a internalizar, seguido de la “marcación” de esta porción de membrana con proteínas específicas, para conformar el endosoma.

Posteriormente a su endocitosis, los nanomateriales podrán ser transportados hacia diferentes destinos celulares y extracelulares. Cuando el destino del contenido del endosoma es el exterior de la célula hablaremos de transcitosis. Se trata de una combinación de endocitosis y subsecuente exocitosis a través de la membrana contralateral, que será relevante para transportar macromoléculas y otros sistemas de gran tamaño (como los nanovehículos) a través de células polarizadas. Debemos recordar que la vía difusión a través de la membrana celular estará muy restringida para elementos de alto peso molecular; por lo tanto, la transcitosis será un proceso fundamental para que un nanosistema atraviese epitelios y endotelios utilizando la vía transcelular y, por ende, para la absorción y distribución de un fármaco vehiculizado en un nanosistema.

Los nanoobjetos captados por una determinada célula mediante endocitosis podrán estar sujetos a transcitosis y/o alcanzar distintos compartimentos intracelulares tales como lisosomas (donde ocurrirán reacciones de degradación) o diferentes organelas (mitocondrias, aparato de Golgi, etc).

La endocitosis puede ocurrir a través de diferentes mecanismos bioquímicos y morfológicos (Figura 7.2), tales como endocitosis mediada por clatrina, mediada por caveolas, macropinocitosis y endocitosis independiente de caveolas y clatrina, siendo variable la especificidad de cada uno de ellos (es decir, algunos tipos de endocitosis son activados selectivamente por ciertos ligandos). La endocitosis desempeñada por fagocitos profesionales, tales como macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas se denomina fagocitosis. El estudio de las vías endocíticas que intervienen en la internalización celular de nanoobjetos es de suma importancia ya que determinan su destino intracelular, y por ende su eficacia y potencial toxicidad. Es bien aceptado que este proceso es dependiente del tipo celular y de la composición y dosis del nanoobjeto.



**Figura 7.2.** Esquema de los diferentes mecanismos mediante los cuales puede ocurrir endocitosis.

Por último, es fundamental resaltar que las modificaciones superficiales de los nanoobjetos condicionan su vía de internalización celular y consecuentemente su destino intracelular. De lo anterior se desprende que un diseño racional de los nanotransportadores es elemental para determinar su destino en los organismos vivos.

## Distribución y liberación del principio activo conjugado a un nanosistema

Como se viene discutiendo, uno de los fundamentos del uso de nanosistemas para transporte y entrega selectiva de fármacos es el hecho de que los nano-transportadores

podrían entregar una dosis concentrada del activo en la vecindad de la biofase y de esta forma, reducir la exposición de otros tejidos al mismo. Pese a que este principio puede aplicarse teóricamente para el tratamiento de desórdenes muy diversos, debe destacarse que hasta el momento la gran mayoría de los esfuerzos para el desarrollo de terapias dirigidas basadas en nanosistemas se han enfocado en tratamientos antineoplásicos.

La cesión dirigida de fármacos hacia ciertos blancos puede conseguirse aprovechando las características fisiopatológicas distintivas del tejido enfermo. Las estrategias incluyen: a) su distribución dirigida de manera pasiva; b) la distribución dirigida de manera activa y; c) el uso de sistemas inteligentes (*smart systems*) en los cuales la distribución y/o liberación es dirigida mediante sistemas estímulo-respuesta. Asimismo, pueden contemplarse sistemas multifuncionales que combinen de manera generalmente sinérgica los mecanismos anteriores (Figura 7.3).

La distribución y liberación de fármacos dirigida de manera pasiva (muchas veces conocida como “*targeting pasivo*”, por su denominación en inglés “*passive targeting*”) aprovecha la irregular, defectuosa y permeable vasculatura de tejidos tumorales, así como la ausencia de drenaje linfático en los mismos, para localizar preferencialmente el complejo fármaco-nanotransportador en células cancerosas (el conocido “efecto de permeabilidad y retención aumentada”, efecto EPR). Un enfoque similar podría concebirse para el tratamiento de otras patologías en las que también se encuentra aumentada la permeabilidad vascular (por ejemplo cuando existen eventos inflamatorios).

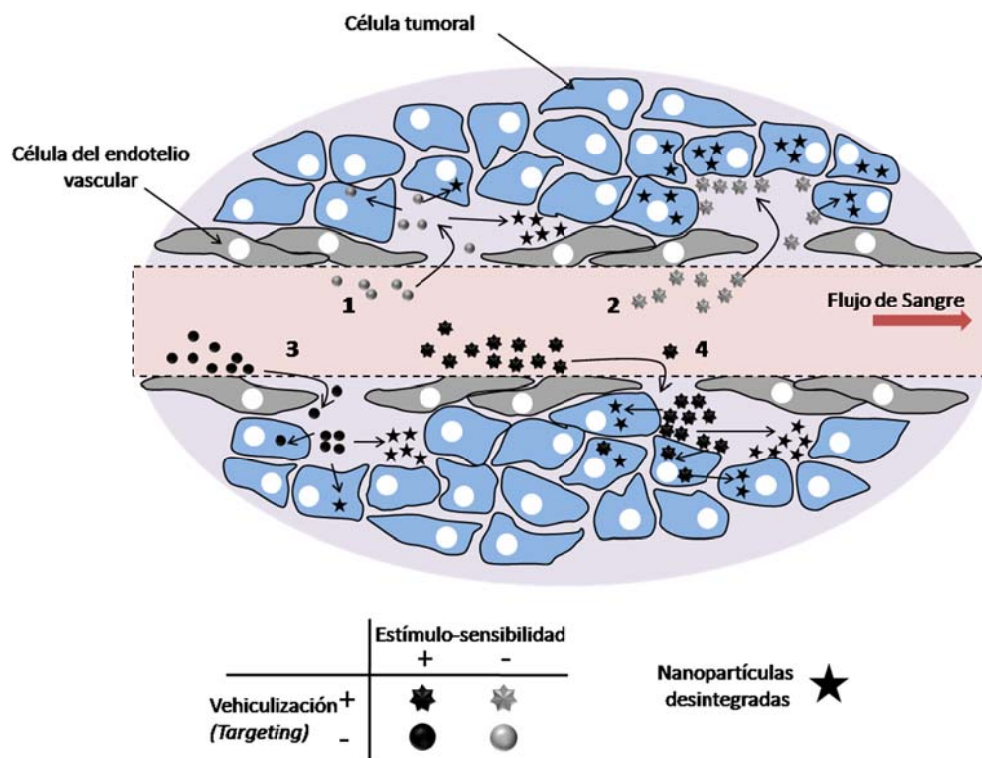
La distribución y liberación dirigida de manera activa (muchas veces conocida como “*targeting activo*”, por su denominación en inglés “*active targeting*”) se logra conjugando los nanotransportadores con ligandos (anticuerpos, azúcares, péptidos, vitaminas u otros) que se unen selectivamente a receptores que están expresados preferencialmente en los tejidos blanco. Por ejemplo, algunos tipos de células cancerígenas sobre-expresan receptores de transferrina y folato. Como parte de una estrategia de “*targeting activo*” se conjugan entonces nano-transportadores con transferrina, ácido fólico o anticuerpos para estos receptores.

Pese a ser alternativas promisorias, existen una serie de cuestionamientos al uso del *targeting activo*, surgidos tanto de la experimentación *in vivo* como de la experiencia clínica. Uno de ellos se refiere a los niveles de expresión de los receptores específicos; la expresión de los mismos puede ser transitoria, insuficiente y/o inespecífica. La sobre-expresión de receptores en tumores no sucede sincrónicamente en todas las células tumorales y no conduce necesariamente a una mayor acumulación de nanoobjetos derivatizados; las células normales, mucho más numerosas, pueden competir exitosamente frente a las tumorales por la captura del nanoobjeto. Asimismo, la endocitosis mediada por receptores que sucede a la interacción ligando-receptor, aunque veloz, es un proceso saturable. Diversos estudios han sugerido que la “decoración” con ligandos podría incrementar la transcitosis de nanopartículas más allá de la vasculatura tumoral, acercándolas al núcleo tumoral. Sin embargo, los nanoobjetos derivatizados o estéricamente estabilizados tienden a presentar un radio hidrodinámico mayor que podría dificultar su penetración en el tumor. Un tercer cuestionamiento se refiere al hecho

de que la incorporación de anticuerpos a la superficie de nanoobjetos es un reto estructural que aún no ha podido ser superado a escala industrial.

Por último, los sistemas inteligentes aprovechan “señales” o peculiaridades en la vecindad del sitio de acción del fármaco (como cambios de pH, ambiente reductor) para liberar el fármaco de forma localizada. Tales estímulos pueden surgir de características patofisiológicas de los tejidos afectados por determinada enfermedad (por ejemplo, la elevada tasa metabólica de las células cancerígenas suele dar lugar a un descenso en el pH de los tejidos tumorales) o pueden provenir del exterior (por ejemplo, bajo la aplicación de estímulos físicos como radiación de longitud de onda específica, ultrasonido, campos magnéticos o temperatura).

Debe subrayarse que el transporte y cesión dirigida de fármacos pueden tener como objetivo final alcanzar el nivel tisular, celular o incluso subcelular (en este último caso serían útiles en terapias génicas y el tratamiento de patologías en las que están involucradas organelas celulares, como por ejemplo enfermedad mitocondrial). Adicionalmente, los sistemas coloidales también se estudian para mejorar la distribución de drogas hacia tejidos caracterizados por una vasculatura de baja permeabilidad. Particularmente, se ha invertido gran esfuerzo en mejorar el pasaje de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, para activos cuyo sitio de acción yace en el sistema nervioso central. Algunas de las estrategias incluyen el recubrimiento de nanopartículas poliméricas con polisorbato, la conjugación de nanopartículas poliméricas con anticuerpos o péptidos que interactúan con receptores de transferrina expresados a nivel cerebral y la conjugación de nanopartículas de albúmina con apolipoproteínas (Apo E, AII, CII, B y J) entre otras.



**Figura 7.3.** Distintas estrategias de targeting para terapias anticancerígenas; se ha observado que el uso combinado de distintas estrategias mejora la localización.

El proceso de liberación dependerá de cómo haya sido incorporado el fármaco al nanosistema. Como se ha mencionado, existen varias opciones al momento de conjugar el activo con el nanovehículo. Entre ellas, se pueden distinguir dos grandes categorías de métodos de carga de moléculas activas en el nanotransportador: la primera incluye a la encapsulación física o la adsorción del fármaco a través de uniones no covalentes. La segunda incluye formas de unión del fármaco a la matriz del nanotransportador a través de enlaces covalentes.

Dependiendo de la forma en que se incorpore el fármaco al nanotransportador y de la composición del sistema, la liberación del activo ocurrirá por uno o más de los siguientes mecanismos: difusión, reacción química y activación y transporte del solvente.

La liberación a través de difusión tendrá lugar cuando el ingrediente activo se haya incorporado al nanosistema como un reservorio central rodeado de una capa de naturaleza generalmente polimérica, o cuando el fármaco se haya distribuido uniformemente en una matriz de composición homogénea, en cuyo caso deberá difundir a través del componente mayoritario del nanovehículo.

La liberación a través de una reacción química tiene lugar cuando el polímero sufre degradación por las condiciones del medio fisiológico, o cuando al encontrarse el fármaco unido al transportador por un enlace covalente tiene lugar la ruptura del mismo.

En el caso de activación por solvente, la misma sucede cuando la matriz del transportador (en la cual se haya disperso el fármaco) sufre hinchamiento por contacto con el medio o por efecto osmótico causado por el desplazamiento del solvente hacia el interior del nanosistema, facilitando este proceso la liberación.

## **La eliminación de principios activos conjugados con nanosistemas**

La disposición del complejo nanovehículo-fármaco deberá considerarse de manera independiente con respecto a aquellas moléculas de fármaco que ya han sido liberadas del nanovehículo (encontrándose, por tanto, en estado libre). Mientras que la disposición del fármaco libre no diferirá cualitativamente de lo estudiado ya para vehículos convencionales, la distribución y eliminación del complejo fármaco-vehículo presentará características absolutamente particulares para el caso de sistemas de liberación avanzados.

En el capítulo correspondiente hemos considerado que la eliminación de fármacos, en formas farmacéuticas convencionales, se compone de dos vías: metabolismo (eliminación bioquímica) y excreción (eliminación física). Ocasionalmente, la excreción es facilitada por la presencia de bombas de flujo dependientes de ATP.



Como se ha explicado, los nanosistemas de transporte de fármacos pueden conservar su integridad luego de alcanzar circulación general y la cinética de liberación del fármaco puede ser diseñada, de manera tal de obtener tiempos medios de circulación sanguínea prolongados.

En relación a la eliminación bioquímica del fármaco (mediante biotransformación o excreción facilitada por transportadores de eflujo), las interacciones entre el fármaco y las enzimas metabólicas y/o los transportadores de eflujo estarán impedidas mientras el mismo se encuentre encapsulado o incorporado dentro del transportador.

En relación a la excreción de nanoestructuras, la vía de excreción más frecuente será la urinaria. Según lo reportado en gran número de estudios, existe acuerdo en que partículas con radio hidrodinámico menor a 5.5-6 nm son rápidamente excretadas en la orina. Así, aquellas cuyos diámetros se encuentren por encima de este umbral tenderán a incrementar el tiempo de vida media del fármaco debido a que no serán eliminadas por vía urinaria. Por otro lado, la membrana basal del glomérulo, al estar compuesta principalmente por glucosaminoglucanos (polisacáridos de carga negativa), posee permeabilidad selectiva hacia moléculas cargadas, siendo que las macromoléculas cargadas positivamente serán filtradas más eficientemente que aquellas aniónicas.

Aunque las nanoestructuras de cierto tamaño podrán escapar a la filtración glomerular, el mayor inconveniente al que se enfrentarán será la captación de ellas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Este sistema es una parte del sistema inmune que se compone principalmente por macrófagos y monocitos y se localiza mayoritariamente en nódulos linfáticos, pulmones, bazo e hígado. El mismo, tiene la capacidad de fagocitar no sólo microorganismos, sino también cuerpos extraños (entre ellos a las nanoestructuras). Tal aclaramiento de las nanopartículas luego de su llegada a circulación puede ocurrir muy rápidamente, incluso dentro de los 5 minutos posteriores al acceso al torrente sanguíneo. Es conocido desde hace tiempo que las propiedades de superficie y tamaño son los principales determinantes de la distribución y eliminación de los nanosistemas. Las nanopartículas “desnudas” (sin modificaciones superficiales) adsorben rápidamente proteínas plasmáticas (principalmente opsoninas) y como consecuencia son rápidamente removidas del torrente sanguíneo por el SFM.

En resumen, el principal mecanismo de aclaramiento de fármacos transportados por nanosistemas no se corresponde con aquellos mecanismos que efectúan la eliminación de fármaco libre en sistemas convencionales, sino que es mayormente la respuesta inmune la que condiciona el tiempo de circulación sistémica de los nanosistemas; ocasionalmente, para el caso de nanopartículas particularmente pequeñas, la eliminación renal puede ser relevante.

## **Eludiendo la opsonización y el sistema fagocítico mononuclear: sistemas sigilosos**

En la sección anterior se discutió que, una vez en circulación sistémica el destino del nanosistema (fármaco conjugado con o encapsulado en un nanotransportador) será, en gran

parte, la remoción por parte del SFM la responsable de la eliminación. En otras palabras, luego de acceder a circulación el nanosistema será reconocido por el sistema inmune del “huésped” y se desencadenará su remoción por parte de los fagocitos. Esto se da a través de la adsorción de proteínas del plasma (pertenecientes al sistema inmune) a la superficie de los “cuerpos extraños” (en este caso los nanosistemas) que se encuentran en la circulación, haciendo a éstos “visibles” a los fagocitos, proceso conocido como opsonización.

El nivel y la naturaleza exacta de las proteínas plasmáticas que se unen a la superficie de una nanoestructura está condicionado por el tamaño, forma, y otras propiedades de la misma como hidrofobicidad y carga superficiales. Lo anterior condiciona la reacción inmune que se desencadena en el organismo. Las inmunoglobulinas y proteínas del complemento son las principales colaboradoras en el reconocimiento de partículas extrañas por las células del SFM.

Para incrementar la probabilidad de éxito en el transporte de fármacos es necesario minimizar la opsonización y mejorar el tiempo de circulación de nanotransportadores *in vivo*. Esto puede conseguirse recubriendo los nanovehículos con polímeros o surfactantes hidrofílicos, o formulándolos con copolímeros biodegradables de características hidrofílicas, como polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno, poloxamina, poloxámero o polisorbatos (Tween ®20 o Tween ®80).

El PEG es un polímero que ha mostrado ser de gran utilidad para este fin. Los nanotransportadores “recubiertos” con PEG (“pegilados”) se vuelven “invisibles” al reconocimiento de las células del sistema inmune y por ello experimentan tiempos medios de circulación sanguínea mayores a sus análogos “desnudos”. Aparentemente, este fenómeno se logra a través de efectos estéricos y también osmóticos de las cadenas de polímero que dificultan la adsorción de proteínas.

Sin embargo, se han encontrado ciertas limitaciones en el uso de nanopartículas recubiertas con este polímero. Algunos estudios señalan que luego de la administración repetida de sistemas “pegilados” en animales de laboratorio se desencadena una respuesta inmune que conduce a la rápida remoción del nanosistema recubierto desde el torrente sanguíneo (aclaramiento sanguíneo acelerado, en inglés “accelerated blood clearance”, ABC). De todas maneras, existen evidencias que este fenómeno dependerían de la naturaleza y composición del nanotransportador. A su vez, el nivel de inducción de respuesta inmune (a causa de la inducción de IgM anti-PEG) estaría relacionado con el intervalo de tiempo entre una dosis y otra.

## **Tipos de nanosistemas propuestos como vehículos farmacéuticos de última generación**

Se ha dicho ya que un nanosistema dado el activo puede incorporarse de diferentes maneras: encapsulado, adsorbido o unido químicamente a la superficie del dispositivo. También, un nanosistema puede estar directamente compuesto por la droga nanoestructurada, en cuyo caso hablaremos de nanocristales del principio activo.

Desde el punto de vista de la morfología o arquitectura de los nanovehículos, podemos mencionar los siguientes tipos básicos de nanosistemas (Figura 7.4): liposomas, dendrímeros, micelas, nanoemulsiones, nanopartículas y nanogeles. Algunos de estos sistemas pueden estar compuestos por materiales de muy distinta naturaleza; tal es el caso de las nanopartículas, cuya composición puede incluir materiales poliméricos, lipídicos o inorgánicos. Otros sistemas, por su definición, están restringidos a un determinado tipo de material; por ejemplo, el término nanogeles se refiere a estructuras obtenidas a partir de compuestos de naturaleza polimérica. A continuación se expone una breve descripción de cada uno de ellos; debe mencionarse que los nanosistemas de última generación suelen ser híbridos, en el sentido de que conjugan distintos tipos de materiales e incluso distintos tipos de nanosistemas en un sistema de mayor complejidad.

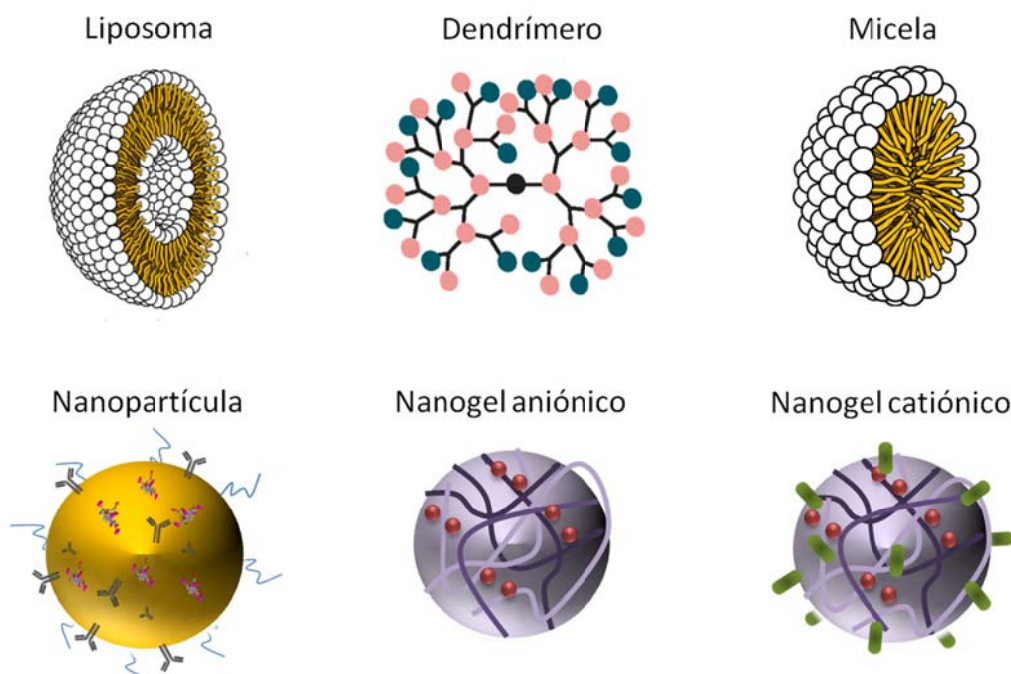


Figura 7.4. Esquema de diferentes tipos de nanosistemas

**Liposomas:** han sido utilizados como sistemas de transporte de fármacos desde la década del 60. Se pueden definir como vesículas en las que un ambiente acuoso es encerrado por una membrana lipídica, cuyos componentes fundamentales son, generalmente, fosfolípidos. Su tamaño puede variar desde unos 30-40 nm hasta el orden de los micrómetros, y pueden ser uni o multilamelares. Las propiedades de los liposomas varían dependiendo de su tamaño, composición lipídica y carga superficial, y del método empleado para su preparación.

El fármaco a transportar puede ser incorporado en el interior acuoso del liposoma o puede estar asociado a la membrana lipídica del mismo, ya sea por interacciones físicas o mediante uniones químicas covalentes.

Por ejemplo, la doxorubicina es un fármaco anticancerígeno cuyo uso clínico se ve limitado por sus intolerables efectos adversos, el más peligroso de los cuales es su cardiotoxicidad. Este efecto se haya relacionado con la administración de dosis reiteradas. Cuando se

administra a pacientes doxorubicina encapsulada en liposomas recubiertos con polietilenglicol, la dosis y frecuencia de administración disminuyen gracias a la mejor habilidad del sistema de penetrar en el tejido maligno. La dosis acumulada es menor y de esta manera el riesgo potencial de cardiotoxicidad se ve reducido.

**Dendrímeros:** El término “dendrímero” procede del griego *dendron* que significa “árbol” o “rama”. Se pueden definir como complejos poliméricos de estructura muy ramificada y forma generalmente esférica (aunque pueden obtenerse dendrímeros asimétricos y dendrímeros tipo moño) que se caracterizan por su particular y bien definida arquitectura tridimensional, su alta capacidad de funcionalización y su baja polidispersión. .

Los dendrímeros constan de una estructura tipo núcleo-capa, la cual posee tres componentes topológicos principales: a) un núcleo focal; b) capas de unidades constitutivas ramificadas que se repiten dando lugar a las llamadas “generaciones” (cada capa o ciclo de ramificación constituye una generación) y una capa periférica funcionalizada que podrá usarse para ligar químicamente moléculas de fármaco u otros ligandos. Las ramas dendríticas confieren arquitectura globular o semiglobular y una potencial superficie altamente funcionalizada.

Los dendrímeros pueden obtenerse a partir de diversos materiales. Por ejemplo, en los dendrímeros tipo polipropileno-imina (PPI), el núcleo es 1,4-diaminobutano; para los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM), el núcleo es bien amonio o bien 1,2 etilendiamina. El fármaco a transportar puede ser asociado al dendrímero de varias formas: por encapsulación (inclusión en el núcleo), por oclusión dentro de los canales del dendrímero o por unión química a la superficie (ver Figura 7.5).

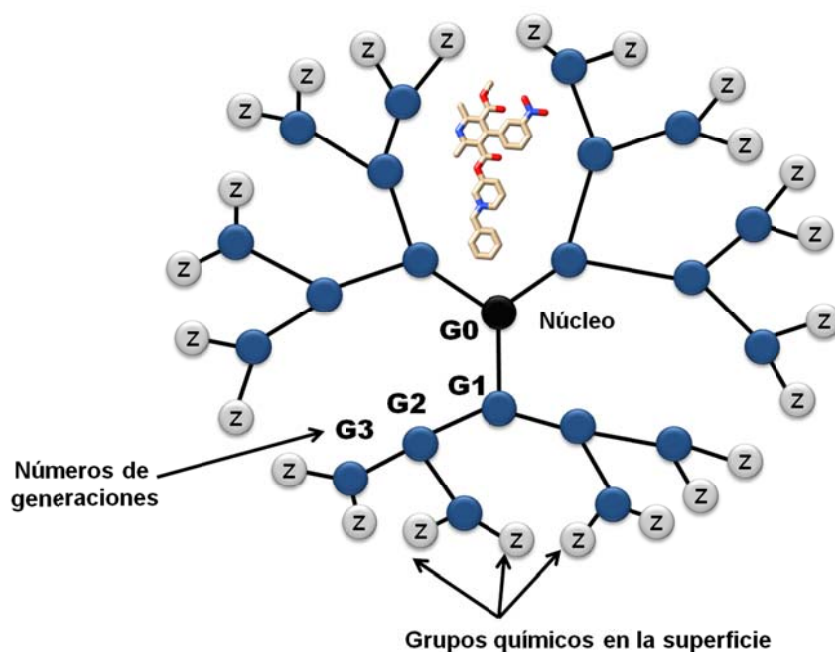


Figura 7.5. Esquema de la estructura de un dendrímero

**Micelas:** son autoensamblados supramoleculares de sustancias anfífilas que, en ambientes acuosos, poseen estructuras de tipo “carozo-cáscara” (en inglés, “core-shell”). La mayoría de las micelas de tamaño nanométrico estudiados como sistemas transportadores de fármacos se componen de polímeros anfífilos. La fuerza impulsora para el autoensamblado de los anfífilos en el medio acuoso son sus interacciones hidrofóbicas, cuando su concentración supera la concentración micelar crítica.

Los sistemas transportadores de fármacos micelares, según su composición, en su mayoría se pueden clasificar en cuatro grupos: micelas de fosfolípidos, de polímeros plurónicos (copolímeros de un óxido de polietileno y una porción hidrofóbica como un óxido de polipropileno), de poli(L-aminoácidos) y de poliésteres.

**Nano-emulsiones:** son dispersiones de fase oleosa en agua donde la fase dispersa se compone de gotículas de tamaño nanométrico, estabilizadas por un agente tensioactivo (surfactante y co-surfactante).

Las nano-emulsiones son atractivas como formulaciones farmacéuticas debido a que se forman espontáneamente (por lo que suelen ser de fácil preparación), son termodinámicamente estables y ópticamente transparentes. El tamaño nanométrico de las gotas de la fase dispersa previene su sedimentación y/o coalescencia durante el almacenamiento del medicamento. Por otra parte, las nano-emulsiones, debido al tamaño nanométrico de sus gotículas, proveen un área de contacto de fase oleosa-agua mucho mayor que en el caso de las emulsiones convencionales. Esto facilita la liberación del fármaco desde la fase dispersa.

**Nanopartículas:** Podemos hablar de dos grandes grupos de nanopartículas: nanocristales del fármaco y nanopartículas sólidas de un material dado. Según su composición, este último grupo se subclasifica a su vez en: lípidicas, poliméricas, cerámicas, metálicas, de albúmina y nanogeles.

- *Nanocristales del fármaco:* en el caso de fármacos poco solubles en agua o incluso insolubles tanto en agua como en solventes no polares, una opción interesante puede ser dispersar nanocristales del activo en medio acuoso. El estado sólido del fármaco en nano-suspensión es químicamente más estable y permite una gran carga de droga por unidad de volumen, por lo que resulta adecuado para el caso de compuestos que requieren elevada dosificación. En la formulación se suelen emplear polímeros y surfactantes que recubren la superficie de los nanocristales y promueven su estabilidad estérica o iónica frente a la agregación.
- *Nanopartículas sólidas poliméricas:* suelen ser de copolímeros, como por ejemplo: ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli- $\epsilon$ -caprolactona y polimetilmetacrilato. Estos polímeros son conocidos por su biocompatibilidad y por la posibilidad de manipular la tasa de degradación y, en consecuencia, la velocidad de liberación del fármaco.

- *Nanopartículas sólidas lipídicas*: son una clase de nano transportadores que permite el empleo de lípidos fisiológicos y otros lípidos biocompatibles como parte de su composición. Esencialmente, su obtención es similar a la de las nanoemulsiones excepto porque el componente oleoso empleado se encuentra en estado sólido a temperatura ambiente, hecho que permite mayor control en la liberación del activo. Estos sistemas de transporte cuentan con las ventajas de evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación, pudiéndose además obtenerse con costos relativamente bajos; por otro lado, por su carácter biodegradable, se estima que se trataría del tipo de nanosistema con mayor grado de biocompatibilidad.
  
- *Nanopartículas cerámicas*: este tipo de partículas suelen componerse de sílica, alúmina y/o titanía. Presentan características favorables, en relación a las nanopartículas poliméricas, como su fácil preparación, la posibilidad de modificar fácilmente su superficie (consiguiendo así la posibilidad de unir diferentes ligandos) y la capacidad de incorporar una importante cantidad de activo en su interior y/o su superficie. Son extremadamente inertes desde el punto de vista químico y permiten obtener, de manera relativamente sencilla, el tamaño, forma y porosidad deseados. Cuando entran en contacto con solventes, no existen fenómenos de hinchamiento o cambios de porosidad relacionados al pH. Tampoco son susceptibles al ataque microbiano.
- Las NPs cerámicas pueden transportar fármacos adsorbidos o absorbidos, protegiéndolos de la desnaturalización inducida por pHs o temperaturas extremos. Sin embargo, una preocupación asociada a estas y otras nanopartículas inorgánicas, no biodegradables, son las consideraciones respecto a su seguridad como vehículo farmacéutico, por un lado, y a su seguridad desde el punto de vista ambiental. Diversos estudios indican que la exposición a este tipo de nanosistemas puede ser altamente tóxica.
  
- *Nanopartículas de albúmina*: la albúmina (el componente proteico mayoritario del plasma) posee en su superficie grupos amino y carboxilato disponibles para formar enlaces covalentes a través de los cuales es posible anclar un ingrediente farmacéutico activo.
- Éste tipo de NPs despierta gran interés para el transporte de ADN (terapias génicas) debido a que el complejo ADN-albúmina podría evitar su reconocimiento y captación por el sistema inmune.
- Estas NPs constituyen un ejemplo de nanomaterial que ha llegado al mercado. Abraxane <sup>TM</sup> es un producto nanotecnológico compuesto por NPs de albúmina que transportan el fármaco anticancerígeno paclitaxel, y se hallan indicadas para el tratamiento de cáncer metastásico de mama. La gran eficacia y la

disminución de la toxicidad mostrada por Abraxane <sup>TM</sup> (en comparación con la administración de Taxol®, la formulación comercial de paclitaxel libre) pueden atribuirse a su distribución pasiva y a su retención en células enfermas, en comparación con el fármaco libre. Además, la toxicidad causada por uno de los componentes del vehículo (cremophor) empleado en la formulación de Taxol® es eliminada en el Abraxane <sup>TM</sup>.

- *Nanogeles*: son nanobjetos compuestos por redes de polímeros hidrofílicos (o anfifílicos) entrecruzados. Como en el caso de los geles, los poros de un nanogel pueden ser ocupados por pequeñas moléculas o macromoléculas terapéuticas, y sus propiedades de hinchamiento, degradación y funcionalización química pueden ser controlados.
- *Nanopartículas metálicas*: pueden prepararse partículas de metales como cobre, oro, plata, paladio, óxido de titanio. En la escala nanométrica, las propiedades ópticas y fototérmicas de los metales nobles difieren enormemente de las de sus correspondientes productos a granel. Por ejemplo las nanopartículas de oro, de cierto tamaño, presentan una coloración rojo vino mientras que el oro a granel es de color amarillo.
- Las nanopartículas de oro poseen gran potencial para el transporte de pequeñas moléculas y biomoléculas como proteínas o ADN hasta sus sitios blanco. El carozo o “core” de oro de estas nanopartículas es químicamente inerte. Como ventaja adicional, su superficie es fácilmente modificable a través de enlaces tiolato con el azufre de una gran variedad de moléculas.
- Las particulares propiedades ópticas y fototérmicas de las nanopartículas de oro proviene de las oscilaciones resonantes de sus electrones libres en presencia de luz (resonancia localizada de plasmón de superficie), gracias a la cual las mismas pueden emitir o absorber luz que se transforma rápidamente en calor. En efecto, emiten un intenso calor cuando son estimuladas con la frecuencia correcta de luz láser u otra fuente de calor (microondas, radiofrecuencia, ultrasonido, etc.); así, una colección de pequeñas nanopartículas de oro activadas por la luz puede calentar localmente un área de hasta mil veces su tamaño. El proceso de emisión de luz de estas partículas encuentra una gran utilidad en el diagnóstico por imágenes (la aplicación más desarrollada hasta la fecha); mientras que el mecanismo de absorción de luz y su conversión en calor ha abierto grandes expectativas principalmente en el tratamiento fototérmico láser selectivo de las células tumorales, pero también en la liberación de moléculas activas “a demanda” en lugares específicos del organismo, en la destrucción de virus y bacterias y en la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos.

- Las nanopartículas de plata y de cobre, presentan por sí mismas actividad antimicrobiana además de leve efecto antiinflamatorio y facilitador en la cicatrización de heridas.
- Nanotubos de carbono: estos nanomateriales consisten en láminas de grafeno (material formado por carbono puro, con átomos dispuestos en patrón regular hexagonal, similar al grafito, pero en una hoja de un átomo de espesor) enrolladas en una estructura tubular. Pueden clasificarse según el número de láminas de grafeno que los componen. Así, podemos encontrar nanotubos de una sola lámina, o de múltiples láminas.
- Las interacciones de Van der Waals que existen entre los nanotubos de carbono promueven su agregación y dificultan su estabilidad cuando se encuentran dispersos en medios polares, como el agua. Por lo anterior se los suele modificar superficialmente para sus aplicaciones en solventes polares y medios biológicos.
- *Nanopartículas magnéticas*: en clínica se utiliza óxido de hierro coloidal formulado con dextrano como agente de contraste para obtener imágenes por resonancia magnética. En nanopartículas suficientemente pequeñas podrá observarse el fenómeno de superparamagnetismo: en ausencia de un campo magnético externo, el momento magnético de cada nanopartícula podrá fluctuar aleatoriamente debido a la temperatura; cuando el tiempo utilizado para medir la magnetización de las nanopartículas sea superior al tiempo de relajación su momento magnético aparentará ser cero. Sin embargo, en presencia de un campo magnético las partículas se alinearán y magnetizarán (adquirirán un momento magnético distinto de cero). Esta propiedad presenta posibilidades desde el punto de vista biomédico. En primer lugar, desde luego, la oportunidad de guiar la trayectoria del nanovehículo mediante la aplicación de un campo magnético. Por otra parte, la aplicación de un campo magnético alterno produce relajaciones por rotación del espín y de las partículas, disipándose energía que puede ser aprovechada en tratamientos de hipertermia/ablación de tejidos tumorales.

## Los sistemas nano y la toxicología

Los nanoobjetos podrían provocar efectos a nivel celular que no han sido observados anteriormente en ensayos *in vitro* con partículas o estructuras de mayor tamaño. Por ejemplo, podrían causar daño mitocondrial, estrés oxidativo, alteraciones en la fagocitosis, agregación plaquetaria, inflamación, alteraciones en las organelas y cambios en la morfología celular, entre otras. Estos efectos podrían ser particularmente relevantes para partículas que superen el



tamaño crítico para la filtración glomerular y que por su naturaleza no sean biodegradables (por ejemplo, nanosistemas metálicos y cerámicos).

La citotoxicidad de los nanovehículos dependerá de diversos parámetros tales como morfología, carga superficial y tamaño. Algunas características como hidrofobicidad y porosidad podría inducir la producción de especies reactivas de oxígeno. Los aspectos biológicos como tipo de línea celular empleada en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y el protocolo de exposición (por ejemplo densidad celular, concentración de partículas, composición del medio y tiempo de exposición) aún deben ser estandarizados.

Una vez en el interior celular, la toxicidad de los nanomateriales podría originarse por interacciones indeseadas con el medio celular, que pueden ser causadas por sus propiedades fisicoquímicas. Estas interacciones podrían influir en eventos celulares, concluyendo en efectos citotóxicos: alteraciones celulares (tanto estructurales como morfológicas), genotoxicidad (expresión génica, daño en el ADN, aberraciones cromosómicas, etc) y alteraciones bioquímicas (como estrés oxidativo, peroxidación lipídica, activación de caspasas, etc.) que a su vez podrían gatillar respuestas celulares diversas (producción de citoquinas inflamatorias, irregularidades en el ciclo y proliferación celular, disminución de la función mitocondrial, etc.). Algunos nanomateriales, podrían también alterar el citoesqueleto, lo cual comprometería la segregación de cromosomas, y con ello la división celular.

Los efectos tóxicos de los nanomateriales raramente ocurren como eventos únicos, aislados. En efecto un nanomaterial puede desencadenar una multitud de eventos en el interior celular. Por ejemplo, la generación de especies reactivas de oxígeno se encuentra asociada al estrés oxidativo de la célula, que puede conducir a la muerte celular. Este perfil de toxicidad se ha observado, por ejemplo, en estudios con nanopartículas de sílica. Nanopartículas de sílica amorfa y de dióxido de titanio inducirían por otro lado respuestas celulares inflamatorias.

En relación a la toxicidad *in vivo* de nano-sistemas, según lo reportado se podría señalar que, en general, la interacción con nanoobjetos biodegradables y no biopersistentes representa menores riesgos para la salud. La biopersistencia está relacionada con la incapacidad de células fagocíticas para procesar y eliminar el material, lo que conlleva al estrés oxidativo, inflamación crónica, y necrosis o generación de tumores.

Una reacción tóxica aguda importante luego de la administración endovenosa de nanoobjetos es el efecto CARPA (pseudo-alergia causada por la activación del sistema de complemento, en inglés "Complement Activation Related Pseudo Allergy"). Esta es una reacción de hipersensibilidad mediada por la liberación de factores inflamatorios desde mastocitos, iniciada por la activación del complemento frente a material nanoparticulado, que no requiere de la presencia de IgE. El distrés cardiopulmonar desencadenado por el efecto CARPA puede ser letal en individuos susceptibles. El efecto CARPA se ha manifestado ante la administración de Doxil® y de liposomas que no contienen PEG, como Ambisome® (nanosistema compuesto por anfotericina B encapsulada en liposomas, formulación que se encuentra en el mercado farmacéutico), entre otras terapias.

Aún se desconocen las características estructurales de los nanoobjetos capaces de gatillar la activación de complemento, pero han podido establecerse ciertas generalidades que permiten predecir la manifestación del efecto CARPA. Por ejemplo, el complemento se activa sobre superficies de carga positiva y aunque las cargas negativas o el potencial Z negativo no son gatilladoras *per se* de activación, la misma es sensible a la topografía superficial de cargas negativas, como ocurre con Doxil, liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) metoxiPEGuilados. También se activa frente a la agregación de nanoobjetos. Pequeños cambios en la geometría individual de liposomas, redundan en grandes cambios de superficie total. La detección de morfologías heterogéneas en los viales comerciales de Doxil (elongados, irregulares, agregados), es relevante en términos de activación de complemento ya que la misma es sensible a la superficie expuesta.

La intensidad del efecto CARPA puede ser atenuada reduciendo la velocidad de infusión, diluyendo la concentración liposomal y premedicando con corticosteroides como dexametasona. En ocasiones el fenómeno de taquifilaxis permite la desensibilización previa mediante placebos, como Doxibo (idéntico liposoma pero carente de doxorubicina) en el caso de Doxil.

Los ensayos *in vitro*, debido a su falta de estandarización y variabilidad, son de momento poco efectivos para predecir activación de complemento y otras reacciones *in vivo* a los nanoobjetos (aunque actualmente constituyen una línea de investigación de gran relevancia). Por otro lado, la reactogenicidad frente a la activación del complemento es especie-dependiente, de acuerdo a: cerdos>perros>humanos>conejos>ratas>ratones. Por lo tanto el modelo animal porcino es el más adecuado para el estudio pre-clínico del efecto CARPA. A pesar de lo universal de su empleo, los roedores están lejos de proporcionar información predictiva tanto de eficacia terapéutica como de la potencial toxicidad de las nanomedicinas.

## Bibliografía

- Emerich, D. F., Thanos, C. G. (2006). "The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis". *Biomolecular Engineering*, 23(4), 171-184.
- Koo, O.M., Rubinstein, I, Onyuksel, H. (2005). "Role of nanotechnology in targeted drug discovery and imaging: a concise review". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(3), 193-212.
- Marcatos, P. D. (2014). "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nanomaterials". En Durán, N.; Guterres, S. S., Alves, O. L. (eds). *Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments*. Alemania: Springer.
- Mishra, B., Patel, B. B., Tiwari, S. (2010). "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 9-24.
- Szebeni, J. (2014). "Complement-activation related pseudoallergy: A stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals". *Molecular Immunology*, 61(2), 163-173.