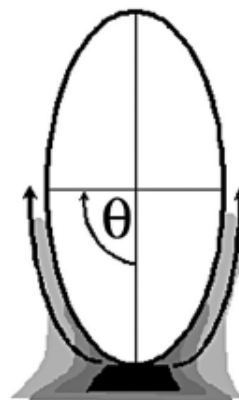


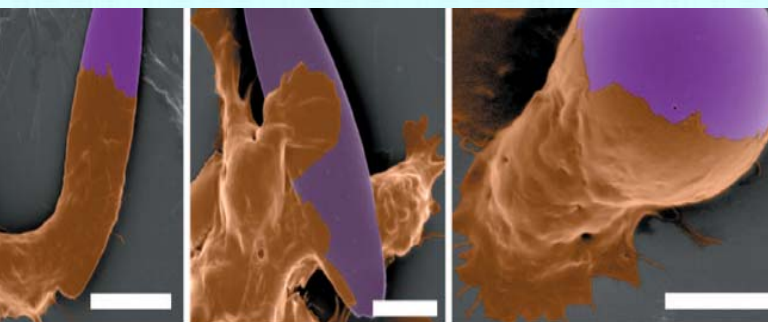
# Código de Conducta Investigación

Responsable en NyN en la región:

Significado e implicaciones para la industria, **la salud** y el medio ambiente



Programa **Nano MEDICINAS**



Dra Eder L. Romero



*Definiciones:* ¿De que hablamos cuando hablamos de nano-objetos?

Cenizas volcánicas

Spray oceánico

Magnetita biogenica:

Humo de fuego forestal

*Composites* minerales

Ferritina (12,5nm)

Partículas lipoproteicas (1-75 nm)

Nubes

**> 500 publicaciones con referato**

Nanopartículas de  
origen natural

(Ultrafinas)

< 100 nm

Nanopartículas de  
origen  
antropogenico

Nanopartículas  
incidentales

Productos de combustión

Fritura, cocina

Sandblasting

Mineria

Metalurgica

Degradacion de biomateriales

**> 10.000 publicaciones con referato**

Nanopartículas  
ingenierizadas

Nanopartículas

Nanosistemas

Nanomateriales

Materiales  
nanoestructurados

Nanoproductos

**NANOTECNOLOGIA**  
**Nano objetos**

# Nanopartículas

Vicky Colvin-Rice University

Implications of Nanotechnology  
for Environmental Health  
Research. Copyright 2004  
National Academy of Sciences.

# Nanopartículas ingenierizadas

## USA

### OXIDOS METALICOS

Cerámicas de óxidos de Zn, Fe, Ce y Zr

Agentes pulido químico de *wafers* semi-conductores

Cobertura de vidrios anti-rayadura

Cosméticos y pantallas solares

### NANOCLAY (arcilla)

Mejora propiedades de materiales: film barrera en botellas plásticas, *paper juice cartons* y pelotas de tenis

### NANOTUBOS C

Coberturas que disipan y minimizan electricidad estática en líneas de combustible y hard disk handling trays

Pintura de automóviles

Retardador de fuego en plásticos

*Field emitters sources en flat panels displays*

### QUANTUM DOTS

Tamaño y forma controladas

Existen o existirán en mercado y pueden requerir regulación

**Cuidado: NO TODOS LOS NANO  
OBJETOS SON  
NANOPARTICULAS**

¿Por que los nano objetos pueden producir toxicidad?

Características estructurales de nano objetos

Gran área superficial- nuevas propiedades derivadas de su tamaño

- 1- Gran reactividad física
- 2- Gran reactividad química
- 3- Gran reactividad biológica

1- Gran reactividad física

2- Gran reactividad química

A igualdad de  
masa el  
**numero de  
nano objetos  
es ENORME**

**nano objetos  
mas pequeños  
resultan en  
GIGANTESCA  
ÁREA  
EXPUESTA**

**Table 2.** Particle number and particle surface area per 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  airborne particles.

Particle diameter ( $\mu\text{m}$ )	Particle no. ( $\text{cm}^{-3}$ )	Particle surface area ( $\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ )
5	153,000,000	12,000
20	2,400,000	3,016
250	1,200	240
5,000	0.15	12

Oberdorster G,  
Oberdorster E,  
Oberdorster J.  
*Nanotoxicology: an  
emerging discipline  
evolving from studies of  
ultrafine particles.*  
*Environ Health.*  
*Perspect.* 2005;  
113:823-39.

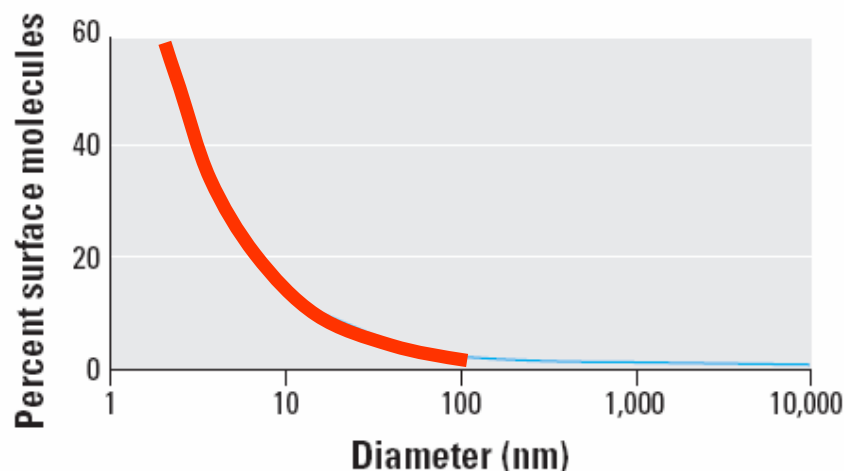


Fig. 1. Inverse relationship between particle size and number of surface expressed molecules. In the size range < 100 nm, the number of surface molecules (expressed as a % of the molecules in the particle) is inversely related to particle size. For instance, in a particle of 30 nm size, about 10% of its molecules are expressed on the surface, whereas at 10 and 3 nm size the ratios increase to 20% and 50%, respectively. Because the number of atoms or molecules on the surface of the particle may determine the material reactivity, this is key to defining the chemical and biological properties of nanoparticles.

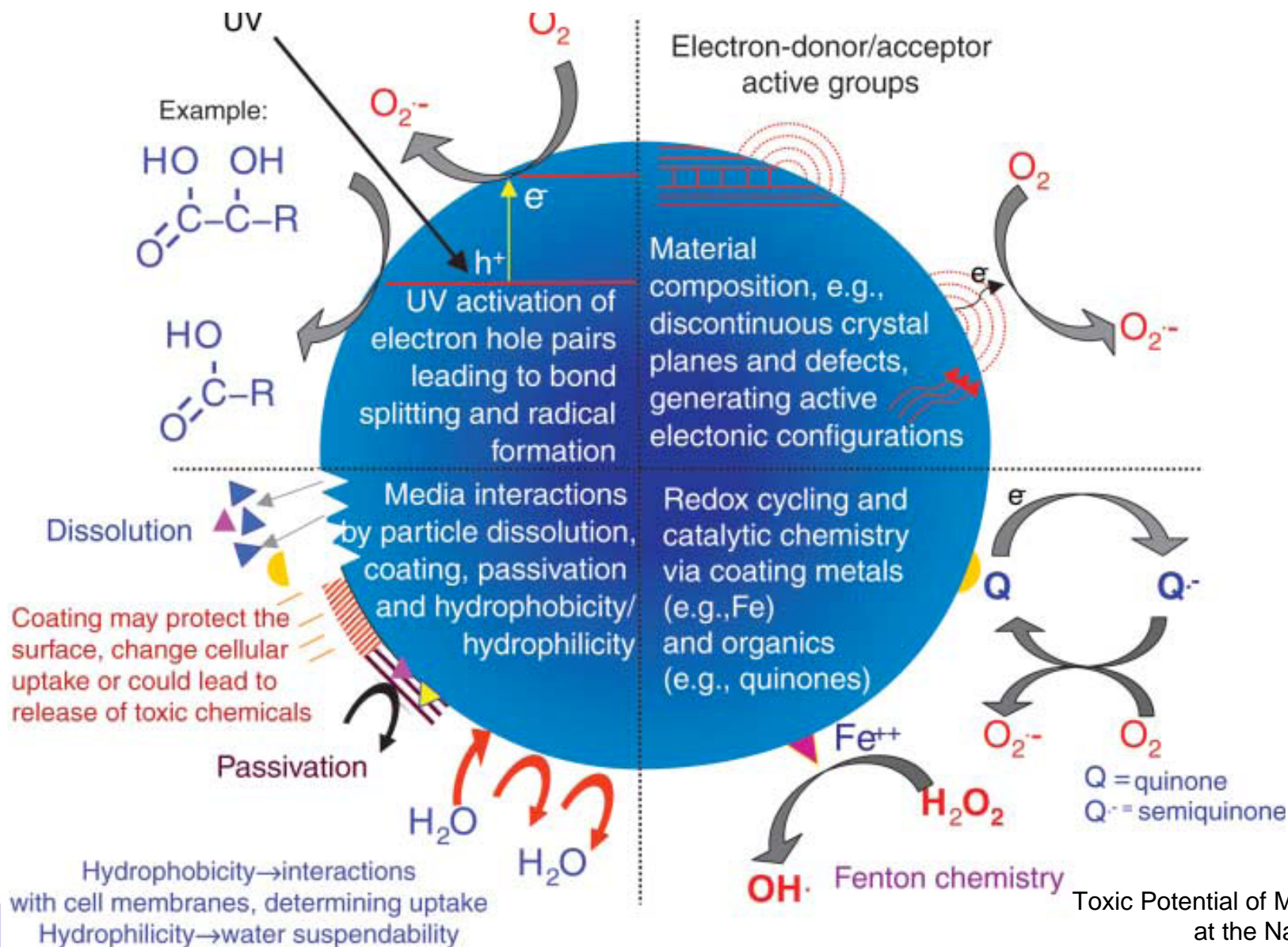
Consecuencias

Gran área superficial

Gran reactividad



Fig. 2. Possible mechanisms by which nanomaterials interact with biological tissue. Examples illustrate the importance of material composition, electronic structure, bonded surface species (e.g., metal-containing), surface coatings (active or passive), and solubility, including the contribution of surface species and coatings and interactions with other environmental factors (e.g., UV activation).



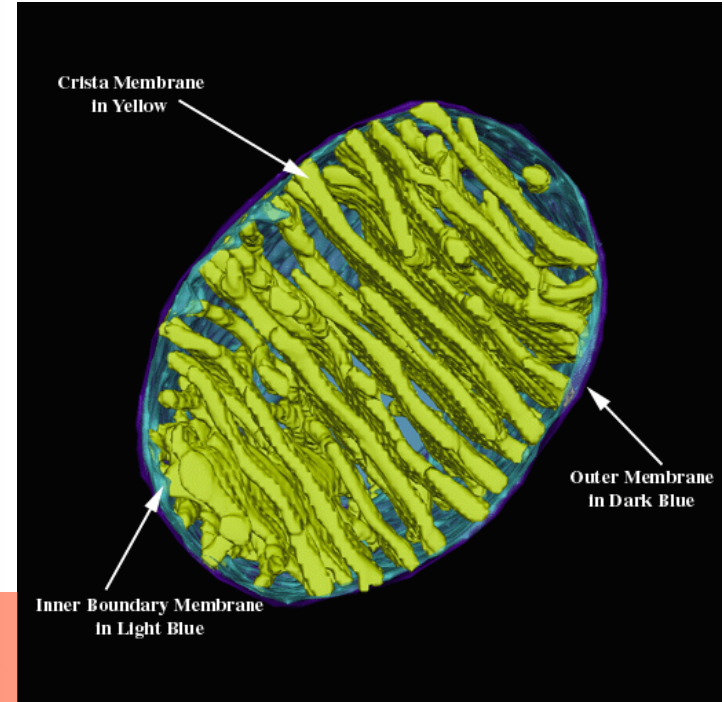
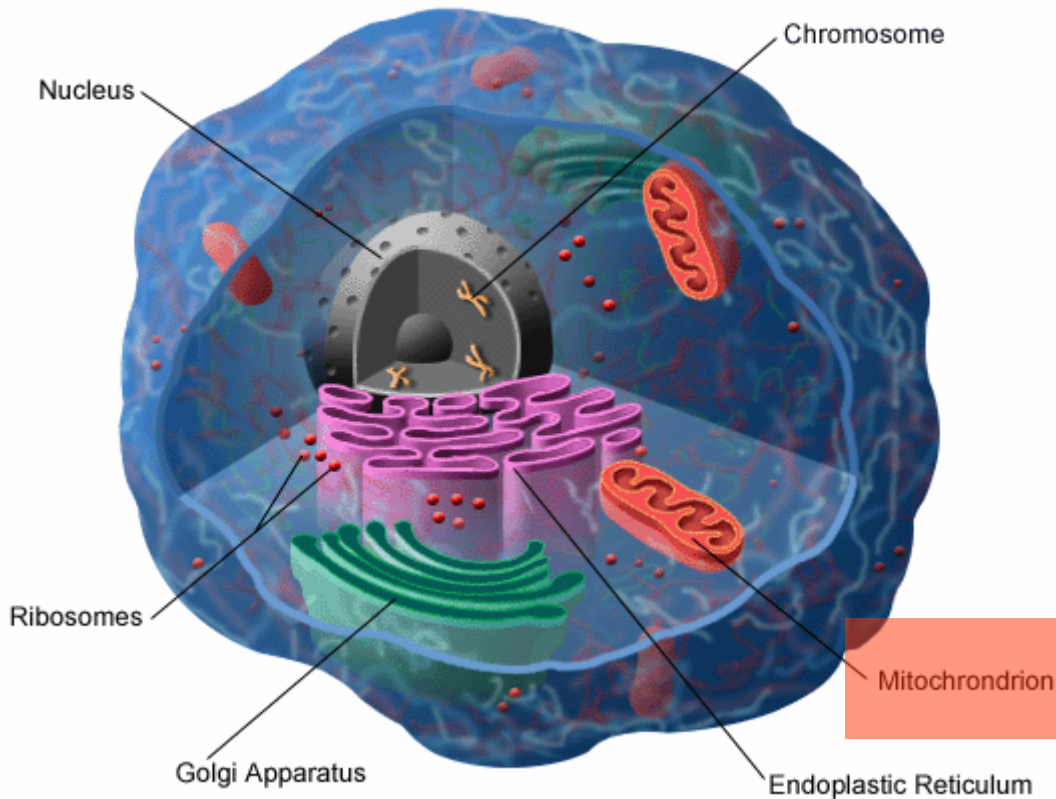
Toxic Potential of Materials  
at the Nanolevel

Andre Nel, Tian Xia, Lutz Ma'dler, Ning  
Li *Science* **311**, 622 (2006);

# estrés oxidativo

## Estrés oxidativo: originado en mitocondrias

### Anatomy of a Cell



Mitochondrion Reconstructed by [Electron Tomography](#) Ref: Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., and Frey, T. "Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: THree-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts" *Journal of Structural Biology* **119**, 260-272 (1997).

# **estrés oxidativo: un proceso gradual**

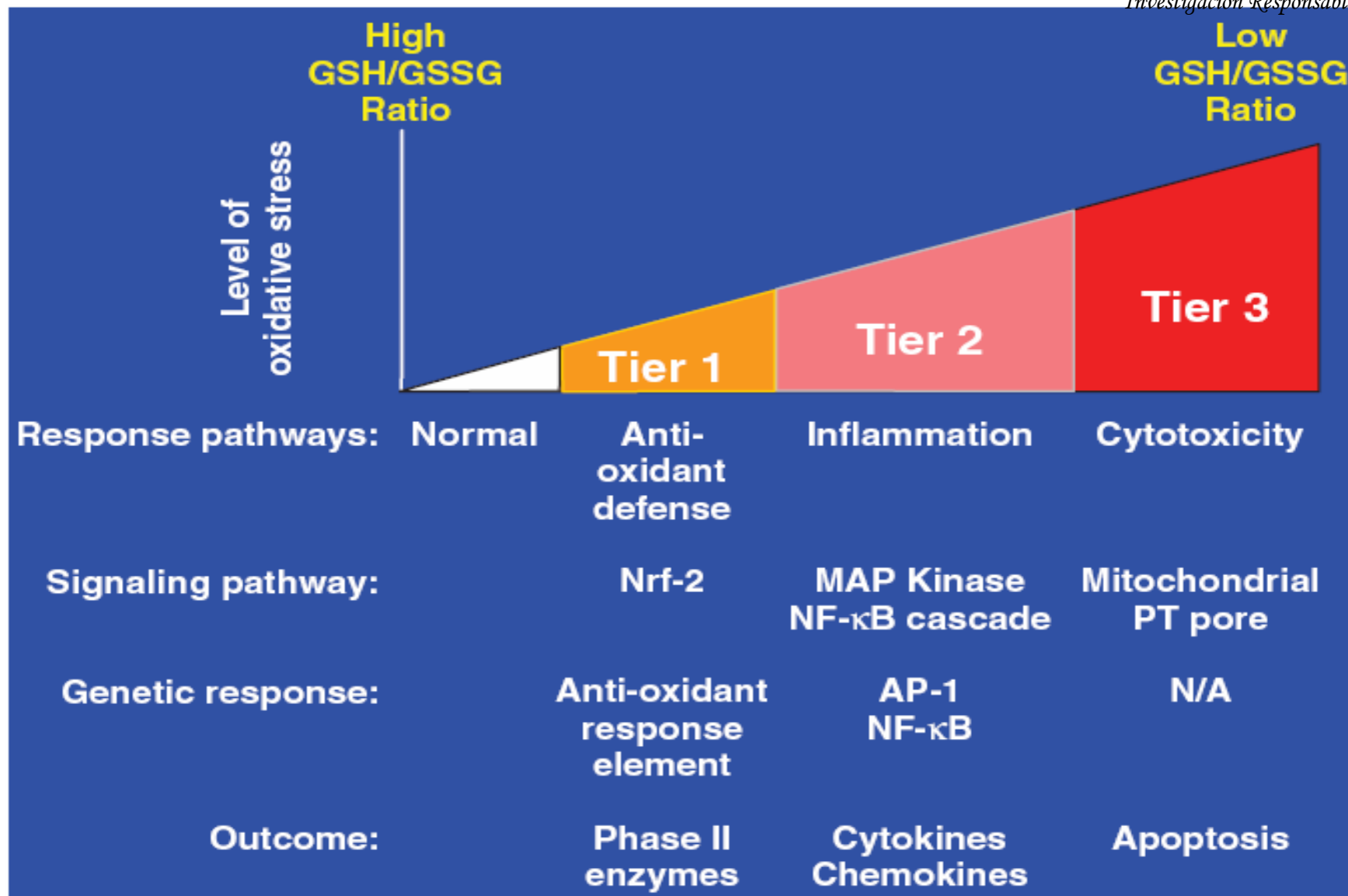


Fig. 3. The hierarchical oxidative stress model. At a lower amount of oxidative stress (tier 1), phase II antioxidant enzymes are induced via transcriptional activation of the antioxidant response element by Nrf-2 to restore cellular redox homeostasis. At an intermediate amount of oxidative stress (tier 2), activation of the MAPK and NF-κB cascades induces pro-inflammatory responses. At a high amount of oxidative stress (tier 3), perturbation of the mitochondrial PT pore and disruption of electron transfer results in cellular apoptosis or necrosis. N/A means not applicable.

Otras formas de daño:

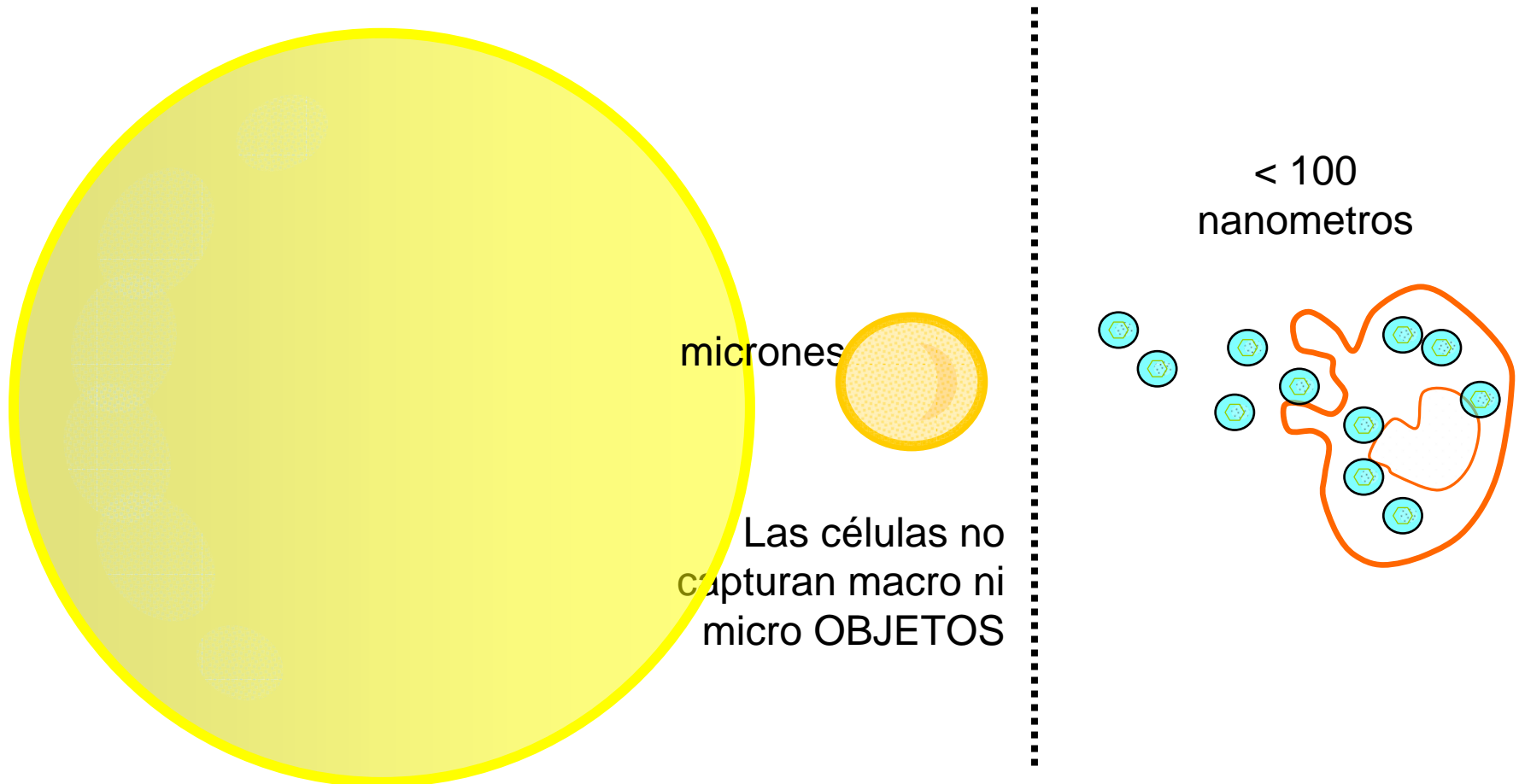
desnaturalización de proteínas, daño de membranas, daño de ADN,  
reacciones inmunes granulomas

### 3- Gran reactividad biológica

Interacción de nano objetos con células  
(animales, plantas, bacterias)

Interacción con medio ambiente



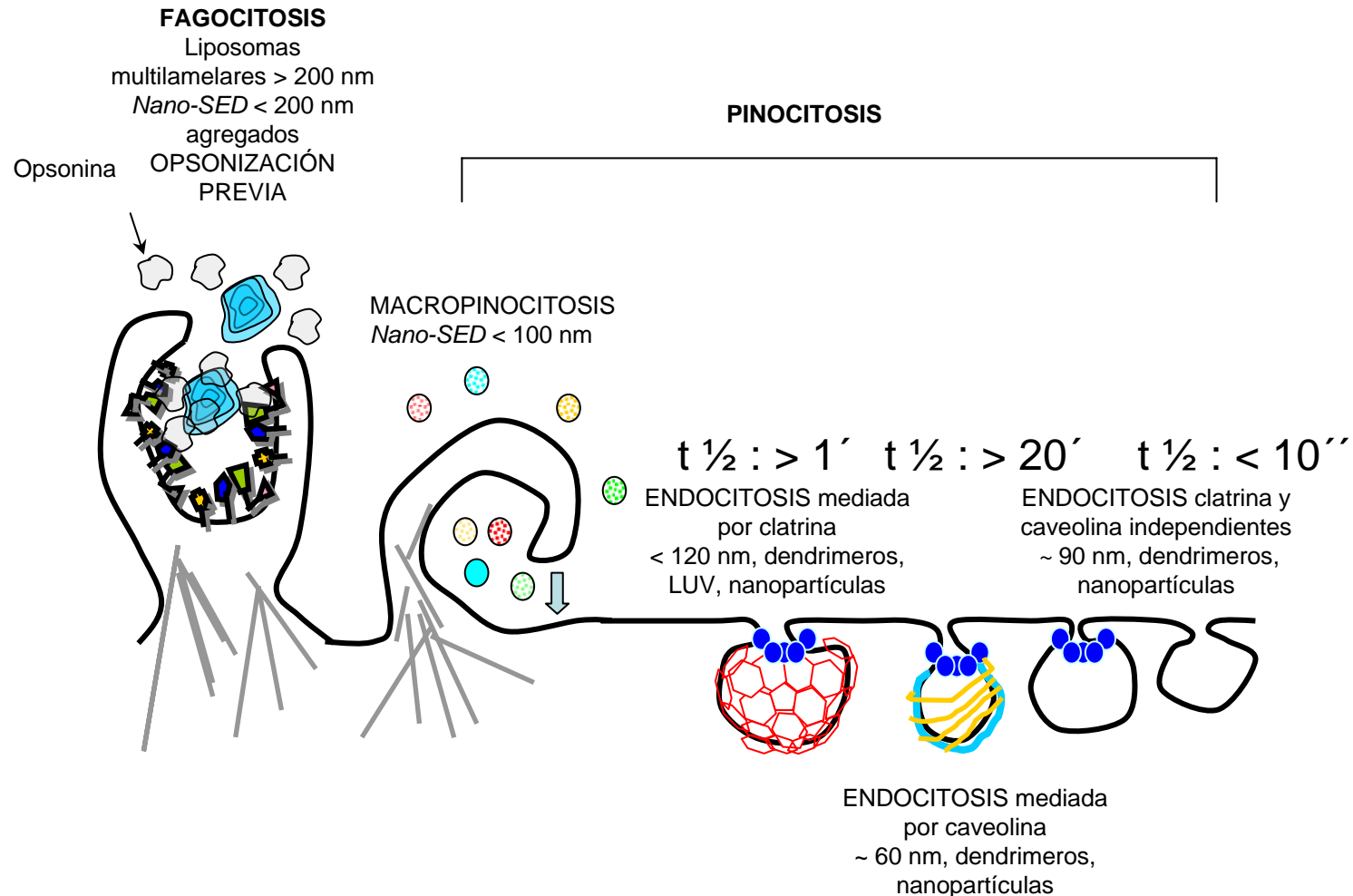


Los nano objetos SON CAPTURADOS POR CÉLULAS

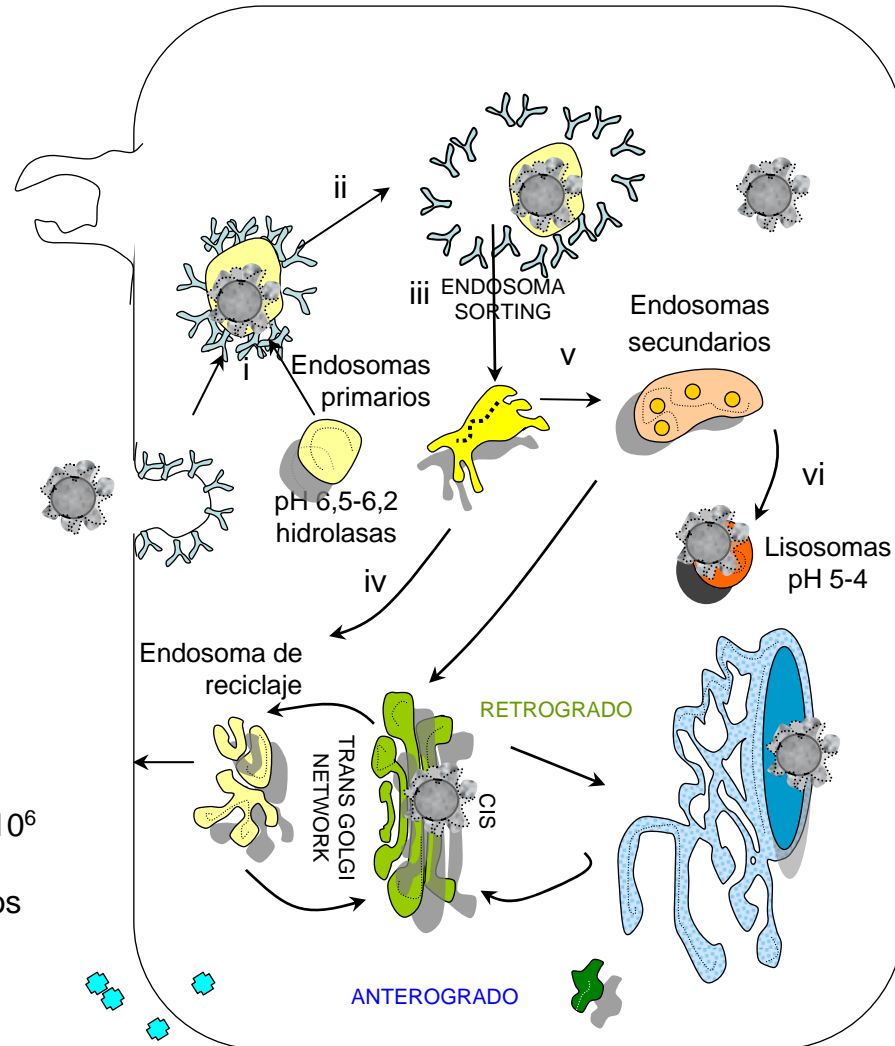
Los nano objetos CRUZAN BARRERAS ANATOMICAS / FENOMENOLOGICAS



# Los nano objetos INGRESAN POR MECANISMOS FAGOCITICOS O PINOCITICOS



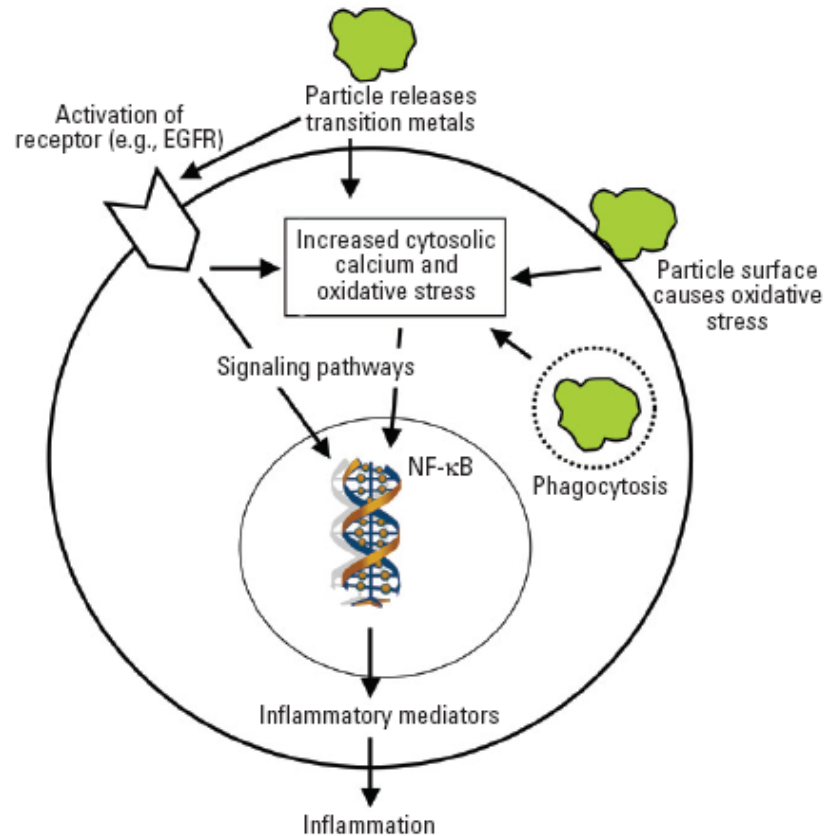
# MECANISMOS DE CAPTURA vs DIFUSION



Tasa difusión  $\propto 1/PM \propto 1/\text{polaridad}$   
 $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ , benceno  
 $H_2O$ , ETOH glucosa  
 coeficiente permeabilidad  $1/10^6$   
 del  $H_2O$   
 $Na^+$ ,  $K^+$  cargados e hidratados  
 1/billón del  $H_2O$

Los nano objetos RECORREN UN COMPLEJO  
TRANSITO INTRACELULAR

## LA HIDROSOLUBILIDAD NO GARANTIZA AUSENCIA TOXICIDAD



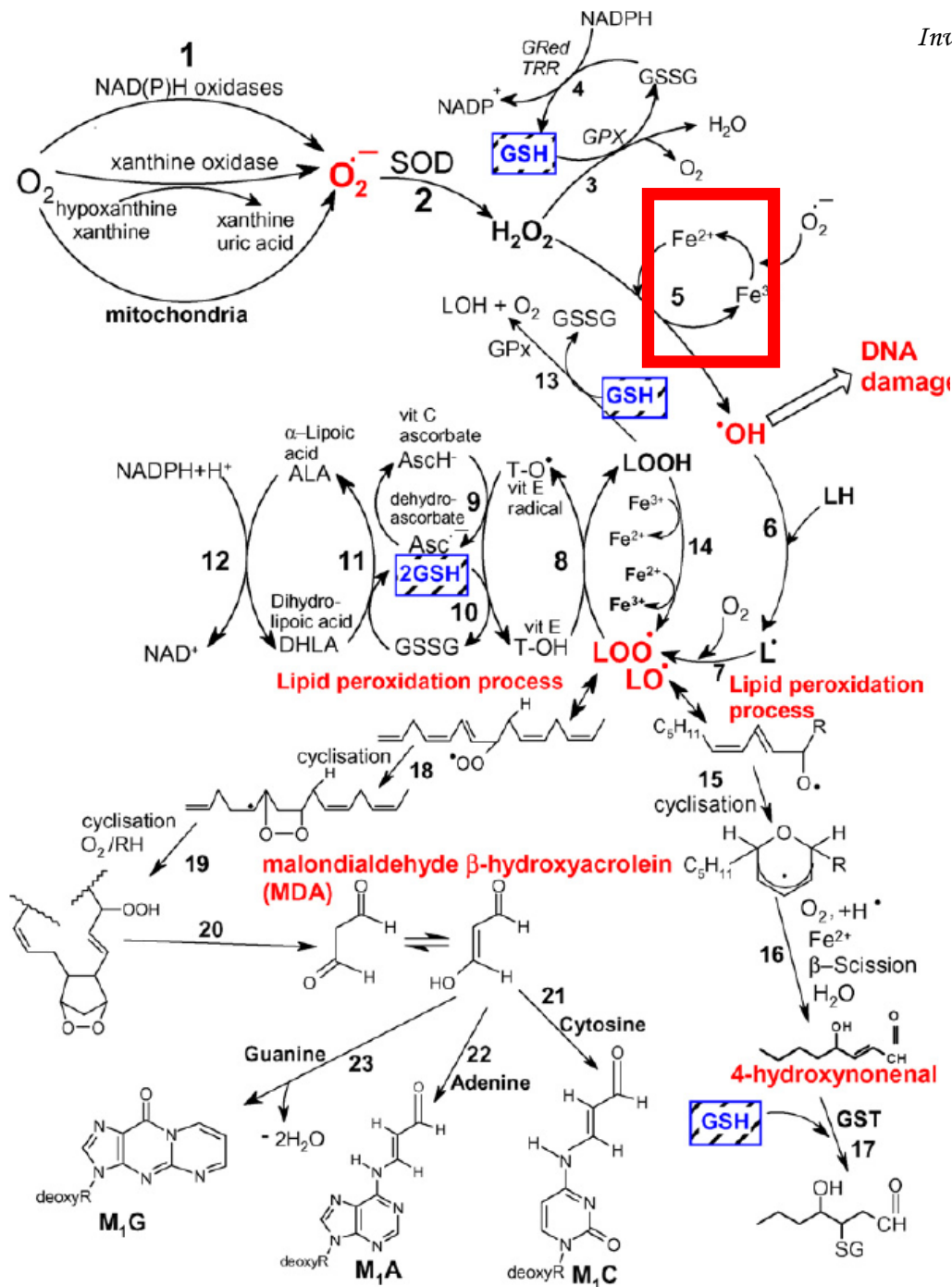
Oberdorster G,  
Oberdorster E,  
Oberdorster J.  
*Nanotoxicology: an  
emerging discipline  
evolving from studies of  
ultrafine particles.*  
*Environ Health.  
Perspect.* 2005;  
113:823-39.

**Figure 3.** Hypothetical cellular interaction of NSPs (adapted from Donaldson and Tran 2002). EGFR, epidermal growth factor receptor. Inflammation and oxidative stress can be mediated by several primary pathways:

## LA HIDROSOLUBILIDAD NO GARANTIZA BIOCOMPATIBILIDAD

The International Journal of  
Biochemistry & Cell Biology 39  
(2007) 44–84

Free radicals and antioxidants in  
normal physiological  
functions and human disease  
Marian Valko , Dieter Leibfritz, Jan  
Moncola, Mark T.D. Cronin,  
Milan Mazura, Joshua Telser

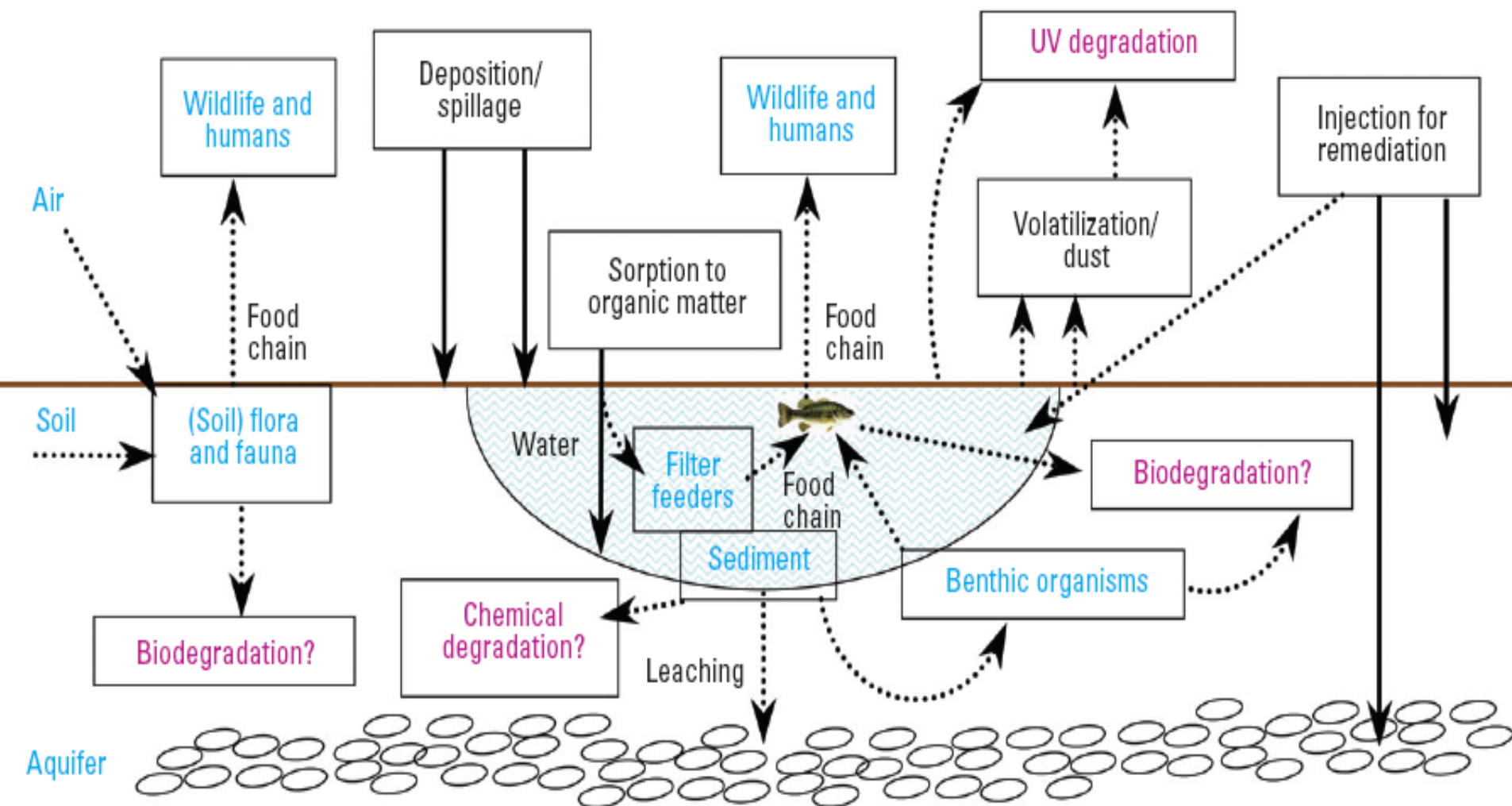


## Toxicidad de nano objetos sobre medio ambiente

Dosimetria, estado de agregación impacto de cobertura:  
desconocimiento de lo que ocurre en exposición en mundo real

**Detección en el aire**> detección en el agua> detección en suelos

Detección en animales/humanos



**Figure 5.** Routes of exposure, uptake, distribution, and degradation of NSPs in the environment. Solid lines indicate routes that have been demonstrated in the laboratory or field or that are currently in use (remediation).

Magenta lettering indicates possible degradation routes, and blue lettering indicates possible sinks and sources of NSPs.

## Toxicidad de nano objetos sobre seres humanos

PRINCIPALES PORTALES DE ENTRADA EXPOSICION NO INTENCIONAL a  
nano objetos:

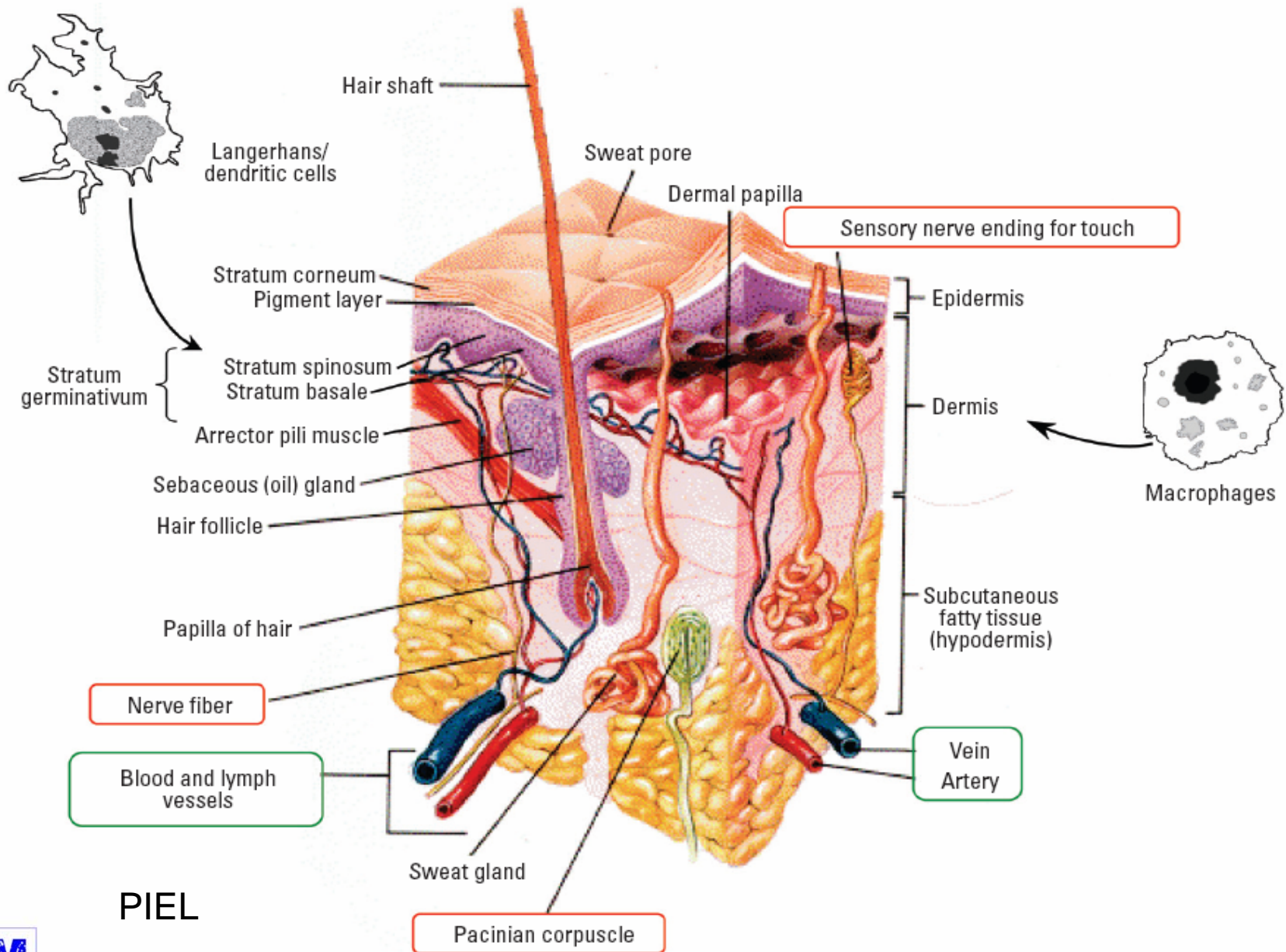
**PIEL**

**MUCOSAS**

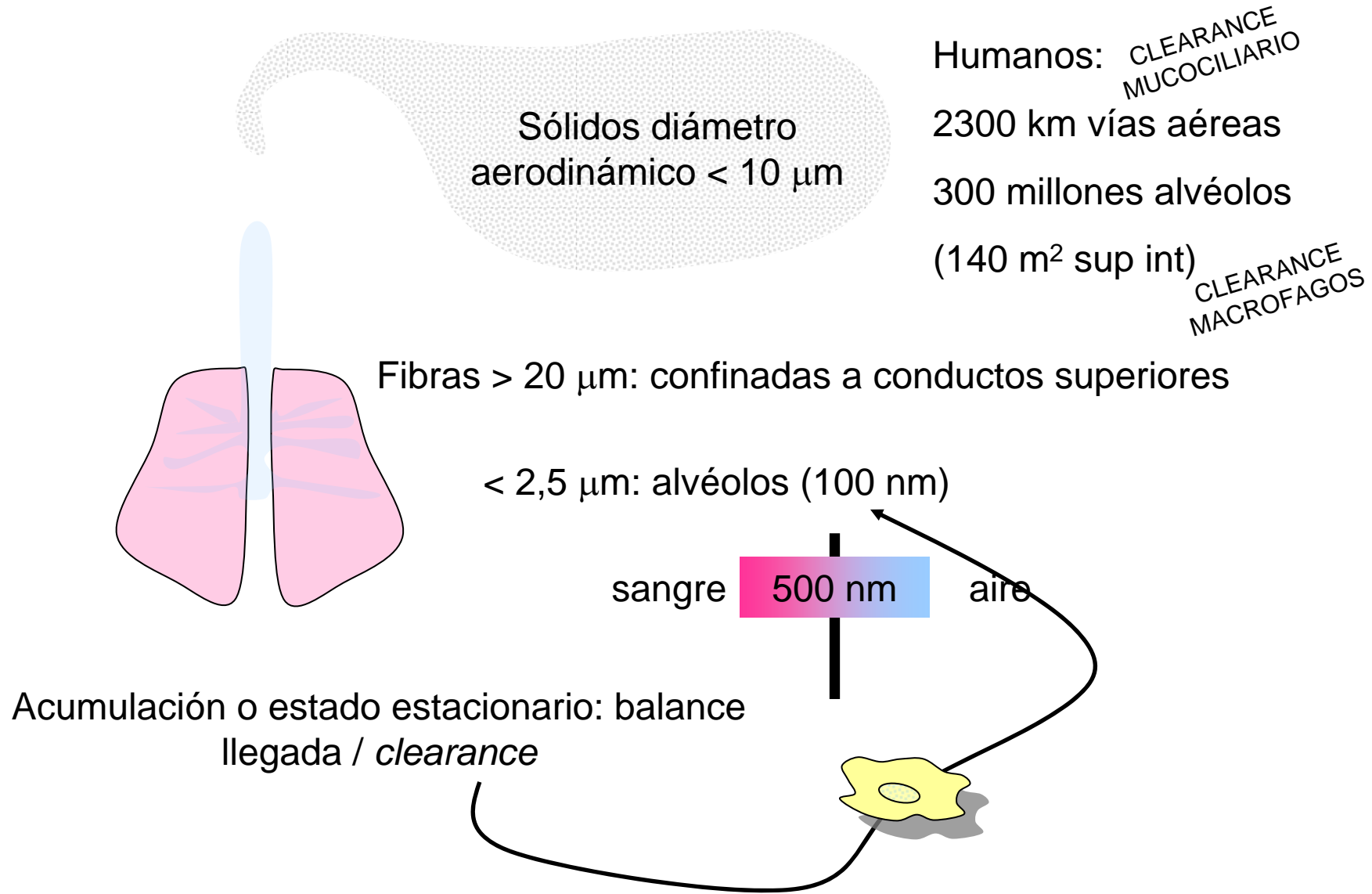
VIAS RESPIRATORIAS (sangre-tejidos perifericos)(SNC?)

TRACTO GASTROINTESTINAL (sangre-tejidos perifericos)



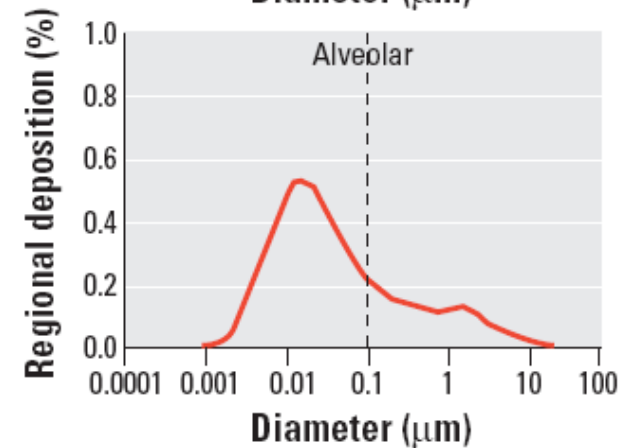
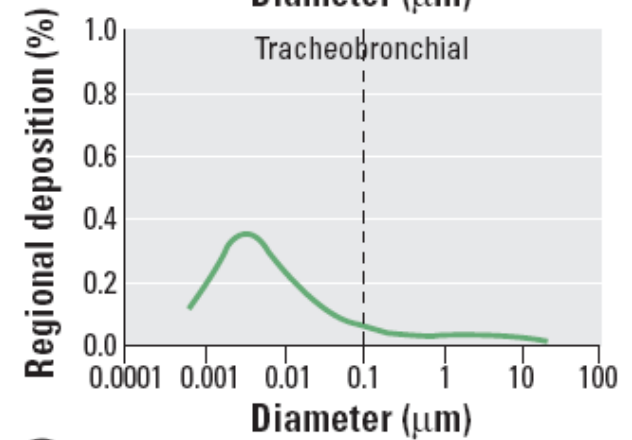
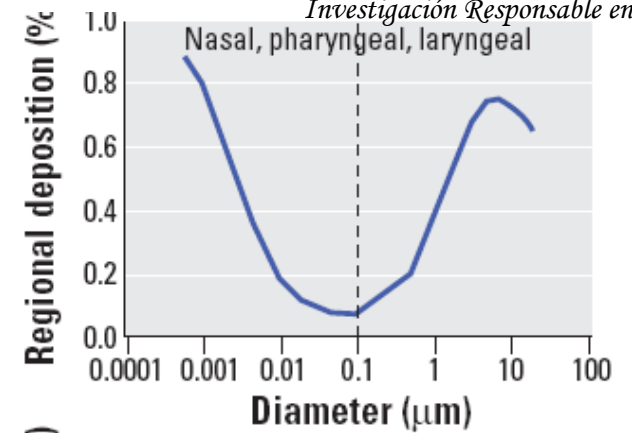
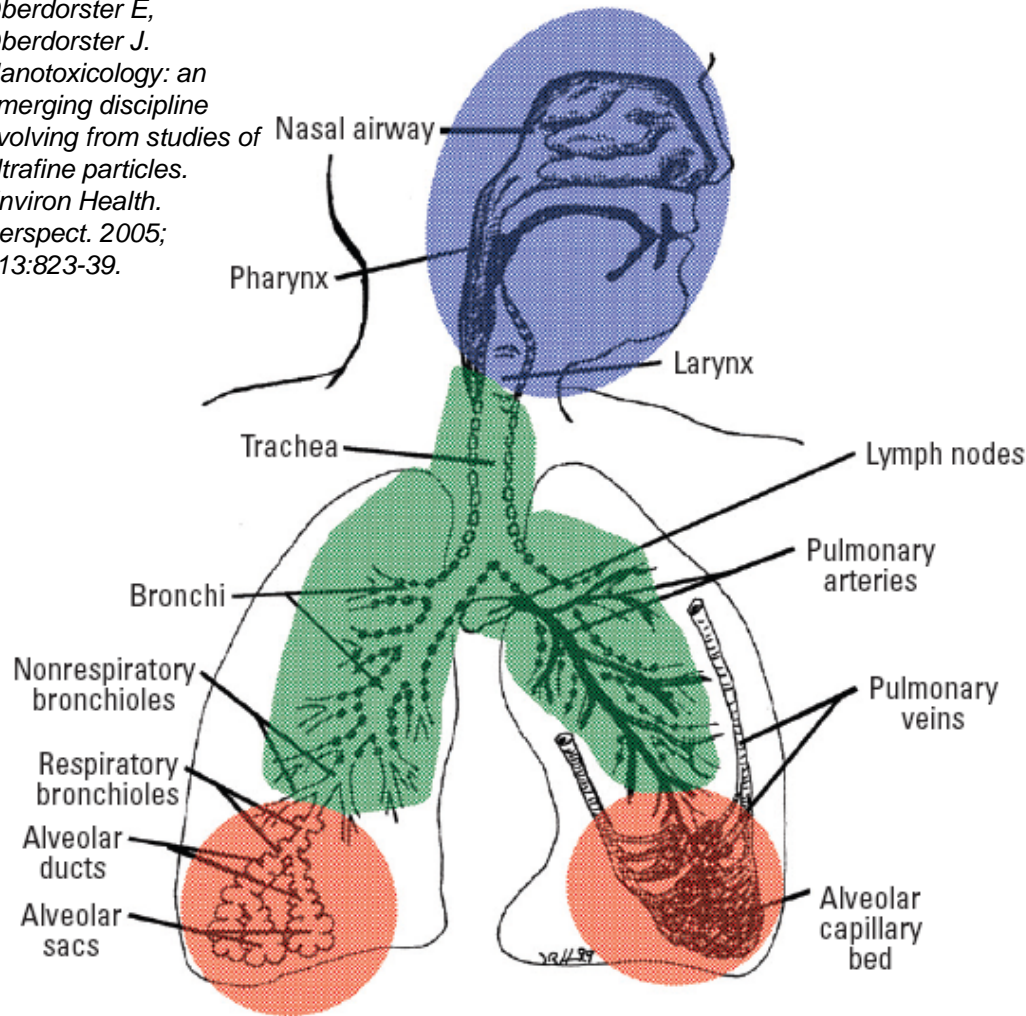




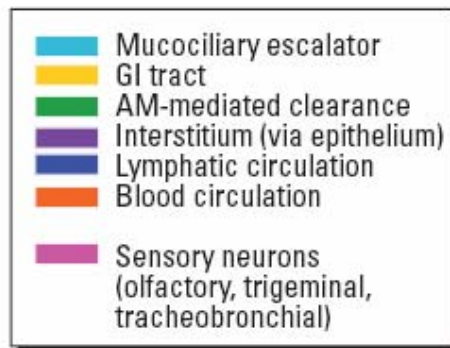


VIAS RESPIRATORIAS

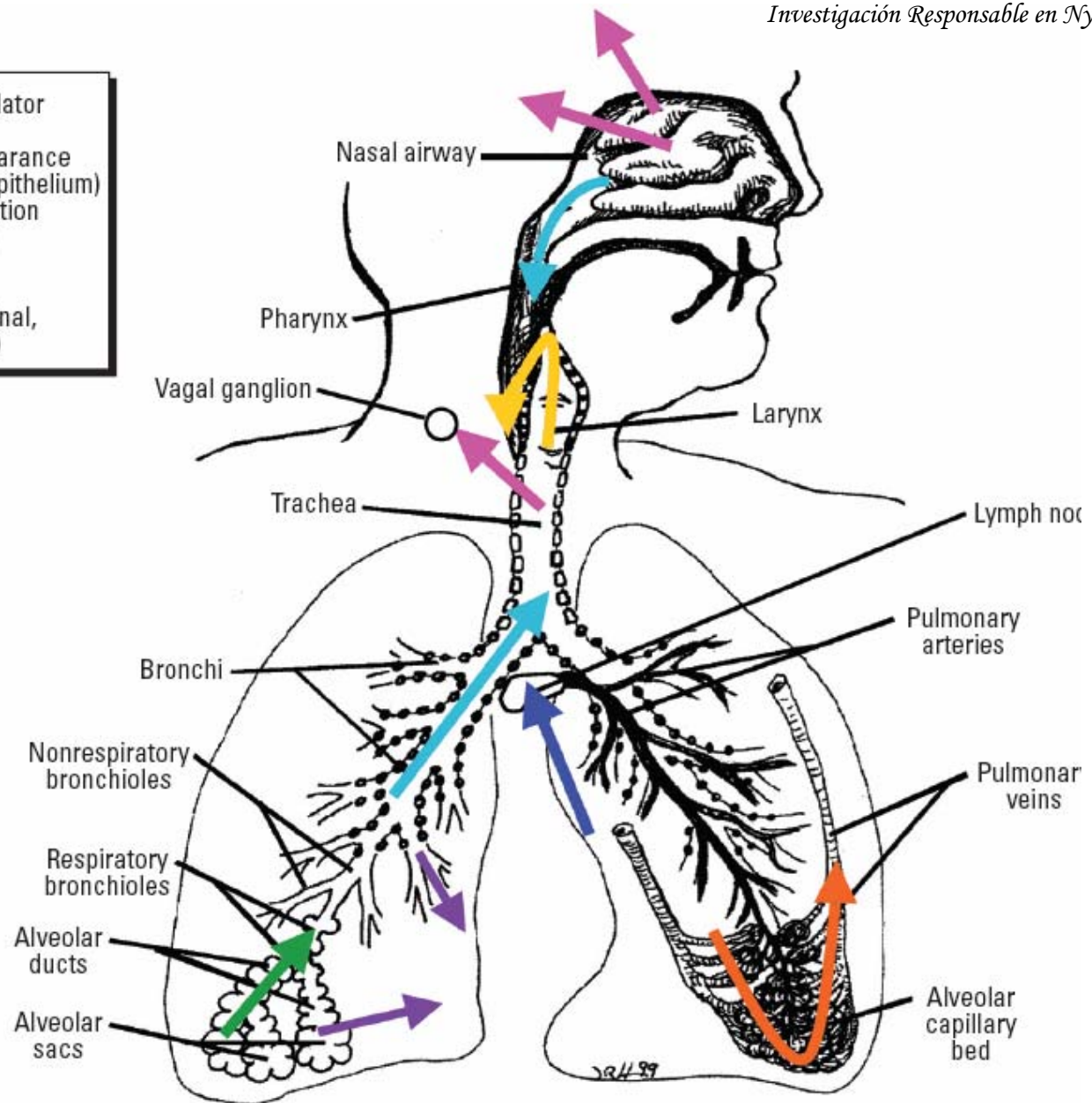
Oberdorster G,  
Oberdorster E,  
Oberdorster J.  
*Nanotoxicology: an  
emerging discipline  
evolving from studies of  
ultrafine particles.*  
*Environ Health.*  
*Perspect.* 2005;  
113:823-39.



VÍAS RESPIRATORIAS

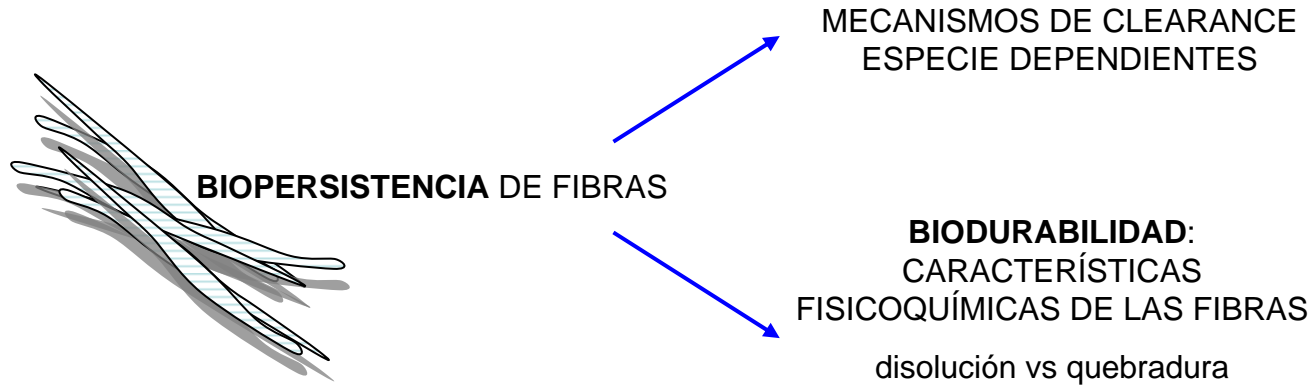


## MECANISMOS DE CLEARANCE VIA RESPIRATORIA

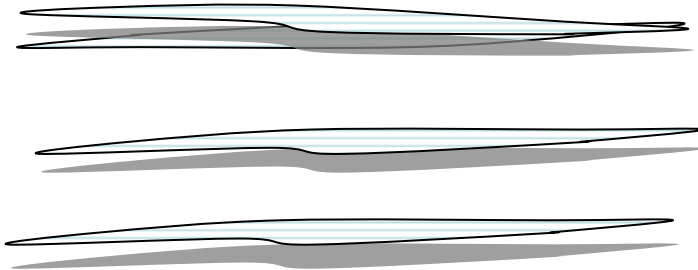


Oberdorster G,  
Oberdorster E,  
Oberdorster J.  
*Nanotoxicology: an  
emerging discipline  
evolving from studies of  
ultrafine particles.*  
*Environ Health.  
Perspect.* 2005;  
113:823-39.

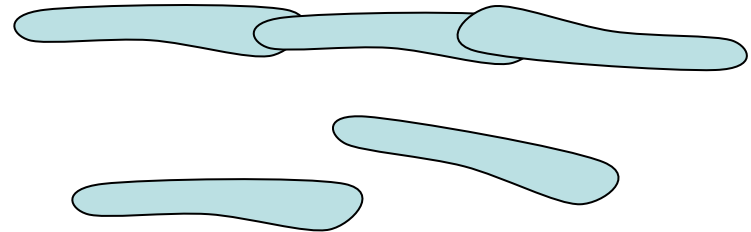
## > BIOPERSISTENCIA > TOXICIDAD



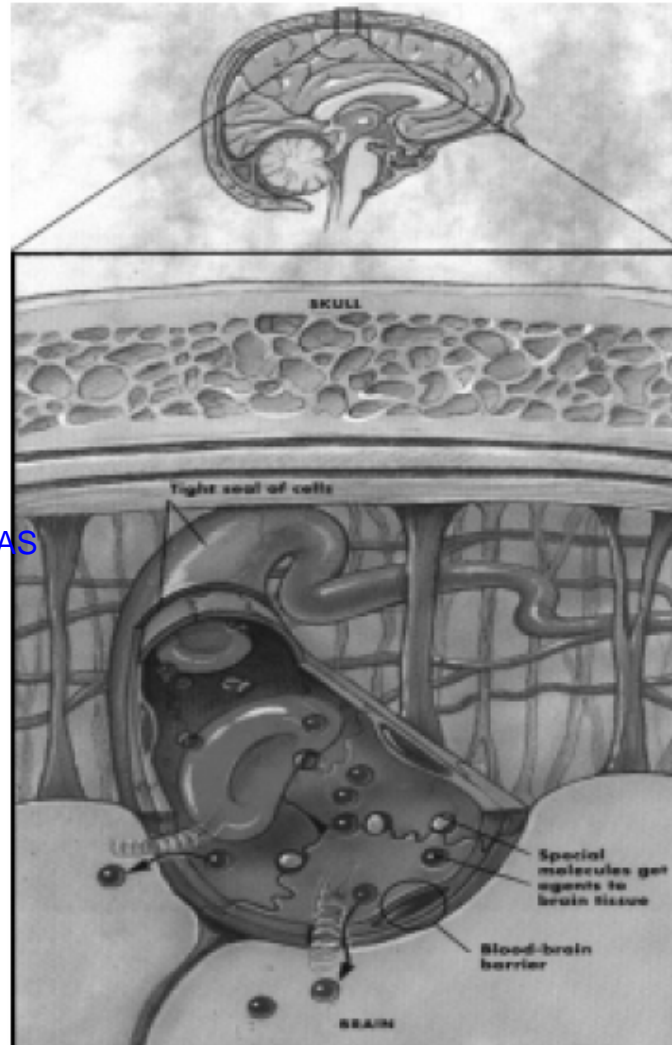
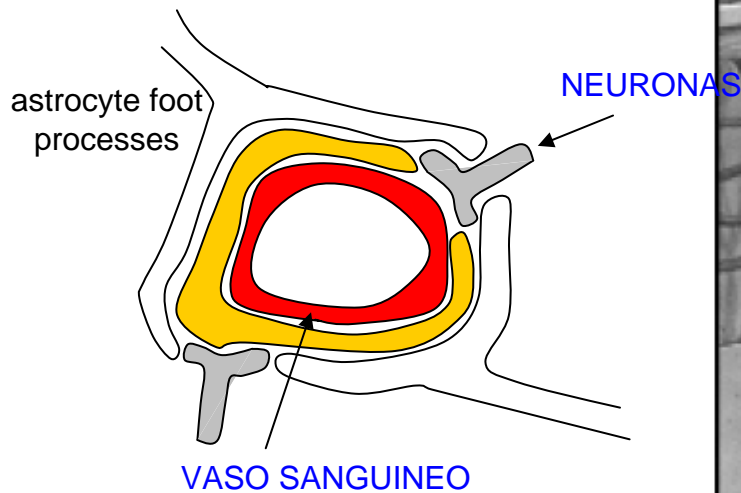
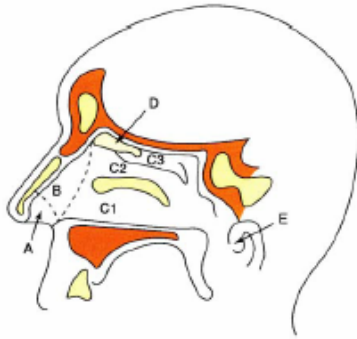
ASBESTOS: QUIEBRE  
LONGITUDINAL: > AREA



FIBRAS AMORFAS: SE  
QUIEBRAN  
CORTÁNDOSE



LA BIODURABILIDAD DE NANOFIBRAS (DIÀMETRO < 100 nm) SERÌA SIMILAR A LA DE FIBRAS DE MAYOR DIÀMETRO



Blood-brain barrier flux of  
aluminum,  
manganese, iron and other metals  
suspected  
to contribute to metal-induced  
Neurodegeneration  
Journal of Alzheimer's Disease 10  
(2006) 223–253  
Robert A. Yokel

MUCOSAS EN GENERAL



A summary of the reported and hypothesized mechanisms of brain influx and efflux of metals suspected of contributing to neurodegenerative diseases

Metal	The mechanism(s) of brain influx	The mechanism(s) of brain efflux
Al	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport, perhaps of Al transferrin by transferrin-receptor mediated endocytosis at the BBB.</li> <li>– Transport, perhaps of Al citrate by system Xc<sup>-</sup> at the BBB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport, presumably as Al citrate at the BBB.</li> </ul>
Cu	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport, thought to be mediated by ATP7A and perhaps ATP7B and CTR1 at the BBB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport by ATP7A.</li> </ul>
Fe	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport of Fe transferrin by transferrin-receptor mediated endocytosis at the BBB.</li> <li>– Transport by non-transferrin-dependent mechanisms at the BBB.</li> <li>– DMT1 plays a role in brain Fe uptake at the BBB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– There is no evidence for transporter-mediated efflux.</li> </ul>
Pb	<ul style="list-style-type: none"> <li>– By a passive process for PbOH<sup>+</sup> at the BBB.</li> <li>– Perhaps by store-operated cation channels at the BBB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Appears to be mediated by an ATP-dependent Ca pump (ATPase)</li> </ul>
Mn	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Perhaps as the Mn ion by store-operated Ca channels, at the BBB.</li> <li>– Transport of Mn transferrin by transferrin-receptor mediated endocytosis at the BBB.</li> <li>– Transport of Mn citrate at the BBB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Diffusion</li> </ul>
Hg	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport as a MeHg-L- cysteine complex by the L-system.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– No reported studies have addressed this.</li> </ul>
Sn	<ul style="list-style-type: none"> <li>– No reported studies have addressed this.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– No reported studies have addressed this.</li> </ul>
Zn	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport, perhaps by Zip1 or Zip6 at the BBB.</li> <li>– Transport, perhaps by a ZnT from the choroid plexus to CSF.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Transport perhaps by ZnT1 at the BBB.</li> </ul>

¿Que deberíamos hacer para asegurar la ausencia de toxicidad de los nano objetos?

Nuevo paradigma de toxicidad: nanotoxicidad

TOXICIDAD nano objetos NO PUEDE  
INFERIRSE A PARTIR DE MATERIAL  
*MACRO O MICRO*

TOXICIDAD nano objetos NO PUEDE  
INFERIRSE A PARTIR DE MASA DE  
MATERIAL

**NUMERO Y TAMAÑO**



1- ¿Cuales nano objetos deberían ser testeados?

Grandes cantidades

Libremente dispersables

Potencialidad de exposición a humanos y medio ambiente

2- ¿Qué tipos de *tests* deberían llevarse a cabo?

Modelo científico-predictivo, mediado por  
mecanismo fundamentado en observaciones  
biológicas

NTP: National  
Toxicology  
Program

BASADO EN DATOS PRE-EXISTENTES

GOAL de ensayos predictivos: limitar demanda de estudios *in vivo* (costos y empleo de animales)

## Screening estratégico de nanotoxicidad:

### Caracterización fisicoquímica

**TAMAÑO :** área superficial, población

**COMPOSICIÓN QUÍMICA:** pureza, cristalinidad, prop electronicas

**ESTRUCTURA SUPERFICIAL:** reactividad superficial, n grupos superficiales, *coatings* inorgánicos / orgánicos

**SOLUBILIDAD**

**FORMA**

### Ensayos *in vitro* (en ausencia y presencia de células)

**AUSENCIA DE CÉLULAS:**

Interacción con proteínas

Actividad pro-oxidante

**PRESENCIA DE CÉLULAS:**

Portales de entrada

### Ensayos *in vivo*

**MODELOS ANIMALES:** portal de entrada, injuria de órganos *target*

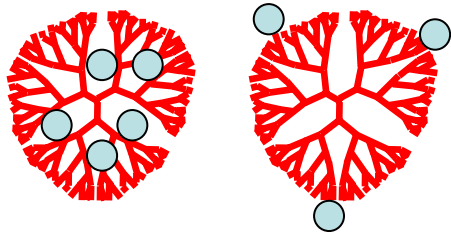
ADME

NO NECESARIAMENTE PREDICTIVO DE BIOCOMPATIBILIDAD

Ejemplo aplicado a  
nano objetos de  
uso terapéutico, en  
suspensión líquida



## 1-RELACION DROGA/DENDRIMERO



5 DROGA / 1 DENDRIMERO    3 DROGA / 1 DENDRIMERO

1a-REPRODUCIBILIDAD

1b-FACTIBILIDAD ESCALADO

5- NATURALEZA DE  
ASOCIACIÓN DROGA-  
DENDRIMERO:

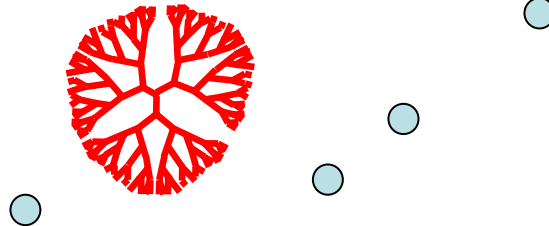
ELECTROSTATICA +/-

-H-

COVALENTE

## CARACTERIZACION CUANTITATIVA

2- ESTABILIDAD FRENTE A  
CONDICIONES EXTERNAS  
(DILUCION, Ph, T, FUERZA  
IONICA)



SE LIBERA X EN Y CONDICION

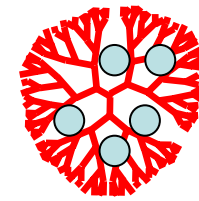
## CARACTERIZACION CUALITATIVA

6-ENSAYOS PREDICCION *IN*  
*VITRO* DE PERFORMANCE *IN*  
*VIVO*  
EN PRESENCIA DE CELULAS

6a- TOXICIDAD SOBRE  
DIFERENTES LINEAS  
CELULARES POR  
DIFERENTES METODOS

6b- TRANSITO  
INTRACELULAR:  
MECANISMOS DE ENTRADA

6-c EFICACIA *IN VITRO*



3-TAMAÑO  
Y TIPO DE POBLACION

4-POTENCIAL Z

7-BIOCOMPATIBILIDAD

**¡¡*IN VIVO*!!**

¿Cuales pueden ser los riesgos de no  
caracterizar apropiadamente las  
nanomedicinas?

4 MOLECULAS DENDRIMEROS

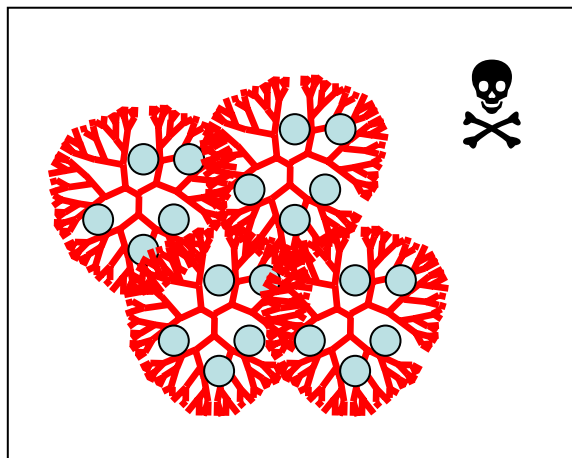
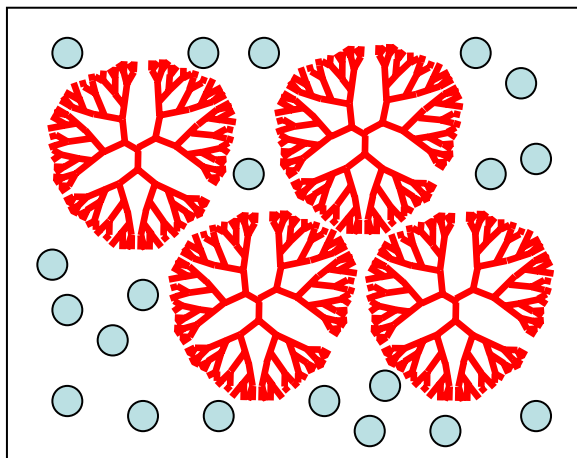
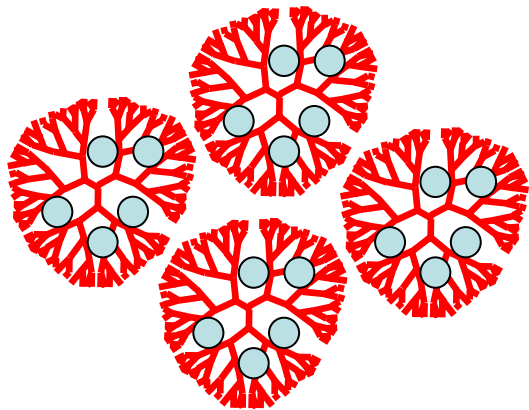
20 MOLECULAS DROGA

1  $\mu$ l BUFFER TRIS 10 Mm pH 7,4

5 DROGA/1 DENDRIMERO

Tamaño complejo: 4,5 nm (monodisperso,  
light scattering, modo medicion de area)

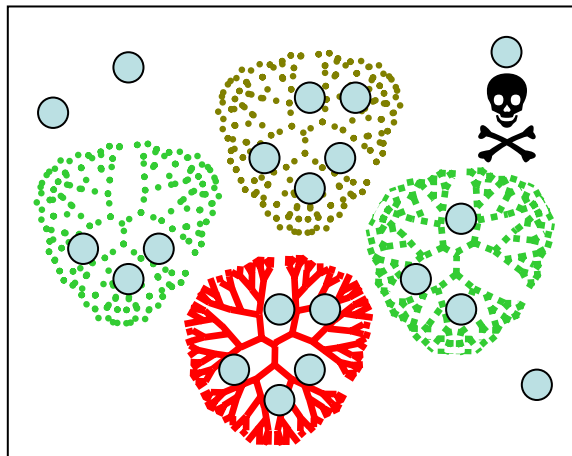
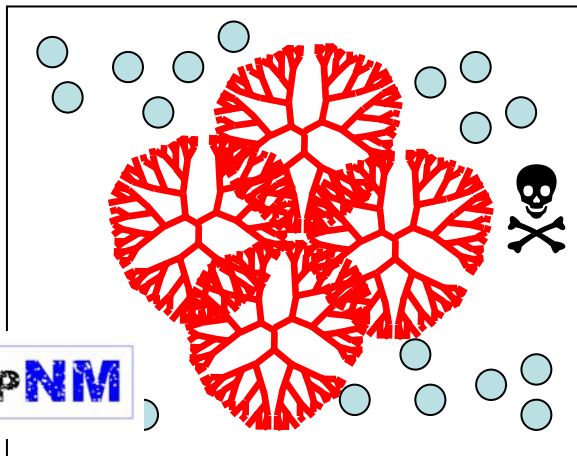
Potencial Z: -60 mV



## CAMBIOS EN ALMACENAMIENTO O DURANTE LA ADMINISTRACIÓN

20 MOLECULAS DROGA

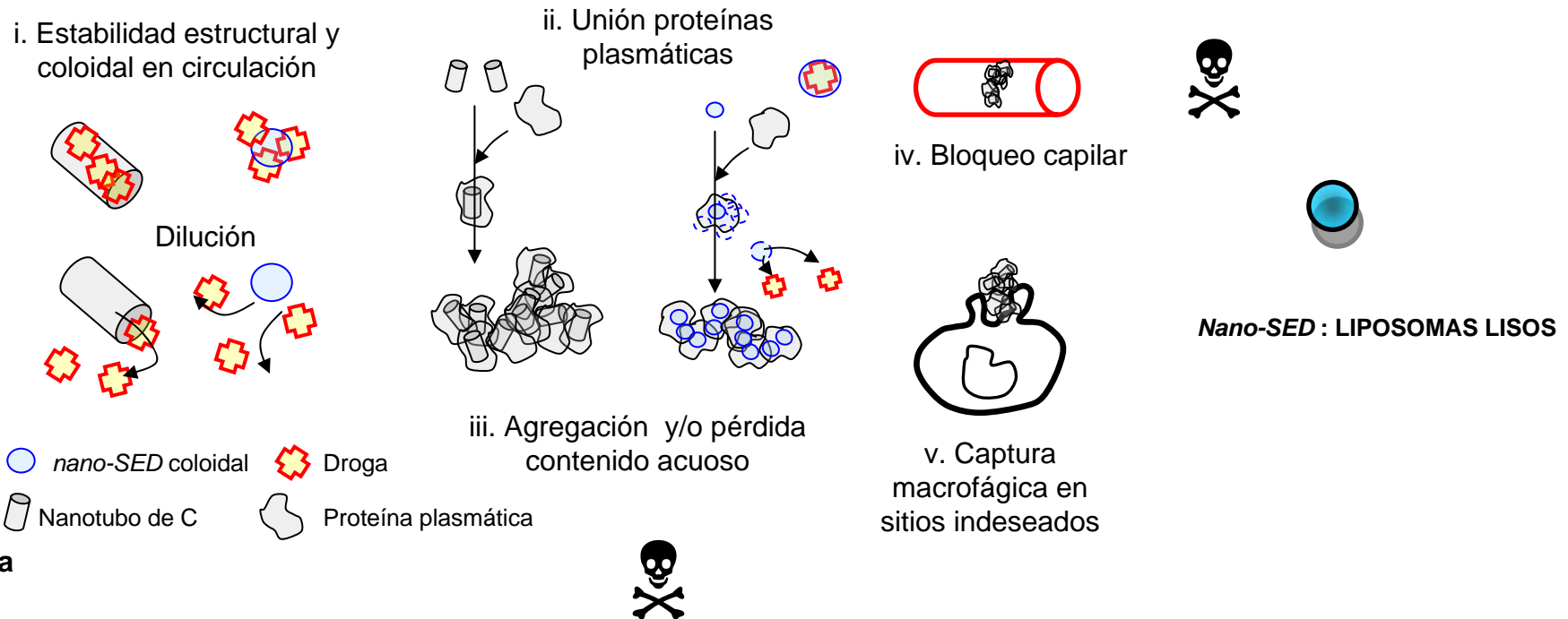
1  $\mu$ l BUFFER TRIS 10 Mm pH 7,4



Material safety data  
sheets (MSDS)  
adecuados:

Ejemplo: MSDS  
productos  
conteniendo NTC, se  
refieren a grafito

¿Cuales pueden ser los riesgos de desconocer  
apropiadamente la naturaleza de la interacción entre  
nano-SED y entorno biológico?



## ESTABILIDAD COLOIDAL Y MECÁNICA EN CIRCULACIÓN



## Herramientas para **desarrollo** de drug delivery **nanomedico** en laboratorio de investigación

<p><b>Desarrollo de técnicas analíticas validadas para confirmar estructura y estabilidad de nano-sistemas de <i>delivery</i></b></p> <p>Ej: capacitación para medición de partículas en rango nanométrico, medición potencial Z HPLC, HPLC-masa, técnicas quimioenzimáticas, ELISA, etc, espectroscopias diversas orientadas a la cuantificación de analitos en el nano-rango.</p>	<p><b>Desarrollo y manejo de sistemas <i>in vitro</i> para estudio de toxicidad de nano-sistemas de <i>delivery</i>(*)</b></p> <p>Ej: cultivos de macrófagos, fibroblastos, cultivo de neuronas</p>	<p><b>Manejo de sistemas <i>in vitro</i> para seguimiento de rutas intracelulares de nano-sistemas de <i>delivery</i> (*)</b></p> <p>Ej: microscopia de fluorescencia, simple o confocal seguimiento de mecanismos y rutas de biodistribución intracelular de drogas y de nano-sistemas de <i>delivery</i></p>	<p><b>Desarrollo y mantenimiento de sistemas modelo para percibir cruce de barreras de nano-sistemas de <i>delivery</i>(*)</b></p> <p>Ej: Caco-2 con o sin mucinas; cultivos tridimensionales de piel, células de Franz, métodos ad-hoc.</p>	<p><b>Sistemas <i>in vivo</i> para determinar biocompatibilidad y eficacia terapéutica de nano-sistemas de <i>delivery</i>(*)</b></p> <p>Ej: técnicas básicas de crianza y cirugía de animales de laboratorio (ratas y ratones)</p>	<p><b>Expertise farmacéutico para interpretación de farmacocinética y biodistribución de drogas y nano sistemas de <i>delivery</i></b></p> <p>Ej: interpretación de parámetros farmacocinéticos clásicos y uso de programas para aplicación de modelos estadísticos <i>ad-hoc</i></p>	<p><b>Desarrollo de formas farmacéuticas adecuadas para nano-sistemas de <i>delivery</i></b></p> <p>Ej: técnicas farmacéuticas clásicas aun no adaptadas a la formulación de nano-sistemas</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(\*) De acuerdo a especificaciones y acciones sugeridas en Scientific Trends descripto en Recommendations and Suggested Actions del ESF Forward Look on Nanomedicine-2005, sponsored by the European Science Foundation (ESF) and organized by its Standing Committee, the European Medical Research Council (EMRC)

## CONCLUSIONES:

1. No todos los nano objetos son nanopartículas ingenierizadas (NPI)
2. El mayor riesgo está constituido por NPI
3. Debe profundizarse y difundirse el conocimiento de los efectos tóxicos, para:
  - señalar
  - descartarpotenciales candidatos a causar toxicidad
4. Frente a la posibilidad, ejecutar esquemas de *screening* de toxicidad y hacerlos públicos
5. Explicitar naturaleza NPI de componentes en información técnica de materiales (no bulk)

...gracias!



Programa **Nano MEDICINAS**