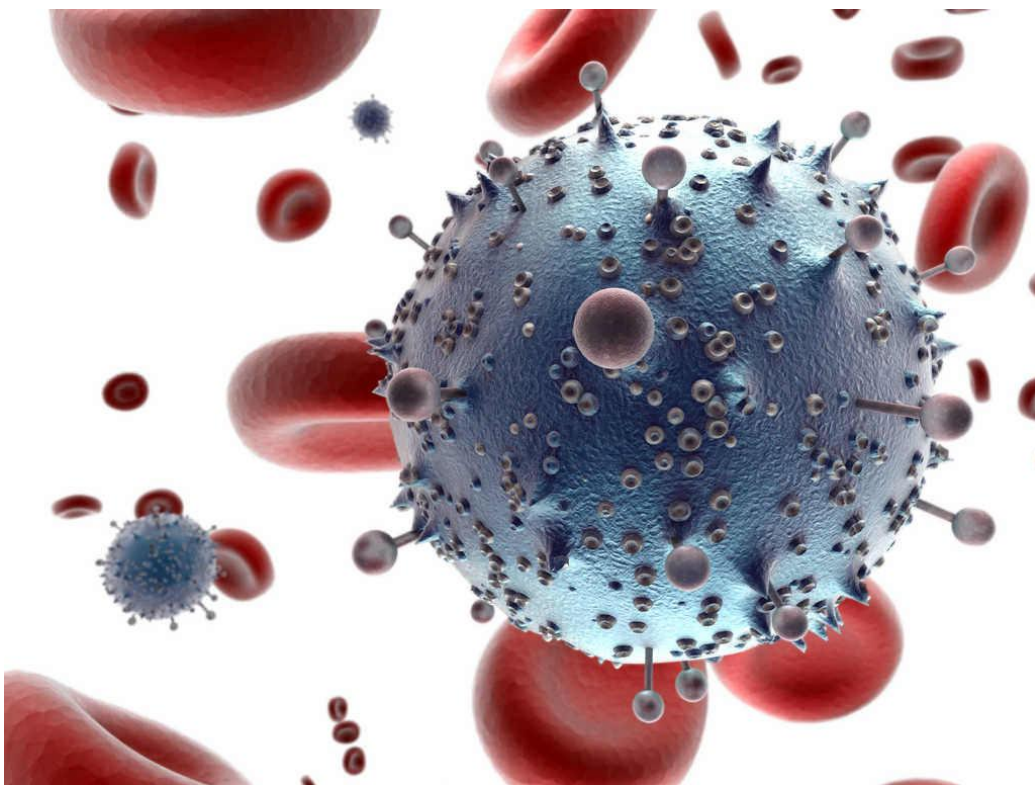




ESTUDIO PRELIMINAR DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS PARA TARGET ACTIVO DE UN FIBRINOLÍTICO



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Irene Fernández Pérez



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Farmacia

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

ESTUDIO PRELIMINAR DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS PARA TARGET ACTIVO DE UN FIBRINOLÍTICO

Alumna: Irene Fernández Pérez

Fecha de presentación: Diciembre 2018

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia, Sevilla

Trabajo Experimental

Departamento: Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: Josefa Álvarez Fuentes

RESUMEN

El presente trabajo se encuadra en un campo actualmente emergente, como es el campo de la nanomedicina. Concretamente, se trata de un estudio preliminar basado en el diseño y desarrollo de nanopartículas que servirán como sistema de administración de un fármaco fibrinolítico, el cual se quiere direccionar activamente hacia los trombos patológicos formados por el proceso de la coagulación sanguínea.

Para ello, se han sintetizado varios lotes de nanopartículas de PLGA usando distintos polímeros (Resomer® 504H y PLGA-PEG) y cantidades y concentración de fármaco, el rtPA (Actilyse®).

La síntesis se ha llevado a cabo mediante el Método de Doble Emulsión con Evaporación de Disolvente, obteniéndose partículas de un tamaño nanométrico adecuado que ronda los 200 - 300 nm, estrechas distribuciones de tamaño y potencial zeta negativo.

Los ensayos realizados de eficacia de encapsulación del fármaco parecen dar buenos resultados, observándose una máxima eficacia para las partículas de PLGA-PEG cargadas al 5 % p/p (activo/polímero), de un 97 %.

Para llevar a cabo el estudio preliminar del diseño de estas nanopartículas para el direccionamiento a los coágulos, se ha utilizado el pentapéptido CREKA para la funcionalización superficial de las mismas, realizándose así un proceso de bioconjugación. Se ha observado un ligero aumento en el tamaño medio de las partículas y en los valores de Pdl, mientras que los datos de carga superficial obtenidos nos muestran una posible mejor eficacia de conjugación para las partículas de PLGA-PEG. Sin embargo, estos datos de bioconjugación son muy preliminares.

PALABRAS CLAVE

Nanopartículas, trombosis, rtPA, direccionamiento, PLGA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Nanomedicina.....	2
1.2. Nanopartículas como sistemas de administración de fármacos.....	3
1.2.1. <u>Elección del método de síntesis de nanopartículas poliméricas</u>	6
i. <i>Método de doble emulsión</i>	6
ii. <i>Otros métodos de síntesis</i>	8
1.3. La coagulación sanguínea: hemostasia y trombosis.....	9
1.4. Nanosistemas de aplicación en trombosis.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Materiales.....	16
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. <u>Preparación de las nanopartículas</u>	18
3.2.2. <u>Caracterización de las nanopartículas</u>	20
i. <i>Tamaño y distribución del tamaño</i>	20
ii. <i>Carga eléctrica superficial</i>	21
iii. <i>Eficacia de encapsulación</i>	21
3.2.3. <u>Bioconjugación de las nanopartículas</u>	22
i. <i>Eficacia de conjugación de las nanopartículas</i>	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas sintetizadas.....	24
4.1.1. <u>Tamaño y distribución de tamaños (Pdl)</u>	24
4.1.2. <u>Carga eléctrica superficial: Potencial zeta</u>	27
4.1.3. <u>Eficacia de encapsulación del fármaco</u>	28
4.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas conjugadas con CREKA.....	29
4.2.1. <u>Tamaño y distribución de tamaños (Pdl)</u>	29
4.2.2. <u>Carga eléctrica superficial: Potencial zeta</u>	31
4.2.3. <u>Eficacia de conjugación de las nanopartículas</u>	31
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34
7. ANEXO: Abreviaturas y acrónimos, índice de tablas, figuras y ecuaciones.....	39

INTRODUCCIÓN

1.1 . Nanomedicina

El concepto de “nanociencia” nació en 1959 gracias a Richard Feynman, quien en un congreso de la sociedad americana de Física expuso la pionera idea de crear nuevos materiales mediante la manipulación y el reordenamiento de átomos y moléculas (Feynman, 1960).

Actualmente la nanotecnología es una novedosa área de la ciencia, la cual estudia y desarrolla sistemas a escala nanométrica. Se refiere a dimensiones muy pequeñas, tales como que un nanómetro equivale a 10^{-9} metros ($1 \text{ nm}=10^{-9} \text{ m}$) (Grieneisen y Zhang, 2011). El mayor interés de la nanotecnología reside en que las propiedades de estos nuevos materiales son distintas a las que tienen a escala macroscópica.

Esta ciencia ha sido útil en diversos campos; como el de la alimentación, los materiales, la energía, la comunicación... aunque donde más se ha avanzado en los últimos años ha sido en el área de la medicina y la biología. De este modo ha surgido, como campo de conocimiento independiente, la “nanomedicina”, gracias a la cual se están desarrollando nuevos métodos de diagnóstico y numerosos avances en la prevención y tratamiento de enfermedades (Rojas-Aguirre et al., 2016).

La nanomedicina ha implicado la aplicación de la nanotecnología al mundo de la farmacia, contribuyendo a la creación de nuevos modos de administración de medicamentos y el empleo terapéutico de fármacos o activos capaces de actuar de un modo mucho más específico y selectivo.

De este modo, entre los avances de la nanomedicina, se encuentra el desarrollo de los nanosistemas de liberación de fármacos y direccionamiento de los mismos. Estos sistemas actúan transportando los fármacos a través del organismo, protegiéndolos de la degradación prematura no deseada a la vez que se facilita su difusión a través de las barreras biológicas y, por lo tanto, favoreciendo el acceso a las células diana (Aboelhassan et al., 2017; Al Thaher et al., 2017).

El nacimiento de estos nanosistemas está suponiendo una serie de ventajas (Suri et al., 2007) relacionadas con determinadas problemáticas de los medicamentos tradicionales (tabla 1):

PROBLEMA	EFFECTO DEL NANOSISTEMA
Baja solubilidad	Proporcionan al medicamento un ambiente hidrofóbico e hidrofílico, aumentando así su solubilidad (ej: micelas o liposomas).
Daño del tejido al producirse la extravasación	La dispensación regulada de los sistemas de liberación puede disminuir o eliminar el daño a los tejidos producido por la extravasación accidental.
Baja biodisponibilidad	Protegen al fármaco frente a la degradación prematura o pérdida de actividad, posibilitando incluso el empleo de dosis menores.
Poca especificidad	Posibilitan una especificidad de acción y ayuda a reducir los efectos secundarios que se puedan producir y el daño en órganos o tejidos sanos.
Falta de selectividad para tejidos	Los sistemas de liberación pueden aumentar la concentración del medicamento en el tejido diana.

Tabla 1. Soluciones aportadas por la nanomedicina a los problemas que surgen en el uso de los fármacos tradicionales.

Estas ventajas que presentan los nanosistemas están haciendo realidad numerosos avances médicos, tales como el direccionamiento de proteínas, fármacos y genes, la administración vía oral de principios activos que anteriormente sólo podían administrarse por vías más invasivas, y el desarrollo de otras posibles vías de administración (como la nasal u ocular) (Wang et al., 2011).

1.2. Nanopartículas como sistemas de administración de fármacos

En los últimos años, el uso de las nanopartículas ha ido creciendo sobretudo en el ámbito de la biología y la medicina (Xu et al., 2007).

Las nanopartículas son estructuras sólidas y esféricas, de muy pequeño tamaño que rondan desde los 100 nm a los 400 nm. La síntesis de nanopartículas seguras para el organismo requiere el cumplimiento de ciertos requisitos con respecto al elemento usado como soporte:

- Deben ser esterilizables y biocompatibles con el tejido diana.
- Sus productos de degradación deben ser solubles en el medio fisiológico.
- Debe provocar la mínima reacción posible.
- No deben ser mutágenos, carcinógenos, antigénicos, tóxicos ni teratogénicos.

Las nanopartículas pueden utilizarse como forma de administración de una gran diversidad de fármacos, entre los que se incluyen fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos de pequeño tamaño, pero también vacunas y macromoléculas biológicas. Otra ventaja del uso de nanopartículas es que permiten ser dirigidas hacia una diana concreta, la cual puede ser un órgano o célula, además, a día de hoy es posible hacer una liberación controlada del fármaco (Mirakabad et al., 2014).

Para conseguir un buen diseño de nanopartículas se necesita controlar:

- El tamaño de la partícula,
- Las propiedades de la superficie de la partícula, y
- La liberación de los agentes farmacológicamente activos.

De este modo, se lograría la acción del principio activo en el sitio específico a la velocidad y régimen de dosis terapéuticamente óptimos.

Según su composición, las nanopartículas se pueden dividir en dos grandes grupos: nanopartículas orgánicas y nanopartículas inorgánicas; los cuales a su vez engloban una gran variedad de tipos. A continuación (tabla 2), se resumen algunas de las nanopartículas más destacadas (Oropesa y Jáuregui, 2012):

NANOPARTÍCULAS ORGÁNICAS	NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS
Poliméricas	NPs de Óxidos de Hierro
Liposomas	NPs de Oro
Micelas	Nanotubos
Dendrímeros	Puntos cuánticos

Tabla 2. Clasificación de nanopartículas según su composición; y ejemplos destacables de cada tipo.

Respecto a las nanopartículas poliméricas (NPs), los polímeros ofrecen variedad en el diseño de sistemas, la forma y el tamaño pueden controlarse de forma efectiva, y la superficie puede ser modificada para crear targets selectivos (Wickline et al., 2006).

Existen diversos polímeros para la preparación de NPs; sin embargo, son pocos los que logran cumplir los requisitos de biodegradabilidad y biocompatibilidad para el organismo. De este modo, los polímeros más usados por los investigadores de las áreas de la biología y la medicina son los sintéticos, debido a que los biomateriales naturales no suelen cumplir con alguno de los requisitos antes comentados (Grabruker et al., 2016).

Otros ejemplos de nanopartículas orgánicas son los liposomas, los cuales se componen de membranas de bicapa lipídica formando una vesícula que contiene un interior acuoso.

También existen las micelas, químicamente distintas a los liposomas, que se forman por la emulsión de la mezcla “aceite en agua” (O/A) y estabilizada con un emulgente.

Por último, dentro de las nanopartículas de carácter orgánico, encontramos los dendrímeros, cuya estructura consiste en una ramificación alrededor del núcleo central que da lugar a un patrón geométrico tridimensional casi perfecto, de configuración globular (Oropesa y Jáuregui, 2012).

Como nanopartículas inorgánicas destacan: i) las metálicas como las nanopartículas de óxidos de hierro, las cuales se han usado frecuentemente como agentes de direccionamiento de fármacos; ii) las nanopartículas de oro, empleadas tanto como agente terapéutico como de imagen; iii) los nanotubos de carbono, interesantes debido a su estructura flexible y su potencial uso como excipiente farmacéutico, y iv) los puntos cuánticos, que son nanocristales coloidales semiconductores con un diámetro de 2 a 10 nm (Wickline et al., 2006; Oropesa y Jáuregui, 2012).

La figura 1 se muestra los principales tipos de nanopartículas anteriormente descritas.

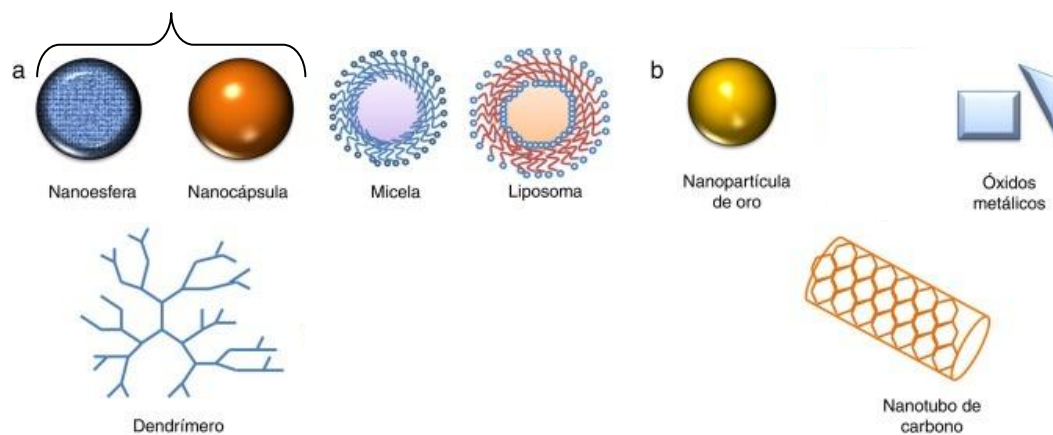


Figura 1. Principales tipos de nanopartículas (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Este trabajo se centra en la utilización de NPs para la vehiculización de activos. Por ello, se describen a continuación algunos de los procedimientos usados para la elaboración de las mismas.

1.2.1. Elección del método de síntesis de nanopartículas poliméricas

Para elegir qué técnica de elaboración de NPs es la más adecuada para cada caso, hay que basarse en las características fisicoquímicas del polímero que formará las NPs, y del principio activo que se encontrará encapsulado dentro de las mismas.

Además, es conveniente considerar otros factores:

- la actividad biológica del principio activo debe mantenerse durante todo el proceso de encapsulación;
- la técnica debe ser reproducible y generar un sistema que posibilite una liberación adecuada del fármaco;
- en el intervalo de tamaño de partícula deseado debemos obtener un adecuado rendimiento de producción;
- debe conseguirse una alta eficacia de encapsulación;
- debe obtenerse un sistema nanométrico libre de aglomerados de nanopartículas.

i. Método de Doble Emulsión

Una de las técnicas más usadas para la síntesis de NPs es el Método de Doble Emulsión, también llamado Método de Evaporación de Disolvente-Doble Emulsión, muy frecuentemente usando como polímero el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Este método está indicado para la encapsulación de fármacos solubles en agua, péptidos, proteínas o vacunas (Mirakabad et al., 2014).

Esta técnica, ilustrada de modo esquemático en la figura 2, origina una emulsión $A_1/O/A_2$ donde el fármaco, que tiene naturaleza hidrófila, queda contenido en la fase acuosa interna (A_1), los polímeros en un disolvente orgánico en la fase oleosa (O), y por último se encuentra la fase acuosa externa (A_2). El disolvente tiene que ser eliminado por evaporación ya que es tóxico para el organismo humano; además, de este modo se consigue aumentar la viscosidad de la fase interna y seguidamente se procede al aislamiento de las NPs (Lamprecht et al., 2000).

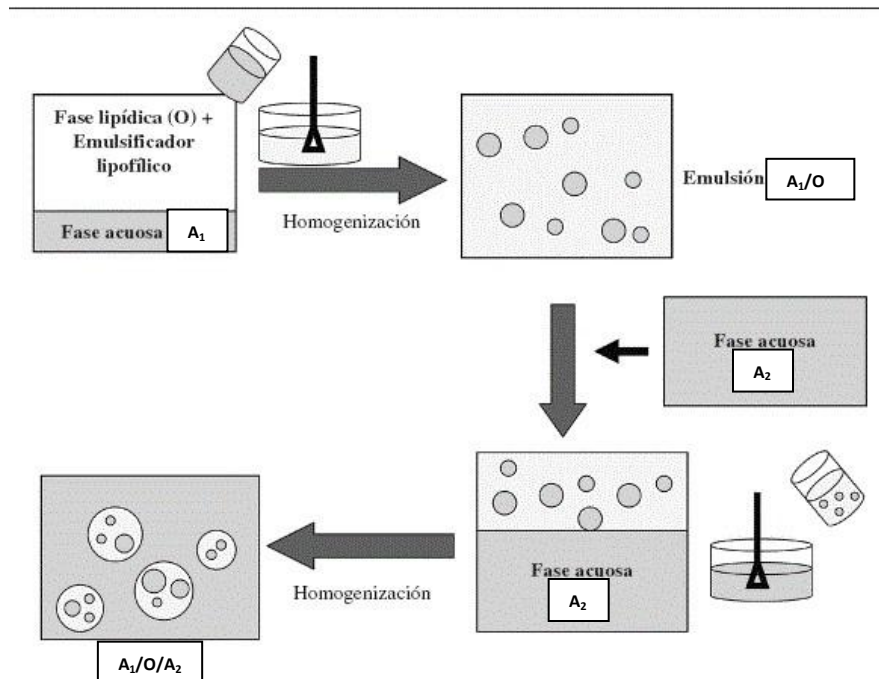


Figura 2. Esquema del procedimiento a seguir en el Método de Doble Emulsión

Es un método reproducible respecto al rendimiento y a la distribución de tamaños (Chiba et al., 1997; Kim et al., 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta numerosos factores y controlarlos adecuadamente, ya que van a influir directamente sobre las propiedades y características de las NPs obtenidas (Wakiyama et al., 1981; Suzuki y Prize, 1985; Tice y Gilley, 1985; Rosilio et al., 1991):

- El disolvente orgánico utilizado,
- La temperatura de evaporación de dicho disolvente,
- La naturaleza y cantidad de emulsionante,
- La naturaleza y solubilidad del principio activo,
- La relación de volumen de la fase orgánica y acuosa,
- La relación de principio activo y polímero,
- La estructura y masa molecular del polímero, y
- El tipo y velocidad de agitación.

A continuación (tabla 3), se describen algunas características de los disolventes y los efectos del emulsionante utilizados en el proceso de doble emulsión de síntesis de NPs.

DISOLVENTE	EMULSIONANTE
Debe ser inmisible en el medio de dispersión	Disminuye la coalescencia y la coagulación, estabilizando el sistema
El punto de ebullición ha de ser menor que el del medio de la otra fase si éste se elimina por evaporación	Cubre y mantiene la forma esférica de la gota durante la evaporación del disolvente, evitando la agregación hasta que las microesferas se endurecen

Tabla 3. Características del disolvente y el emulsionante que se usan durante la elaboración de NPs mediante el Método de Doble Emulsión.

Los disolventes más usados son el acetato de etilo (AE) y el diclorometano por su baja toxicidad, su rápida evaporación y su excelente habilidad para disolver polímeros; mientras que los emulsionantes más empleados son el alcohol polivinílico (PVA), la gelatina, la metilcelulosa, el polisorbato, el Span® y la lecitina.

La concentración requerida de emulsionante y la efectividad de cada uno se determina experimentalmente.

El PVA presenta unas propiedades idóneas para las NPs de PLGA; como son una alta viscosidad en medio acuoso, una fuerte adsorción sobre las gotas y una gran capacidad estabilizadora de la emulsión (Feng y Huang, 2001).

ii. Otros métodos de síntesis

Considerando los diversos métodos de elaboración de NPs; la organización estructural de las partículas será diferente dependiendo del proceso que se lleve a cabo (Mirakabad et al., 2014).

El *Método de Emulsión Simple* suele ser utilizado cuando la naturaleza del fármaco que se va a encapsular es hidrofóbica, como por ejemplo los esteroides. Consiste en crear una emulsión de fase interna oleosa y fase externa acuosa (O/A) (figura 3).

En esta técnica el polímero va disuelto en un disolvente orgánico, formándose de este modo el medio en el que se encuentre el principio activo. Por último, se emulsiona con una fase acuosa utilizando surfactantes (Mirakabad et al., 2014).

Este tipo de emulsiones simples O/A son interesantes ya que suponen ahorro y simplificación en el proceso de producción debido al uso del agua como no solvente a eliminar.

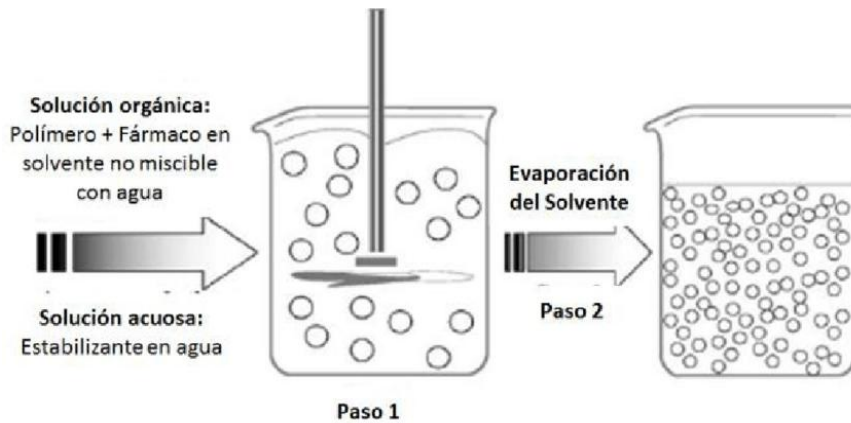


Figura 3. Esquema del procedimiento a seguir en el Método de Emulsión Simple (Mirakabad et al., 2014).

Otro conocido método es el de *Nanoprecipitación*, también conocido como el “Método de Desplazamiento de Solvente” (Fessi et al., 1989; Dinarvand et al., 2011). Ha sido ampliamente utilizado para encapsular fármacos de naturaleza hidrofóbica, pero actualmente también se utiliza para los hidrófilos. En esta técnica se utilizan tres componentes fundamentales: el polímero, el disolvente del polímero y el no solvente del polímero (Thioune et al., 1997). El polímero y el activo se encuentran disueltos en un disolvente polar como el etanol, y esta mezcla se añade gota a gota en una solución acuosa con surfactante (Mirakabad et al., 2014).

1.3. La coagulación sanguínea: hemostasia y trombosis

La interrupción del flujo sanguíneo normal al corazón, pulmón y cerebro es una de las principales causas de muerte y de discapacidad adulta en el mundo occidental. La trombosis, formación de un coágulo de sangre en un vaso sanguíneo, puede ser una de las causas de esta obstrucción (Korin et al., 2012).

La trombosis, caracterizada por la acumulación de plaquetas y la fibrina inducida por la activación de los factores de coagulación, es un proceso regulado por la hemostasia entre la coagulación sanguínea (figura 4) y la fibrinólisis.

Cuando hay un desequilibrio en ese sistema hemostático, se pueden formar trombos que ocluyen el flujo sanguíneo dando lugar a peligrosos síndromes cardiovasculares como el infarto de miocardio, la embolia pulmonar o el accidente cerebrovascular (McCarthy et al., 2009; McCarthy et al., 2012).

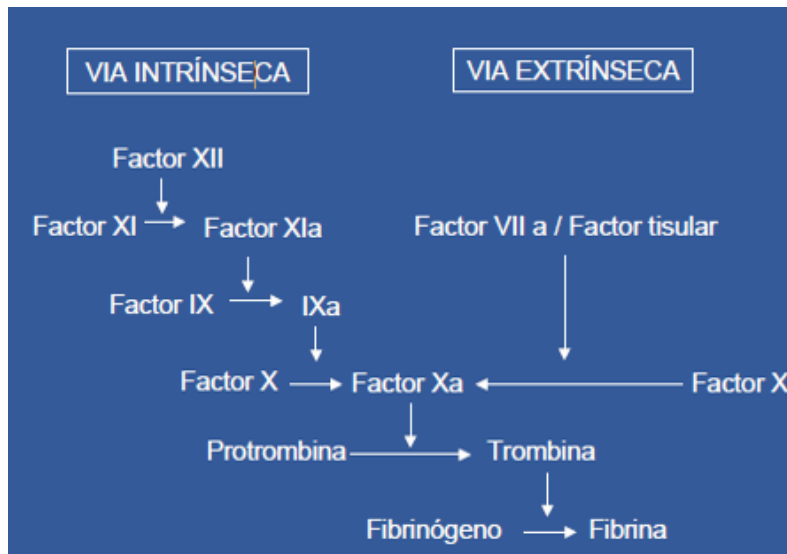


Figura 4. Esquema del proceso de coagulación sanguínea

El proceso de trombosis puede comenzar debido a un daño en la capa endotelial de un vaso sanguíneo, que como consecuencia pone en contacto el tejido subendotelial con los elementos de la coagulación; que se adhieren y forman un tapón hemostático inicial que se va fortaleciendo con la deposición de fibrina insoluble y otros factores de coagulación (Song et al., 2014).

Otras causas de la formación de trombos pueden ser la estasis venosa o ralentización del flujo sanguíneo venoso, o la estenosis o estrechamiento de la luz vascular.

Es así como, de un modo u otro, la fibrina juega un papel importante en el proceso trombótico. Es por ello que los coágulos, al contener una importante cantidad de fibrina, se convierten en una diana perfecta para la detección e incluso el tratamiento de microtrombos. La detección temprana de estos microtrombos es muy importante para evitar la formación posterior de trombos visibles y la consecuente generación de la enfermedad cardiovascular (Song et al., 2014).

El tratamiento de la trombosis se basa en la fibrinólisis (figura 5) o disolución de estos coágulos, y restablecimiento del flujo sanguíneo normal, por acción de fármacos fibrinolíticos. Otro tipo de fármacos, los anticoagulantes, se usan como tratamiento preventivo a la formación del trombo y para evitar la progresión y extensión de los ya formados.

Los fármacos fibrinolíticos actúan como activadores directos o indirectos del plasminógeno, dando lugar a la conversión de esta proenzima en su forma activa

(plasmina), que a su vez cataliza la degradación de fibrina o fibrinógeno y la consiguiente disolución del coágulo (McCarthy et al., 2012).

Los fármacos fibrinolíticos pueden subdividirse en activadores “fibrinespecíficos” y “no fibrinespecíficos” (González-Torres et al., 1995).

Los *activadores “no fibrinespecíficos”*, como estreptoquinasa o uroquinasa, actúan convirtiendo en plasmina tanto al plasminógeno plasmático circulante como al unido al coágulo, pudiendo dar lugar a una importante fibrinogenólisis sistémica.

Sin embargo, los *activadores “fibrinespecíficos”*, como el activador tisular del plasminógeno, presentan una relativa selectividad por el complejo plasminógeno-fibrina, de modo que provocan, fundamentalmente, la lisis de la fibrina de la superficie del coágulo, sin afectar teóricamente al fibrinógeno plasmático.

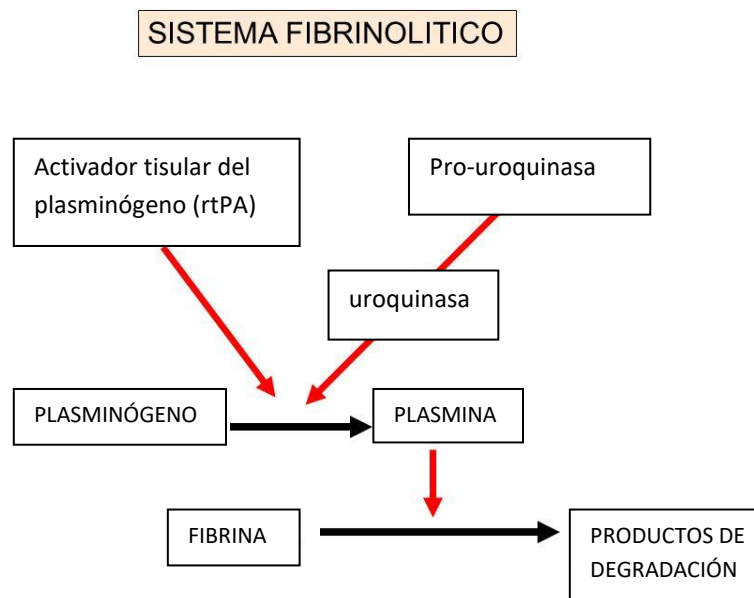


Figura 5. Esquema sistema fibrinolítico. Uroquinasa y rtPA

En algunas investigaciones se ha observado que la administración de factores activadores del plasminógeno acelera el proceso de fibrinólisis, restableciendo rápidamente el flujo sanguíneo en pacientes que sufren alguna alteración cardiovascular (Sivaraman et al., 2016).

Sin embargo, una lisis extremadamente rápida tampoco sería deseable ya que una repentina exposición de la capa subyacente de la pared vascular a las proteasas y otras

células inflamatorias es perjudicial (Sivaraman et al., 2016). Por eso, existe la necesidad de conseguir una fibrinólisis controlada que tenga lugar a una velocidad adecuada.

De ahí la importancia de desarrollar nuevos tratamientos fibrinolíticos que sean potencialmente eficaces y específicos en la unión con la fibrina, consiguiendo disolver los coágulos lo más pronto posible y de este modo disminuir la mortalidad y morbilidad debida a estas enfermedades isquémicas (Rodríguez et al., 2017).

La nanotecnología farmacéutica ha desarrollado nanosistemas como candidatos para lograr este objetivo; se están estudiando incluso nanosistemas para el direccionamiento de principios activos trombolíticos hacia la diana. Esta alta especificidad logra que, por un lado, los efectos colaterales no deseados debido a la administración del fármaco disminuyan y, por otro, que aumente el tiempo de circulación de estos fármacos protegiéndolos frente a la degradación (McCarthy et al., 2012).

1.4. Nanosistemas de aplicación en trombosis

Tradicionalmente, en el tratamiento de la trombosis que puede desencadenar peligrosos síndromes cardiovasculares como la embolia pulmonar, el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular, se suelen utilizar fármacos trombolíticos o fibrinolíticos. Su administración debe ser lo antes posible tras el inicio de los síntomas de embolia para obtener mayor eficacia en la disolución del coágulo o trombo. La dosis de fibrinolítico también es limitada debido al potencial riesgo de sangrado que existe al distribuirse el activo por todo el cuerpo (Korin et al., 2012). Para superar estas limitaciones, se han diseñado sistemas de administración con nanopartículas que dirigen selectivamente al fármaco fibrinolítico hacia donde se encuentren los coágulos, concentrándose únicamente en estas zonas.

De este modo, frente a las formas tradicionales de administración de fármacos, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos como los nanosistemas dirigidos al trombo (“drug targeting”); cuyo objetivo principal es la acumulación del fármaco en el sitio de acción o diana, de forma más o menos selectiva (Torchilin, 2000).

Cuando se administra un fármaco de forma convencional nos encontramos con ciertas limitaciones, las cuales queremos solventar mediante esta nueva técnica de direccionamiento (Torchilin, 2000; Gabathuler, 2010):

- Afinidad. El fármaco puede carecer de afinidad por el lugar específico de acción, sin embargo, mediante el direccionamiento o *drug targeting* podemos conseguir que sea afín.
- Barreras biológicas. Muchos fármacos no son capaces por si mismos de atravesar algunas barreras fisiológicas del organismo (como la barrera hematoencefálica o la pared del tracto gastrointestinal). Con el direccionamiento, podemos conseguir que el fármaco las atraviese y pueda alcanzar el sitio de acción.
- Dosis. Hay ocasiones en las que usando los medicamentos tradicionales se requiere una alta dosis del activo para poder alcanzar la concentración adecuada en la diana. Gracias al direccionamiento específico del fármaco, podemos disminuir la dosis y utilizar únicamente la necesaria.
- Toxicidad. Del mismo modo, el *drug targeting* reduce la toxicidad asociada al exceso de fármaco y disminuye los efectos secundarios no deseados.

Uno de los motivos que explican estas soluciones a los problemas que existían anteriormente, es que las propiedades del fármaco se ven “enmascaradas” por las propias de las nanopartículas que usemos para administrarlo; lo cual es una gran ventaja ya que podemos modificarlas en el laboratorio para conseguir nuestro objetivo. Es decir, una vez encapsulado el activo en la nanopartícula, la distribución por el organismo hasta alcanzar la diana se regirá por las propiedades de la nanopartícula que hayamos sintetizado.

Existen diferentes técnicas de direccionamiento o *targeting*, que se pueden clasificar en *targeting pasivo* y *targeting activo*. La principal estrategia del ***targeting pasivo*** se relaciona con el aumento de la permeabilidad y la retención del principio activo en el lugar de acción, aunque también existen otros mecanismos de *targeting pasivo* que se basan en el empleo de materiales llamados “inteligentes”. Este tipo de materiales que se usan en el *targeting pasivo*, son materiales sensibles a estímulos relacionados con factores fisiológicos como la temperatura y pH (*targeting físico*), a un campo magnético (*targeting magnético*), potencial redox, etc. (Mirakabad et al., 2014).

Otras estrategias de direccionamiento se encuadran en el llamado ***targeting activo***, que consiste en modificar la superficie de las nanopartículas añadiendo moléculas que sean afines a los receptores de la superficie de las células diana. De este modo, se

facilita la endocitosis y la liberación de activos en el interior de la célula (Gabathuler, 2010). Con el uso de este tipo de direccionamiento se modifica la biodistribución favoreciendo la acumulación del fármaco en el lugar de acción y se asegura el efecto farmacológico en el destino deseado, aumentando la especificidad de acción y disminuyendo los efectos secundarios.

Concretamente, en el tratamiento de la trombosis se han investigado formulaciones nanométricas basadas en estas dos diferentes estrategias de direccionamiento:

- **Nanosistemas fibrinolíticos basados en *targeting pasivo*:** utilización de la fuerza de cizalla como mecanismo de targeting hacia los vasos obstruidos, usando nanopartículas sensibles al estrés por esta fuerza (Korin et al., 2012).
- **Nanosistemas fibrinolíticos basados en *targeting activo*:** sistemas nanométricos decorados en su superficie con péptidos, por ejemplo el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) (Chung et al., 2008). Son péptidos de adhesión celular reconocible por proteínas de células plasmáticas y extracelulares, incluyendo el factor Von Willebrand, la fibronectina y el colágeno.

Uno de los mayores retos del *targeting activo* es encontrar un ligando que unido a la superficie de la nanopartícula sea capaz de dirigirla selectivamente hacia la diana terapéutica. Este proceso de modificación superficial de la nanopartícula se denomina bioconjugación.

Uno de los péptidos usados para la bioconjugación es el péptido CREKA (pentapéptidos de Cisteína-Arginina-Ácido Glutámico-Lisina-Alanina) con especial afinidad por el complejo fibrina-fibrinógeno en los vasos sanguíneos, por lo que es de esperar que sirva para el direccionamiento selectivo de las NPs hacia la fibrina que se encuentra en los coágulos (Song et al., 2014). De este modo, el fármaco accede mejor a la diana y en consecuencia se consigue que la lisis de los coágulos sea más eficaz y con menos efectos colaterales.

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se encuadra en el mundo de la nanotecnología y se centra en las enfermedades vasculares potencialmente graves, debidas a obstrucciones de los vasos sanguíneos por coágulos, en los que tiene gran protagonismo la fibrina.

El **objetivo principal** de este trabajo experimental es el desarrollo preliminar de una formulación de un activo fibrinolítico que pueda ser utilizada para llegar a establecer una estrategia de direccionamiento activo basado en una alta afinidad por el complejo fibrina-fibrinógeno presente en los coágulos.

Para ello se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

1. Formular nanopartículas poliméricas a base de ácido poliláctico-co-glicólico, tanto pegilado como sin pegilar.
2. Caracterizar las nanopartículas según parámetros de tamaño y distribución de tamaños, y carga superficial; evaluando la obtención de poblaciones de nanopartículas de tamaños adecuados y homogéneos, con valores de carga superficial adecuados para la estabilidad de las nanopartículas en suspensión.
3. Evaluar el proceso de encapsulación del activo en términos de eficacia de encapsulación.
4. Proponer un método de conjugación de las nanopartículas con un target específico al coágulo.

El empleo de esta estrategia en una terapia fibrinolítica es de gran interés en la medida en que supone grandes ventajas en el tratamiento de la trombosis y en la lisis de los coágulos incipientes; minimizando la dosis de fármaco y la toxicidad asociada al exceso del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Para realizar este estudio, se han usado diversos materiales:

- Polímeros: Resomer® 504H, (Evonik Nutrition & Care GmbH, Alemania), ácido poliláctico-co-glicólico pegilado (PLGA-PEG) (Akina, Inc., Estados Unidos)
- Principio activo: Alteplasa (Actylise®, Boehringer Ingelheim International GmbH, Alemania)
- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Tensioactivo: Alcohol polivinílico (Panreac Química, España)
- Kit de reactivos para análisis de proteínas BCA™ (Thermo Fisher Scientific, Inc, Estados Unidos)
- Disolventes: acetato de etilo (Panreac Química S.A., España), acetonitrilo (VWR International Eurolab, España) y agua purificada (Millipore Milli-Q®, Millipore Ibérica, Madrid)

El **Resomer®** es un copolímero sintético biodegradable sintetizado por polimerización de ácido láctico y ácido glicólico: “x” unidades de ácido láctico e “y” unidades de ácido glicólico (figura 6); siendo ambos dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) que se unen por enlaces tipo éster formando el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (Mirakabad et al., 2014).

Existen distintos tipos de Resomer® se diferencian según los grupos carboxilos libres finales, la viscosidad inherente y sus distintos pesos moleculares. Los PLGA 50:50, como el utilizado en nuestro estudio, son los polímeros más hidrófilos que existen hoy día, y dentro de éstos, la presencia de grupos carboxilos finales hace que tengan aún más aumentado ese carácter hidrofílico (Elkhesheh y Radwan, 2000; Rivera et al., 2004).

El Resomer® 504H es un PLGA en proporción 50:50, con un grupo carboxilo final. Es un polímero sintético muy utilizado para la elaboración de sistemas nanométricos biodegradables. Fue aprobado por la FDA de Estados Unidos para su uso en sistemas de administración de fármacos, ya que es un material que presenta baja toxicidad, alta

biocompatibilidad con los tejidos y células del organismo humano, además de propiedades para una liberación sostenida y controlada (Mirakabad et al., 2014).

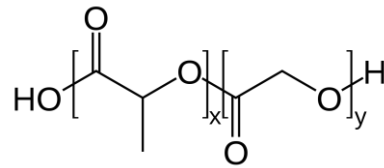


Figura 6. Estructura química de PLGA

Este material presenta una característica muy ventajosa, y es que al hidrolizarse los dos monómeros que lo componen, el ácido láctico y el ácido glicólico, son endógenos del organismo y se incorporan al Ciclo de Krebs para metabolizarse fácilmente (figura 7). De este modo, el polímero terminará siendo eliminado como dióxido de carbono y agua, minimizando la posibilidad de toxicidad sistémica (Gaillard et al., 2005).

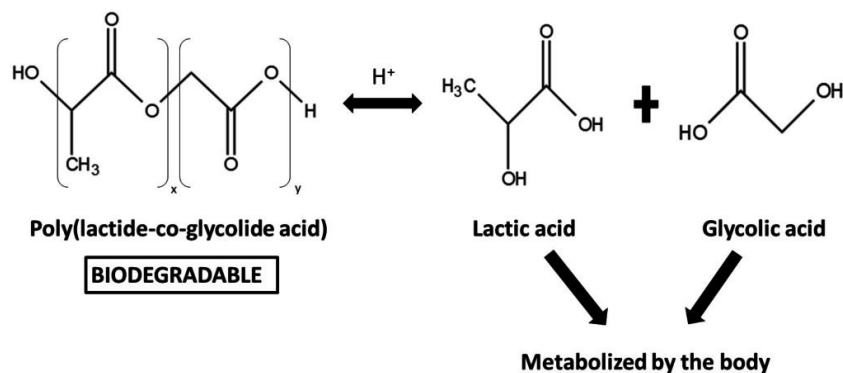


Figura 7. Esquema de la hidrólisis de PLGA

El **PLGA pegilado** (PLGA-PEG) es un copolímero de PLGA al que se unen unidades de polietilenglicol (PEG) (figura 8), esta transformación del PLGA se conoce como “pegilación”. Se obtiene así un poliéter muy utilizado en la industria, también denominado comúnmente como *macrogol*.

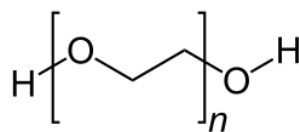


Figura 8. Estructura química de PEG

Al emplear ese PLGA-PEG se consigue modificar la superficie de las NPs elaboradas, aumentando su hidrofilia y haciéndolas menos reconocibles por el sistema reticuloendotelial, de modo que se incrementa el tiempo de circulación de las nanopartículas en el organismo (Martín-Banderas et al., 2013).

Es conocido que las cargas superficiales de las nanopartículas juegan un papel importante en la interacción con las células (Danhier et al., 2012). Las cargas catiónicas suelen ser las más deseadas, ya que favorecen la unión de las nanopartículas con las células; facilitando así que el principio activo encapsulado en las mismas llegue a la diana.

El caso de las NPs de PLGA tienen cargas negativas en su superficie; sin embargo, resulta bastante fácil modificarlas en su superficie si fuera necesario, y de este modo dejarlas neutras o con cargas positivas.

La **alteplasa** es un activador tisular del plasminógeno obtenido por ingeniería genética (rtPA), por tanto con actividad fibrinolítica. Se comercializa como Actilyse®.

La alteplasa es una enzima (glucoproteína) que, cuando se administra, permanece relativamente inactiva en el sistema circulatorio ya que presenta cierta afinidad por el complejo fibrina-plasminógeno del coágulo. Cuando entra en contacto con el coágulo se fija a la fibrina del trombo y transforma el plasminógeno en plasmina, ocasionando una fibrinólisis local con una proteólisis sistémica muy limitada.

El **CREKA** es un pentapéptido lineal (cisteína-arginina-acido glutámico-alanina) con afinidad especial para el complejo fibrina-fibrinógeno (Song et al., 2014). Es por ello que podría usarse para “decorar” las nanopartículas de este trabajo para conferirles una afinidad por la fibrina.

También se ha usado este péptido para el diagnóstico y tratamiento de ciertos tumores que implican una abundante deposición de fibrina (Zhao et al., 2015).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de las nanopartículas

De entre todos los métodos que existen actualmente para la elaboración de NPs y encapsulación de un fármaco en su interior, en este estudio se ha utilizado el Método de Doble Emulsión-Evaporación de disolvente. El principal motivo por el que se ha escogido este método es la naturaleza hidrofílica del principio activo que vamos a

encapsular, ya que en otros estudios similares con fármacos hidrófilos se utiliza este mismo método (Liu et al., 2010; Miesch et al., 2012).

Para ello, además de los polímeros anteriormente nombrados, en este estudio se utilizó como emulsionante una solución acuosa de PVA 0,5 % p/v, como disolvente AE, y como principio activo Alteplasa (rtPA).

El PVA presenta unas propiedades idóneas para las NPs de PLGA; como son una alta viscosidad en medio acuoso, una fuerte adsorción sobre las gotas de la emulsión y una gran capacidad estabilizadora de la emulsión (Feng y Huang, 2001).

Por el método de Doble Emulsión se crea una emulsión $A_1/O/A_2$ en la que el activo, que es hidrófilo, se va a encontrar encapsulado en la fase acuosa más interna (A_1).

Para hacer la doble emulsión, primero se hace una emulsión O/A_1 y después se añade la segunda fase acuosa (A_2), resultando la emulsión final.

En el baño de ultrasonido se gotea una alícuota de solución acuosa de PVA 0,5 % p/v sobre 2 mL de la solución del polímero, Resomer® 504H o PLGA-PEG, en AE, a concentración de 40 mg/mL. En el caso de las formulaciones cargadas de rtPA, se diluye éste en la solución de PVA en la proporción p/p respecto al polímero correspondiente para cada formulación. Tras sonicar durante un minuto, se obtiene una primera emulsión O/A_1 homogénea.

Siguiendo con el procedimiento, se gotea esta primera emulsión O/A_1 recién preparada sobre 10 mL de solución acuosa de PVA 0,5 % p/v (A_2). Este proceso se lleva a cabo en un equipo específico para preparar emulsiones llamado Polytron® PT 2500 E (Polytron, Canadá), homogeneizando a 24,000 rpm durante un minuto.

Una vez formada la doble emulsión, las formulaciones bajo agitación, se disponen en la campana extractora de gases durante dos horas para que se evapore el AE de la fase orgánica. Este proceso es necesario porque este disolvente es tóxico y no puede ser ingerido por el ser humano.

Una vez eliminado el AE, se procede a separar las nanopartículas elaboradas. Para ello, la suspensión preparada se somete a centrifugación, 10,000 rpm durante 45 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 504R, Eppendorf AG, Alemania). Tras este proceso, se obtienen las NPs en el precipitado; se reserva una alícuota del sobrenadante para la cuantificar posteriormente el rtPA no encapsulado, y el resto se elimina.

En el presente estudio se prepararon diferentes formulaciones de NPs considerando las siguientes variables: utilizando como polímeros el Resomer® 504H o el PLGA-PEG; variando la proporción p/p de principio activo respecto al polímero usado (5 y 10 %); y usando diferentes volúmenes de fase acuosa A₁ (50 y 100 µL) y por tanto distinta concentración de la solución fármaco que se pretende encapsular.

Para poder evaluar la influencia de las variables que se pretenden estudiar sobre las características de tamaño de las NPs y la eficacia de la encapsulación del fármaco, se elaboran lotes de NPs blancas sin rtPA en su formulación.

Todos los lotes se elaboraron por triplicado para poder tener una idea preliminar de la reproducibilidad del proceso.

3.2.2. Caracterización de las nanopartículas

Es necesario llevar a cabo la caracterización de las partículas para conocer sus propiedades de tamaño, carga superficial y carga de fármaco, debido a la posible influencia de estos parámetros sobre la biodistribución y acción farmacológica del nanosistema formulados.

Este estudio de caracterización incluye un estudio sobre el tamaño medio y la distribución de tamaños de la población de NPs de cada lote elaborado, y la carga superficial de las NPs, y la eficacia de encapsulación del rtPA.

i. Tamaño y distribución de tamaños

El tamaño y la distribución de tamaños de una población de nanopartículas son características fundamentales que pueden determinar su distribución en el organismo, toxicidad, aplicación biológica e, incluso, su grado de direccionamiento. Además, se pueden relacionar tanto con la carga y liberación del fármaco, como con la estabilidad de las nanopartículas (Bawarski et al., 2008).

El tamaño de las nanopartículas, determinado como las medidas de los diámetros hidrodinámicos (escala nanométrica) así como el índice de polidispersión (Pdl), para definir el grado de homogeneidad de tamaño de las NPs, se llevaron a cabo mediante un equipo de difracción láser *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Para la determinación del tamaño de las partículas este aparato se basa en la medida de la dispersión en diferentes intensidades de la luz láser provocada por el

movimiento browniano de las partículas en suspensión, y la convierte en una medida de tamaño y distribución de tamaños utilizando la relación de Stokes-Einstein (Lerma et al., 2015).

El equipo está configurado para ofrecer una medida de tamaño para cada muestra resultado de un análisis por triplicado.

ii. Carga eléctrica superficial

El Potencial Zeta de las nanopartículas es útil para caracterizar la carga eléctrica superficial que poseen. El conocimiento de este parámetro proporciona un valor del potencial electrocinético de la nanopartícula, y depende de la composición de la partícula y del medio en el que se dispersa (Mayoral et al., 2014).

Este dato resulta de gran interés cuando se pretende estudiar el comportamiento de filtración, sedimentación, interacción con membranas biológicas, etc. (Zhao y Feng, 2010).

Al igual que para el análisis de tamaño y Pdl de las NPs, el dispositivo que se usó para la determinación del Potencial Zeta fue *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments, Reino Unido). Esta técnica consiste en aplica un voltaje a través de dos electrodos situados en los extremos de una celda especial, que contiene la suspensión de NPs. Las partículas cargadas serán atraídas por el electrodo con carga opuesta y, midiendo la velocidad de migración, se puede determinar su movilidad electroforética y así su carga superficial (Tucker et al., 2015).

Para llevar a cabo las medidas se tomaron muestras de las suspensiones de NPs, previa dilución en agua purificada. Las medidas para cada muestra analizada fueron tomadas por triplicado.

iii. Eficacia de encapsulación del fármaco

Para el cálculo de la cantidad de rtPA encapsulado se utilizó el método del ácido bicinchonínico (BCA), basado en la detección por colorimetría (562 nm) de un complejo de color púrpura que se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso (Cu^{+1}) obtenido por reducción del ión cúprico (Cu^{+2}) en presencia de proteínas en un ambiente alcalino (Smith et al., 1985).

Para este ensayo se utiliza un lector de microplacas (modelo Synergy HT, BioTek®) dotado de una lámpara flash de Xenón, para realizar medidas de absorbancia tanto en el UV como en el visible, y un monocromador para seleccionar la longitud de onda deseada.

El cálculo de rtPA encapsulado se lleva a cabo de forma indirecta, ya que se cuantifica la cantidad de activo en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación de la suspensión de las NPs recién elaboradas, y por lo tanto no encapsulado. La eficacia del proceso se expresa en términos de % p/p respecto a la cantidad inicial de rtPA usada en cada formulación.

$$EE \% = \frac{\text{cantidad experimental fco. en las NPs}}{\text{cantidad teórica de fco. en las NPs}} \times 100$$

Ecuación 1. Eficacia de encapsulación del activo (EE %)

Para esa determinación, con anterioridad, ha sido necesario poner a punto y validar el método de μ BCA para la cuantificación de rtPA y construir la pertinente recta de calibrado (Das et al., 2011).

3.2.3. Bioconjugación de las nanopartículas

En el presente trabajo se ha llevado a cabo una prueba inicial de lo que pudiera ser un proceso de bioconjugación de las NPs con CREKA, siguiendo el método de la carbodiimida. Con este método, se modifica la superficie de la nanopartícula uniéndole un ligando, que en nuestro caso es el pentapéptido CREKA; los grupos carboxilos terminales del PLGA interaccionan con los grupos aminos del péptido formando un enlace amida (Das et al., 2011).

El protocolo que se ha seguido para la funcionalización de las NPs comienza con la resuspensión de una alícuota de NPs en agua purificada. Seguidamente, en agitación continua, gota a gota se activan los grupos funcionales del polímero formador de las NPs con N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) y N-hidroxisuccinimida (NHS); dejándolo durante cuatro horas a temperatura ambiente en agitación. Tras este periodo de tiempo se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 minutos y a una temperatura de 4 °C. Como resultado, obtenemos un sobrenadante que se desecha y

un precipitado que son las NPs activadas. Estas se vuelven a dispersar en agua purificada y a continuación se añade CREKA en solución acuosa, gota a gota, siempre con agitación que se mantiene durante dos horas a temperatura ambiente para favorecer la conjugación. Por último, se deja incubando toda la noche a 4 °C para centrifugar una vez pasado ese tiempo, y finalmente separar las NPs conjugadas.

Tras el proceso de conjugación se realizaron los controles oportunos de tamaño y potencial zeta siguiendo el mismo procedimiento indicado en los apartados 3.2.2.i y 3.2.2.ii.

i. Eficacia de conjugación de las nanopartículas.

Con objeto de evaluar el proceso de bioconjugación de las nanopartículas con CREKA, se adaptó un método de HPLC descrito por Zhao et al. (2005) para cuantificar la cantidad del péptido CREKA de los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de las muestras de nanopartículas conjugadas. De este modo que el cálculo de la eficacia de conjugación será de nuevo un cálculo indirecto.

La cuantificación de CREKA en los sobrenadantes se determinó mediante un sistema de HPLC (Hitachi) con una columna analítica ZORBAX-C18 (Agilent®; 250 mm x 4,6 mm; tamaño de poro 5 micras) a temperatura ambiente. La fase móvil es una mezcla 6,4:93,6 (v/v) de acetonitrilo y una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1%.

El flujo de elución fue de 1,0 mL/min, y la longitud de onda fue fijada en 220 nm, siendo el volumen de inyección de 15 µl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas sintetizadas

En el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos se explicó el procedimiento de elaboración de las NPs que se pretenden evaluar como vehículos del principio activo fibrinolítico Alteplasa.

Habiéndose utilizado para ello dos diferentes polímeros y diferentes cargas iniciales de fármaco a encapsular, y volúmenes de fase acuosa A₁, se ha podido evaluar de forma preliminar las diferentes características de las NPs desarrolladas en función del polímero utilizado, según la cantidad inicial que se ha dispuesto para la encapsulación del fármaco, y la concentración de éste en la fase acuosa interna primera (A₁).

4.1.1. Tamaño y distribución de tamaños (Pdl)

El método para determinar el tamaño de partícula y la distribución de tamaños fue el descrito en el apartado 3.2.2.i de Materiales y Métodos.

En la tabla 4 se muestran los datos de tamaño de partícula y Pdl obtenidos para las formulaciones de NPs blancas (sin carga de fármaco), para sendos polímeros utilizados en el presente estudio, y utilizando diferentes volúmenes de fase acuosa A₁, en la que más tarde se va a añadir el fármaco a encapsular.

Lotes	Polímero	Volumen fase A1 (µl)	Diámetro (nm)	IC _{95%}	Pdl
Lote 1A	PLGA 504H	50	250,7 ± 1,5	249,1 – 252,4	0,068 ± 0,04
Lote 1B	PLGA 504H	100	282,1 ± 6,1	275,2 – 288,9	0,077 ± 0,02
Lote 2A	PLGA-PEG	50	209,7 ± 2,2	207,2 – 212,1	0,135 ± 0,03
Lote 2B	PLGA-PEG	100	208,5 ± 0,8	207,7 – 209,4	0,141 ± 0,02

Tabla 4. Tamaño, intervalo de confianza del 95 % (IC_{95%}) y Pdl (media ± DE) de NPs blancas obtenidas por el Método de Doble Emulsión con los dos polímeros y distintos volúmenes de fase A₁ (n=3)

Como podemos observar en la tabla 4, los diámetros medios obtenidos para las NPs blancas se sitúan en el intervalo 200 - 300 nm, siendo las NPs de PLGA-PEG las de menor tamaño.

Una explicación al menor tamaño de las NPs elaboradas con PLGA-PEG podría ser que las cadenas de PEG son de naturaleza hidrófila, de modo que podrían disminuir la tensión interfacial entre las fases de la emulsión, estabilizando el sistema durante la síntesis y resultando en un menor tamaño medio de partícula.

Respecto a la distribución de tamaños, se observa que todas las formulaciones ensayadas presentan una adecuada homogeneidad y uniformidad de tamaños, con valores de Pdl por debajo de 0,15. Los datos de Pdl nos muestran unos valores ligeramente mayores para las NPs con PLGA-PEG como polímero formador, lo que podría justificarse con una ligera tendencia a la agregación de las NPs pegiladas debido a su menor tamaño.

Por otra parte, se observa cierta diferencia de tamaño al emplear diferente volumen de PVA en la fase A₁ para las NPs de PLGA 504H, obteniéndose partículas ligeramente mayores cuando se aumenta la cantidad de PVA. No obstante, en este estudio preliminar no hay suficientes datos para establecer que esa diferencia sea estadísticamente significativa, aunque pareciera que pudiera serlo; nótese los datos de intervalos de tamaño de cada lote producido establecidos para un 95 % de confianza. Para asegurar este hecho, haría falta ampliar el estudio haciendo más repeticiones de cada lote.

Una vez comprobado que con esta metodología obtenemos partículas de tamaños nanométricos adecuados, se procede a evaluar las NPs al incorporar el fármaco.

Para ello, en primer lugar se va a evaluar la influencia de la concentración de la solución de fase A₁, que se empleará para incorporar el fármaco Alteplasa. Éste se añade siempre en una proporción p/p respecto a la cantidad de polímero.

Se elaboraron lotes de NPs de PLGA 504H que usan nuevamente 50 y 100 µL de solución de PVA con cantidad de fármaco suficiente para que guarden una relación con el polímero del 5 y 10 % p/p.

En este caso no se han hecho lotes de NPs de PLGA-PEG ya que, como hemos comentado anteriormente, parece ser que son únicamente las NPs de PLGA 504H las que presentan diferentes tamaños en función del volumen de fase A₁ empleada.

En la tabla 5 se muestran los resultados de tamaño y Pdl para estos nuevos lotes.

Lotes	Polímero	% rtPA	Diámetro	IC _{95%}	Pdl
Lote 1A_0	PLGA 504H-50μl	0	265,9 ± 1,7	264,0 – 267,9	0,069 ± 0,02
Lote 1A_5	PLGA 504H-50μl	5	236,3 ± 6,3	229,1 – 243,5	0,086 ± 0,01
Lote 1A_10	PLGA 504H-50μl	10	248,0 ± 18,6	227,0 – 269,1	0,095 ± 0,01
Lote 1B_0	PLGA 504H-100μl	0	277,8 ± 3,4	274,0 – 281,6	0,081 ± 0,02
Lote 1B_5	PLGA 504H-100μl	5	231,7 ± 2,8	228,6 – 234,8	0,094 ± 0,02
Lote 1B_10	PLGA 504H-100μl	10	239,0 ± 5,2	233,1 – 244,8	0,085 ± 0,04

Tabla 5. Tamaño medio y Pdl (media ± DE) de NPs obtenidas por el Método de Doble Emulsión con polímero PLGA 504H, con distinta cantidad de fase A1 y distintas concentraciones de fármaco (n=3).

Si se observan los lotes de NPs sin carga (lotes 1A_0 y 1B_0), parece que se vuelven a encontrar diferencias en los tamaños de partícula, volviendo a ser ligeramente mayores las NPs blancas de PLGA 504H con 100 μL de PVA.

Sin embargo, esta diferencia se atenúa cuando se cargan las partículas con fármaco. Al encapsular Alteplasa al 5 %, independientemente de la cantidad de PVA que lleve la formulación de la fase A₁, las NPs disminuyen su diámetro. A su vez observamos que, cuanto mayor sea el porcentaje de activo en la fase A₁, mayor se hace proporcionalmente el diámetro de la nanopartícula.

Esta tendencia a reducirse el tamaño de las NPs al cargarlas con el principio activo puede deberse al efecto tensioactivo del mismo. La hidrofilia del fármaco favorece que el sistema emulsión se mantenga estable al ponerse en contacto con el polímero formador, que este caso es el PLGA 504H.

En cualquier caso, según el Pdl, se sigue observando que la metodología propuesta da lugar a poblaciones de NPs de tamaño homogéneo.

A continuación, dado que las diferencias de tamaño se reducen cuando se elaboran las NPs con carga de fármaco, y dado que tecnológicamente es más fácil el proceso de producción empleando un mayor volumen de fase A₁ (100 μL), se fija esta cantidad y se completa el estudio elaborando nuevos lotes de NPs de los dos polímeros estudiados con diferentes cargas iniciales del fármaco para luego evaluar la carga superficial de las NPs y eficacia de encapsulación de fármaco.

4.1.2. Carga eléctrica superficial: Potencial zeta

Siguiendo la metodología del apartado 3.2.2.ii de Materiales y Métodos, se determinó la carga eléctrica superficial para las NPs sintetizadas por el Método de Doble Emulsión. Para ello, una vez fijados los 100µL de A₁, se hacen nuevos lotes de NPs según las condiciones mostradas en la tabla 6:

Lotes	Polímero	Carga rtPA (%)	Diámetro (nm)	Pdl	Potencial Zeta
Lote 1B_0	PLGA 504H-100µL	0	263,1 ± 2,0	0,091 ± 0,028	-15,9 ± 2,4
Lote 1B_5	PLGA 504H-100µL	5	218,5 ± 2,9	0,091 ± 0,018	-20,5 ± 1,6
Lote 1B_10	PLGA 504H-100µL	10	244,0 ± 0,4	0,116 ± 0,025	-23,4 ± 2,2
Lote 2B_0	PLGA-PEG-100µL	0	201,9 ± 7,3	0,143 ± 0,015	-6,7 ± 1,4
Lote 2B_5	PLGA-PEG-100µL	5	225,8 ± 1,0	0,177 ± 0,014	-15,5 ± 1,8
Lote 2B_10	PLGA-PEG-100µL	10	214,6 ± 4,1	0,151 ± 0,010	-16,8 ± 1,1

Tabla 6. Tamaño medio, Pdl y potencial zeta (media ± DE) de NPs obtenidas por el Método de Doble Emulsión con ambos polímeros estudiados, con 100 µL de fase A1 y distintas concentraciones de fármaco (n=3).

Se observa de nuevo la diferencia de tamaños que existe entre las NPs formadas por cada polímero, disminuyéndose el diámetro medio para las NPs elaboradas con PLGA-PEG.

Las NPs de PLGA 504H siguen el mismo comportamiento, descrito anteriormente, al cargarlas con fármaco. Sin embargo, en la tabla 6 se observa como las NPs de PLGA-PEG aumentan su tamaño al cargarlas con fármaco al 5 %, y al formular con una proporción de fármaco del 10 %, el tamaño vuelve a disminuir de nuevo. La naturaleza preliminar de este estudio y la reducida magnitud de esa diferencia de tamaños, indicaría que sería necesario repetir este estudio con un mayor número de experiencias en cada lote (n>3) para poder determinar si las diferencias son estadísticamente significativas.

En cuanto a la carga eléctrica superficial, los valores de potencial zeta de las NPs de PLGA 504H son ligeramente más negativos, debidos a la presencia de grupos carboxilo en la estructura química del polímero. En el caso de PLGA-PEG, se obtienen valores ligeramente menos negativos ya que estos grupos ácidos han sido ocupados por las cadenas de PEG; cabría esperar una mayor adhesión de estas NPs a las membranas biológicas facilitándose la entrada de éstas a las células (Zhao y Feng., 2010).

También se observa como los valores de potencial zeta se hacen ligeramente más negativos, para ambos polímeros estudiados, en las formulaciones con carga de fármaco. Este hecho puede deberse a que la presencia de fármaco encapsulado modifica la carga superficial de la nanopartícula.

Hasta el momento se puede concluir que la técnica de Doble Emulsión propuesta: permite encapsular correctamente el fármaco originando poblaciones de NPs de tamaño adecuado y homogéneo con valores de potencial zeta indicativos de sistemas estables con menor tendencia a la agregación (Martín-Banderas et al., 2013).

A continuación se comprueba cómo de efectiva ha sido esa encapsulación de fármaco, y por tanto si el método propuesto es válido para la encapsulación de un fibrinolítico de carácter hidrófilo como la Alteplasa.

4.1.3. Eficacia de encapsulación del principio activo

Una vez obtenidas las NPs cargadas con Alteplasa y caracterizadas por su tamaño y potencial zeta, se calculó la eficacia de encapsulación según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2.iii de Materiales y Métodos, de manera indirecta, cuantificando la cantidad de fármaco no encapsulado presente en el sobrenadante.

A continuación se muestra la recta de calibrado obtenida para la cuantificación de rtPA por el método de BCA (figura 9).

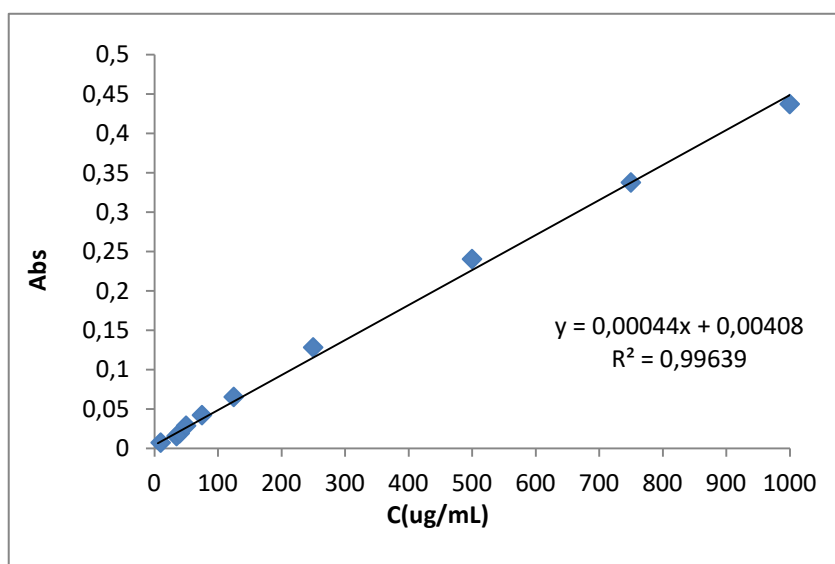


Figura 9. Recta de Calibrado para el Actilyse® en el método de BCA. Intervalo de concentraciones ensayado: 5-1.000 µg/mL

Puede observarse una adecuada linealidad en la respuesta colorimétrica para un amplio intervalo de concentraciones, 5 – 1.000 µg/mL. Sin embargo, al evaluar la precisión (C.V. medio = 7,8 %) y exactitud (recuperación media = 104,9 %), se obtuvo que habría que reducir al intervalo de concentraciones al comprendido entre 40 y 1.000 µg/mL para una cuantificación precisa y exacta de rtPA.

En la tabla 7 pueden observarse las eficacias de encapsulación calculadas para los lotes elaborados con diferente carga inicial de fármaco, para ambos polímeros estudiados.

Lotes	Polímero	Carga tPA (%)	EE (%)
Lote 1B_5	PLGA 504H	5	89,37 ± 14,7
Lote 1B_10	PLGA 504H	10	57,28 ± 13,8
Lote 2B_5	PLGA-PEG	5	97,05 ± 5,1
Lote 2B_10	PLGA-PEG	10	85,26 ± 13,5

Tabla 7. Eficacia de encapsulación (EE%) para las NPs ensayadas.

Los primeros resultados indican una buena eficacia de encapsulación con el método de elaboración propuesto. Se observa como parecen obtenerse mejores valores de encapsulación para el polímero PLGA-PEG. Por otro lado, para ambos polímeros se obtiene mejor EE (%) cuando se ha usado una carga inicial de fármaco menor (5 %); estos resultados pueden deberse a que la carga de saturación de las NPs está comprendida entre esos dos valores de carga inicial (5 – 10 %).

4.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas bioconjugadas

Con el fin de evaluar la propuesta de producción de NPs conjugadas con CREKA a partir de las NPs obtenidas por el Método de Doble Emulsión, se ha seguido la metodología descrita en el apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos, para llevar a cabo la bioconjugación de NPs blancas de ambos polímeros: PLGA 504H y PLGA-PEG.

4.2.1. Tamaño y distribución de tamaños (Pdl)

Con objeto de conocer las características de las NPs modificadas superficialmente mediante bioconjugación con el péptido CREKA, éstas han sido caracterizadas según la metodología descrita en el apartado 3.2.2.i para así determinar el tamaño medio de las partículas y su Pdl.

Era de esperar que el tamaño de las NPs aumentara tras ser conjugadas con CREKA, debido al tamaño de dicho péptido.

A continuación, la tabla 8 muestra las variaciones de diámetro y Pdl de las formulaciones ensayadas, las cuales son sin carga de fármaco y variando el tipo de polímero.

Lotes	Polímero	Carga rtPA (%)	Diámetro ± DE (nm)	Pdl ± DE
Lote 1C_0	PLGA 504H	0	272,6 ± 16,4	0,287 ± 0,140
Lote 2C_0	PLGA-PEG	0	219,0 ± 8,6	0,170 ± 0,036

Tabla 8. Tamaño medio y Pdl (media ± DE) de NPs bioconjugadas con CREKA con ambos polímeros estudiados y sin carga de fármaco (n=3).

Si comparamos los resultados de tamaño con los recogidos en las tablas 4, 5 y 6 para las NPs blancas no parecen aumentar los tamaños de las NPs de PLGA 504H al conjugarse. Sin embargo, parece verse afectado ligeramente el tamaño de las NPs de PLGA-PEG, lo que podría deberse a una mayor eficacia de unión del péptido a la superficie de la partícula. Aun así, este hecho no se puede comprobar adecuadamente porque algunas muestras resultan difíciles de redispersar (figura 10), obsérvense los valores algo más elevados de Pdl.

De hecho, se observa cómo se ha incrementado el Pdl, fundamentalmente en el caso de las NPs de PLGA 504H, indicando una homogeneidad ligeramente menor para las poblaciones de NPs conjugadas.

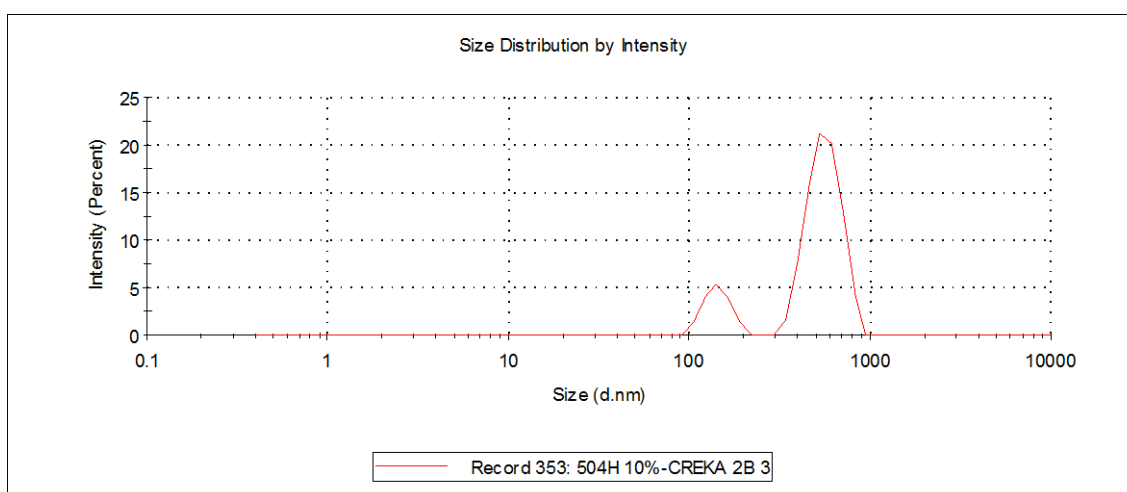


Figura 10. Distribución de tamaño de NPs de PLGA 504H conjugadas con CREKA

La disminución de homogeneidad en las NPs conjugadas puede deberse a un aumento de la agregación de las partículas, ya que al tener grupos carboxilos en la superficie se pueden ver atraídos por las cargas positivas del pentapéptido CREKA de otras NPs conjugadas, formando entre sí agregados.

4.2.2. Carga eléctrica superficial: Potencial zeta

Siguiendo la metodología del apartado 3.2.2.ii, se determinó la carga eléctrica superficial para las NPs bioconjugadas con CREKA. Teóricamente, se debería esperar que el potencial zeta se vaya haciendo menos negativo a medida que aumente el número de moléculas de CREKA en la superficie de las NPs, debido a la ocupación de los grupos carboxilo de las NPs por éste.

Lotes	Polímero	Potencial Zeta
Lote 1C_0	PLGA 504H	-17,15 ± 2,6
Lote 2C_0	PLGA-PEG	-12,0 ± 8,8

Tabla 9. Valores de Carga Eléctrica Superficial de NPs bioconjugadas con CREKA con ambos polímeros estudiados, y sin carga de fármaco (n=3).

Si comparamos los datos de potencial zeta mostrados en la tabla 9 de las NPs blancas de ambos polímeros conjugadas con CREKA, con los datos de potencial zeta obtenidos anteriormente en la tabla 6 de las NPs blancas de ambos polímeros sin ser conjugadas, se observa como la carga eléctrica superficial parece mantenerse en los mismos valores para las NPs de PLGA 504H, pero parecen hacerse ligeramente más negativos para las partículas de PLGA-PEG.

Estos resultados podrían indicar una mejor eficacia de conjugación de las NPs de PLGA-PEG, lo que apoyaría que la homogeneidad de tamaño de las NPs de PLGA 504H sea menor al permitir la menor eficacia de conjugación la interacción de entre las NPs y, por tanto, la agregación.

A pesar de todo, estos son datos muy preliminares, y no son concluyentes.

4.2.3. Eficacia de conjugación de las nanopartículas

Según lo indicado en el apartado 3.2.3.i de Material y Métodos, se estudió la puesta a punto y la validación de un método para la cuantificación de CREKA.

El método de HPLC empleado se puede considerar lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 0,125 – 1,5 mg/mL, para el que se obtiene la siguiente recta de calibrado:

$$\text{Absorbancia} = 824844 \times \text{Concentración} + 257757 \quad (r^2 = 0,9811)$$

Empleando este método para cuantificar CREKA en los sobrenadantes de los lotes de NPs conjugadas, no se ha podido obtener resultado reproducibles, se piensa que debido a que parece aprovecharse todo el CREKA usado en el proceso de conjugación propuesto de modo que los sobrenadantes tiene una concentración de CREKA por debajo o muy cercana al límite de cuantificación del método de HPLC empleado (estimado en 0,55 mg/ml).

Aunque por los resultados preliminares antes obtenidos de tamaño y potencial zeta podrían hacer pensar que la cantidad de CREKA unido a las partículas no es muy elevada.

CONCLUSIONES

Como se indicó anteriormente, este trabajo experimental se ha centrado en el estudio preliminar de nanopartículas cargadas con un fármaco fibrinolítico con el objetivo de crear una posible estrategia de direccionamiento activo hacia los trombos sanguíneos, basándose en la afinidad por el complejo fibrina-fibrinógeno presente en los mismos. Para conseguir dicho objetivo principal, se plantearon una serie de objetivos parciales en base a los cuales se han estructurado las conclusiones obtenidas en este trabajo, y que se exponen a continuación.

1. El método de producción de nanopartículas propuesto es válido para encapsular rtPA, un fármaco hidrosoluble, tanto al emplear PLGA como PLGA pegilado, como polímeros formadores.
2. Se han obtenido NPs de tamaño nanométrico en el intervalo de 200 - 300 nm, y distribuciones de tamaños estrechas y reproducibles ($PDI < 0,15$), además de valores de potencial zeta en el intervalo de -16 a -23 mV que deberían ayudar a una buena estabilidad de las NPs en suspensión.
3. Las NPs pegiladas han sido las de menor tamaño por lo que podrían tener la ventaja de ser absorbidas mejor, en el caso de administrarse vía extravasal, y evitar ser reconocidas por los macrófagos, y así, alcanzar su objetivo, el coágulo, de forma más exitosa.
4. Se ha encapsulado el activo fibrinolítico obteniéndose una buena eficacia de encapsulación, los mejores resultados se obtienen cuando se formulan las NPs al 5 % de fármaco, destacando la mejor EE% para las NPs de PLGA-PEG.
5. Se ha propuesto de forma preliminar un método para la funcionalización de la superficie de las NPs obtenidas por medio de un proceso de bioconjugación con un pentapéptido denominado CREKA, por el que se obtienen partículas de tamaño nanométrico y suficientemente homogéneo, así como valores de potencial zeta aún negativos.

Algunos de los datos obtenidos de este estudio muestran resultados preliminares; por lo que habría que seguir investigando para llegar a conclusiones firmes y fiables.

BIBLIOGRAFÍA

Aboelhassan MM, Peixoto AF, Freire C. Sulfonic acid functionalized silica nanoparticles as catalysts for the esterification of linoleic acid. *New J Chem.* 2017; 41(9): 3595-605.

Al Thaher Y, Perni S, Prokopovich P. Nano-carrier based drug delivery systems for sustained antimicrobial agent release from orthopaedic cementous material. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017; 249: 234-47.

Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine.* 2008; 4(4): 273-82.

Chiba M, Hanes J, Langer R. Controlled protein delivery from biodegradable tyrosine-containing poly(anhydride-co-imide) microspheres. *Biomaterials.* 1997; 18(13): 893-901.

Chung TW, Wang SS, Tsai WJ. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Biomaterials.* 2008; 29(2): 228-37.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012; 161(2): 505-22.

Das M, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted nutlin-3a loaded nanoparticles inhibiting p53–MDM2 interaction: novel strategy for breast cancer therapy. *Nanomedicine.* 2011; 6(3): 489-507.

Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6: 877-95.

Elkhesheh SA, Radwan MA. Sustained release microspheres of metoclopramide using poly(D,L-lactide-co-glycolide) copolymers. *J Microencapsul.* 2000; 17(4): 425-35.

Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*. 2001; 71(1): 53-69.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989; 55(1): R1-4.

Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*. 1960; 23: 22-36.

Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis*. 2010; 37(1): 48-57.

Gaillard PJ, Visser CC, de Boer AG. Targeted delivery across the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005; 2(2): 299-309.

González-Torres ML, Irlers-Rocamodra JA, Trancoso-Estrada J, del Corral M. Evaluación del uso de trombolíticos en el infarto agudo de miocardio tras el establecimiento de un protocolo. *Farm Hosp*. 1995; 19(5): 289-293.

Grabrucker AM, Ruozi B, Belletti D, Pederzoli F, Forni F, Vandelli MA, et al. Nanoparticle transport across the blood brain barrier. *Tissue Barriers*. 2016; 4(1): e1153568 (DOI: 10.1080/21688370.2016.1153568)

Grieneisen ML, Zhang M. Nanoscience and Nanotechnology: Evolving Definitions and Growing Footprint on the Scientific Landscape. *Small*. 2011; 7(20): 2836-9.

Kim B-S, Kim C-S, Lee K-M. The intracellular uptake ability of chitosan-coated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Arch Pharm Res*. 2008; 31(8): 1050-4.

Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, Crescente M, Brill A, Mammoto T, et al. Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Science*. 2012; 337(6095): 738-42.

Lamprecht A, Ubrich N, Hombreiro Pérez M, Lehr C, Hoffman M, Maincent P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int J Pharm*. 2000; 196(2): 177-82.

Lerma T, Combatt O, Palencia M. Efecto de la temperatura sobre coloides de suelos agrícolas mediante dispersión dinámica de la luz. *Rev Cienc Agr.* 2015; 32(2): 94-103.

Liu J, Qiu Z, Wang S, Zhou L, Zhang S. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity. *Biomed Mater.* 2010; 5(6): 065002.

Martin-Banderas L, Duran-Lobato M, Muñoz-Rubio I, Alvarez-Fuentes J, Fernandez-Arevalo M, A. Holgado M. Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery: Recent Strategies and Developments. 2013; 13(1): 58-69.

Mayoral JB, Moreno AC, Martín-Martínez ES. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. 2014; 8(4): 6.

McCarthy JR, Patel P, Botnaru I, Haghayeghi P, Weissleder R, Jaffer FA. Multimodal nanoagents for the detection of intravascular thrombi. *Bioconjug Chem.* 2009; 20(6): 1251-5.

McCarthy JR, Sazonova IY, Erdem SS, Hara T, Thompson BD, Patel P, et al. Multifunctional nanoagent for thrombus-targeted fibrinolytic therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2012; 7(7): 1017-28.

Miesch C, Kosif I, Lee E, Kim J-K, Russell TP, Hayward RC, et al. Nanoparticle-stabilized double emulsions and compressed droplets. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012; 51(1): 145-9.

Oropesa-Núñez R, Jáuregui-Haza UJ. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas (internet).* 2012; 43(3): Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/las-nanopart%C3%ADculas-como-portadores-de-f%C3%A1rmacos-caracter%C3%ADsticas-y-perspectivas>

Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M, Irache JM, Espuelas S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *Journal of Microencapsulation.* 2004; 21(2): 203-11.

Rodríguez RD, García GA, Martínez NN, Pérez AC, López LC. Comportamiento de terapéutica trombolítica en pacientes con infarto agudo del miocardio. *Revista Información Científica*. 2017; 96(3): 374-83.

Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación Química*. 2016; 27(4): 286-91.

Rosilio V, Benoit JP, Deyme M, Thies C, Madelmont G. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded microspheres fabricated from poly(D,L-lactide-co-glycolide). *J Biomed Mater Res*. 1991; 25(5): 667-82.

Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(2): 517-35.

Sivaraman B, Sylvester A, Ramamurthi A. Fibrinolytic PLGA nanoparticles for slow clot lysis within abdominal aortic aneurysms attenuate proteolytic loss of vascular elastic matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 59: 145-56.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985; 150(1): 76-85.

Song Y, Huang Z, Xu J, Ren D, Wang Y, Zheng X, et al. Multimodal SPION-CREKA peptide based agents for molecular imaging of microthrombus in a rat myocardial ischemia-reperfusion model. *Biomaterials*. 2014; 35(9): 2961-70.

Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol*. 2007; 2: 16.

Suzuki K, Price JC. Microencapsulation and Dissolution Properties of a Neuroleptic in a Biodegradable Polymer, Poly(d,l-lactide). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1985; 74(1): 21-4.

Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; 146(2): 233-8.

Tice TR, Gilley RM. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. *Journal of Controlled Release*. 1985; 2: 343-52

Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000; 11 Suppl 2: S81-91.

Tucker IM, Corbett JCW, Fatkin J, Jack RO, Kaszuba M, MacCreath B, et al. Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2015; 20(4): 215-26.

Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. *Chem Pharm Bull*. 1981; 29(11): 3363-8.

Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 765-74.

Wickline SA, Neubauer AM, Winter P, Caruthers S, Lanza G. Applications of nanotechnology to atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(3): 435-41.

Xu T, Zhang N, Nichols HL, Shi D, Wen X. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2007; 27(3): 579-94.

Zhao J, Zhang B, Shen S, Chen J, Zhang Q, Jiang X, et al. CREKA peptide-conjugated dendrimer nanoparticles for glioblastoma multiforme delivery. *J Colloid Interface Sci*. 2015; 450: 396-403.

Zhao L, Feng S-S. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel formulated in vitamin E-TPGS emulsified nanoparticles of biodegradable polymers: in vitro and in vivo studies. *J Pharm Sci*. 2010; 99(8): 3552-60.

ANEXO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

NPs: nanopartículas poliméricas

AE: Acetato de etilo

PVA: Alcohol polivinílico

PLGA: Ácido poliláctico-co-glicólico

PEG: Polietilenglicol

PLGA-PEG: PLGA pegilado

rtPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante

DE: Desviación estándar

EE%: Eficacia de encapsulación

Pdl: Índice de polidispersión

BCA: Ácido bicinchonínico

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Principales tipos de nanopartículas

Figura 2. Esquema del procedimiento a seguir en el Método de Doble Emulsión

Figura 3. Esquema del procedimiento a seguir en el Método de Emulsión Simple

Figura 4. Esquema del proceso de coagulación sanguínea

Figura 5. Esquema del sistema fibrinolítico. Uroquinasa y rtPA

Figura 6. Estructura química de PLGA

Figura 7. Esquema de la hidrólisis de PLGA

Figura 8. Estructura química de PEG

Figura 9. Recta de Calibrado para el Actilyse en el método de BCA. Intervalo de concentraciones ensayado: 5-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Figura 10. Distribución de tamaño de NPs de PLGA 504H conjugadas con CREKA

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Soluciones aportadas por la nanomedicina a los problemas que surgen en el uso de los fármacos tradicionales

Tabla 2: Clasificación de nanopartículas según su composición; y ejemplos destacables de cada tipo

Tabla 3. Características del disolvente y el emulsionante que se usan durante la elaboración de NPs mediante el Método de Doble Emulsión

Tabla 4. Tamaño y Pdl de NPs blancas obtenidas por el Método de Doble Emulsión con los dos polímeros y distintos volúmenes de fase A₁

Tabla 5. Tamaño medio y Pdl de NPs obtenidas por el Método de Doble Emulsión con polímero PLGA 504H, con distinta cantidad de fase A1 y distintas concentraciones de fármaco

Tabla 6. Tamaño medio, Pdl y potencial zeta de NPs obtenidas por el Método de Doble Emulsión con ambos polímeros estudiados, con 100 µL de fase A1 y distintas concentraciones de fármaco

Tabla 7. Eficacia de encapsulación para las NPs ensayadas.

Tabla 8. Tamaño medio y Pdl de NPs bioconjugadas con CREKA, con ambos polímeros estudiados y sin carga de fármaco

Tabla 9. Valores de Carga Eléctrica Superficial de NPs bioconjugadas con CREKA con ambos polímeros estudiados y sin carga de fármaco

ÍNDICE DE ECUACIONES:

Ecuación 1. Eficacia de encapsulación del activo