



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**

**NANOTECNOLOGIA DE APLICACIÓN EN**  
**PATOLOGIA CARDIOVASCULAR**

**Beatriz Calzadilla Méndez**



**Universidad de Sevilla**  
**Facultad de Farmacia**  
**Grado en Farmacia**  
**Trabajo Fin de Grado**

**NANOTECNOLOGIA DE APLICACIÓN EN PATOLOGIA**  
**CARDIOVASCULAR**

Beatriz Calzadilla Méndez

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: Josefa Álvarez Fuentes

Revisión Bibliográfica  
Sevilla, Septiembre de 2019

## **RESUMEN**

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares ocupan los puestos más elevados en las principales causas de muerte en países desarrollados, con un gran incremento en los últimos años.

Entre las enfermedades cardiovasculares más importantes están la aterotrombosis y el tromboembolismo venoso, siendo la consecuencia más grave la agregación plaquetaria, que da lugar a una obstrucción en el interior de los vasos sanguíneos, mortal en la mayoría de los casos. Aunque existen numerosos fármacos antiplaquetarios y trombolíticos, los efectos secundarios a los que pueden dar lugar, principalmente hemorragias masivas, hacen que surja la necesidad de buscar nuevos agentes con mejor índice terapéutico, mejor distribución y con un mecanismo de acción más eficaz en el cuerpo humano. Por ello, encontrar nuevas terapias que posean menor riesgo y mayor eficacia es muy importante a nivel social pero también a nivel económico.

La nanotecnología abre un amplio campo para llevar a cabo estas mejoras. Nuevas terapias capaces de diagnosticar y tratar a nivel molecular estas enfermedades es algo muy esperanzador tanto para los pacientes como para los médicos e investigadores. Para la detección *in vivo* de las placas de ateroma, principal causante de las otras patologías, y de los trombos se han desarrollado nuevas técnicas que incluyen agentes de imagen molecular específicos como la resonancia magnética (MR). También, el uso de polímeros para recubrir nanopartículas es algo que está ampliamente estudiado; en esta revisión quedan verificados cuales son los más eficaces para que las sustancias que encapsulan logren liberarse y llegar correctamente al sitio de interés terapéutico en el organismo.

Por otro lado, también se analizará el desarrollo de nuevas terapias antitrombóticas realmente eficaces, como algunos péptidos, agregados de nanopartículas, derivados de N-acilhidrazina, etc., que aunque aún no se estén utilizando en clínica, están siendo estudiados en ensayos con animales y obteniéndose resultados realmente prometedores.

**Palabras clave:** *enfermedades cardiovasculares, placas de ateroma, aterotrombosis, nanotecnología, nanopartículas*

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4-10</b>
<b>1.1. <u>Nanotecnología y su aplicación a la salud y terapéutica</u>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. <u>Ventajas del uso de la nanotecnología</u>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. <u>Principales sistemas nanométricos de aplicación en salud</u>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. <u>Enfermedades cardiovasculares</u>.....</b>	<b>8</b>
1.4.1. Enfermedad coronaria.....	8
1.4.2. Enfermedad cerebrovascular.....	9
1.4.3. Enfermedad vascular periférica.....	9
1.4.4. Aterosclerosis.....	9
1.4.5. Aneurismas aórticos.....	9
1.4.6. Trombosis.....	9
<b>2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>12-33</b>
<b>4.1. <u>Aplicaciones de la nanotecnología en las enfermedades cardiovasculares</u>.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2. <u>Terapias estudiadas en la detección y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares</u> .....</b>	<b>14</b>
4.2.1. Activadores del plasminógeno encapsulado en nanopartículas de PLGA recubiertos con quitosano para acelerar la trombosis.....	14
4.2.2. Nanoagentes multimodales para la detección de trombos intravasculares.....	18
4.2.3. Nanoagentes multifuncionales para la terapia fibrinolítica dirigida a trombos.....	21
4.2.4. Nanoterapias activadas por cizallamiento para la orientación de drogas a los vasos sanguíneos obstruidos.....	24
4.2.5. Nanosistemas con agentes antiplaquetarios derivados de N-acilhidrazina.....	28
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Nanotecnología y su aplicación a la salud y terapéutica.

La nanotecnología, como tal, se refiere a una escala de longitud y como unidad de medida de esa escala se usa el nanómetro. Su prefijo “nano” significa “mil millones”, que equivale a una milmillonésima parte de un metro y lo cual hace situarnos en la manipulación de la materia a nivel atómico y molecular (Andrada, 2012).

Con la nanotecnología conseguimos materiales, dispositivos y sistemas que no son posibles de obtener con la tecnología tradicional, por ello abre (o ha abierto) un nuevo y amplio campo de investigación en el diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades hasta ahora incurables o difíciles de tratar mediante la aplicación de nanosistemas.

Como consecuencia, surge la Nanomedicina, que consiste en integrar la nanotecnología en la medicina para conseguir llegar a las estructuras biológicas con una mayor precisión, tanto a nivel molecular como atómico, para intentar mantener íntegra la salud del paciente, no solo aplicando tratamientos, sino también diagnosticando y controlando sus funciones biológicas.

Es importantísimo el hallazgo de “nanoterapias” con las cuales se logre llegar selectivamente al órgano o tejido dañado y podamos librarnos de los efectos secundarios que tenemos con los tratamientos convencionales.

De ese modo podríamos dividir la nanomedicina en tres amplias ramas (Centro de investigación biomédica en red, 2018):

1. Nanodiagnóstico: se refiere al uso de nanosistemas para la detección de enfermedades en sus fases iniciales mediante análisis de imagen, lo cual brinda la oportunidad de tener un diagnóstico temprano y poder instaurar un tratamiento adecuado, más específico y temprano que el que conseguiríamos con un diagnóstico convencional, posibilitando una mayor supervivencia para el paciente.

El diagnóstico se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, siendo el segundo el más prometedor.

Este nanodiagnóstico se puede realizar con nanopartículas o mediante biosensores. Las nanopartículas se pueden utilizar como marcadores biológicos, recubriéndolas con sustancias que reaccionan en contacto con las células que queremos detectar.

Por otro lado, el desarrollo de nanobiosensores también está resultando bastante útil a la hora de detectar sustancias químicas y biológicas en tiempo real con una elevada selectividad y sensibilidad, sin tener que usar marcadores fluorescentes como en el método anterior. Además, estos nanobiosensores son muy fáciles de manejar y con ellos se pueden obtener unos resultados más fidedignos del estado real de salud del paciente, donde los vamos a introducir. En este campo se trabaja para poder desarrollar dispositivos que

contengan varios tipos de nanobiosensores que implantados en el organismo sean capaces de detectar tempranamente células enfermas y emitir señales, así actuarían como “centinelas” en el interior del organismo.

2. Nanoterapia: fundamentalmente desarrolla nanosistemas que llevan materiales que logran reconocer la célula o tejido al que va dirigido el fármaco, de forma que se consigue transportarlos y liberarlos en la zona adecuada, realizando de esta forma un tratamiento más específico y efectivo con un mínimo de efectos secundarios. La liberación del fármaco puede realizarse mediante un estímulo y además se debe liberar adecuadamente para conseguir efectividad.

Estas nanopartículas deben formularse de forma que el fármaco no se libere durante el tránsito por el organismo ni en un lugar inadecuado.

Los principales tipos de nanosistemas que se usan en nanoterapia o nanomedicina son nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, nanotubos, microgeles, micelas, etc.

3. Medicina regenerativa: pretende la reparación o sustitución de órganos o tejidos lesionados con distintos métodos y herramientas nanotecnológicas para intentar promover los mecanismos de reparación propios del organismo.

Se usan variados materiales como nanopartículas de hidroxiapatita o zirconia, nanotubos de carbono, nanocomposites, nanofibras de polímeros biodegradables, etc. Con estos materiales se intenta diseñar y fabricar estructuras que estimulen el crecimiento de los tejidos dañados, estimulando la proliferación y diferenciación celular junto con la producción y organización de la matriz extracelular. Así, algunas de las posibles aplicaciones de la nanotecnología a la salud y terapéutica son las siguientes:

- **Diagnóstico temprano**: se usan nanosistemas como agentes de contraste en técnicas de imagen como ecografía, tomografía y resonancia magnética, con beneficios respecto a los agentes usados tradicionalmente ya que mejoran la biocompatibilidad, la dispersión óptica, disminuyen la posibilidad de desnaturalización y es muy importante su capacidad para unirse a ligandos, ya que al poder unirse a células blanco podemos obtener imagen para el diagnóstico y además transportar medicamentos, lo cual nos acerca al objetivo de conseguir un tratamiento más específico y efectivo (Clavijo et al., 2008).
- **Cambios en la forma de administración de algunos medicamentos**: existen medicamentos, como los péptidos y proteínas (vacunas, hormonas, insulina, etc.), que son degradados enzimáticamente y no son aptos para administración oral. Mediante el uso de nanoesferas y nanocápsulas conseguimos administrarlos por vía oral y además disminuimos los efectos secundarios, consiguiendo así aumentar su biodisponibilidad, su

absorción y la estabilidad del compuesto activo mejorando de esta forma su eficacia (Clavijo et al., 2008).

- **Interferencia en la activación celular:** esta aplicación supone un gran avance en el futuro tratamiento de ciertas enfermedades difíciles de tratar como el cáncer, la distrofia muscular de Duchenne o la aterosclerosis grave.

En esta terapia, que está basada en la interferencia de ARN, lo que se pretende es activar el silenciamiento génico de forma selectiva y eficiente mediante la introducción de pequeños ARN de interferencia (siARN). Si en lugar de administrar los siARN por vía intravenosa como se ha hecho hasta ahora, los administramos unidos a nanopartículas diseñadas específicamente para ser “invisibles” se evita que esos siARN sean detectados y destruidos por los mecanismos de control (inmunidad innata), consiguiendo un tratamiento mucho más selectivo, ya que ese siARN se unirá específicamente a la célula a la que va dirigido (Clavijo et al., 2008).

- **Nanocirugía:** aplicación muy interesante ya que se han podido desarrollar herramientas que actualmente se usan en intervenciones quirúrgicas, tanto a nivel atómico como molecular, como sistemas láser, nanopinzas, nanoalambres, nanojeringas y dispositivos para manipulación electrocinética, que sirven para poder manipular tanto las células como sus orgánulos (Clavijo et al., 2008).

- **Control de infecciones:** con el diseño de los nanobiosensores se consigue un diagnóstico rápido de las infecciones y además, se consigue dar al paciente un tratamiento antimicrobiano específico para él (Clavijo et al., 2008).

## **1.2. Ventajas del uso de la nanotecnología**

La aplicación de la Nanotecnología en distintas áreas de la vida ofrece importantes efectos y avances. Aplicados en la medicina general, podemos obtener diferentes beneficios o aplicaciones, algunos a largo plazo y otros inmediatos, como por ejemplo (Euroresidentes, 2018; Monografías, 2018):

- Diagnóstico, tratamiento e investigación más eficaces y seguros, lo cual permitirá actuar mucho más rápidamente ante una enfermedad y con un coste menor.
- Tratamientos y diagnósticos más específicos y variados, puesto que se pueden implantar en el paciente sensores y dispositivos de muy pequeño tamaño que hacen que el paciente esté continuamente monitorizado, pudiendo controlarlos y tratarlos automáticamente.
- Mejora e incremento de la calidad de vida del paciente.

- Detección y detención de enfermedades nuevas con mayor rapidez y efectividad.

### **1.3. Principales sistemas nanométricos de aplicación en salud**

Existen una gran variedad de nanosistemas o sistemas nanométricos; incluso su fabricación y los materiales usados para ello son muy diversos. Esto hace que existan diferentes clasificaciones.

De forma muy general, se podrían clasificar en dos grupos:

- Nanoestructuras orgánicas: se emplean materiales poliméricos para fabricar nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco.
- Nanoestructuras inorgánicas: aquí se incluyen las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílica mesoporosa y nanotubos de carbono (Rojas-Aguirre, 2016).

Los nanosistemas más frecuentemente empleados en medicina son:

- **Puntos cuánticos:** son agregados de cientos de átomos de un determinado elemento (cadmio, tecnecio, cinc o selenio, tantalio, indio), cubiertos externamente por solventes no polares o solubles en medios acuosos, a los que además pueden añadirse ligandos u otros componentes y al emitir fluorescencia se usan para diagnóstico de imagen y estudio de procesos celulares (Verschraegen et al., 2004; Jain, 2007).
- **Nanoliposomas:** se trata de vesículas en las cuales un volumen acuoso que, normalmente, contiene el compuesto activo, es rodeado de una membrana fosfolipídica similar a la membrana celular. Se usan para el transporte de medicamentos, agentes de contraste y radiofármacos y además se encuentran en estudio para poder liberar fármacos no solubles en agua (Sahoo, 2003; Jain, 2007).
- **Nanoesferas:** son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar encapsulado en el interior de la matriz. Se usan para el transporte de medicamentos y como agentes de contraste para imagen (Koo et al., 2005; Pinto Reis et al., 2006 y Jain, 2007).
- **Nanocápsulas:** sistemas vesiculares donde la sustancia activa está confinada en un núcleo lipídico o acuoso y rodeada por una membrana polimérica de una o múltiples capas. Se destinan al transporte de fármacos y agentes de contraste para imagen (Clavijo et al., 2008).
- **Nanoemulsiones:** son sistemas dispersos de aceite y agua en los cuales la fase dispersa está formada por gotas de la sustancia activa en escala nanométrica. Son estabilizadas en



la superficie con una cubierta de surfactante y co-surfactante. Su uso más común es el de transporte de fármacos (Koo et al., 2005; Clavijo et al., 2006; 2007).

- **Dendrimeros:** son estructuras esféricas poliméricas, altamente ramificadas, compuestas por un núcleo central, (por ejemplo,  $\text{NH}_3$ ), y capas alternantes de monómeros, generalmente ácido acrílico y etilen-diamina, cuya alternancia continúa hasta que se construye la última generación deseada. Importantes en la detección de cambios celulares específicos y como agentes de contraste. También se usan para transportar medicamentos, como sensores de muerte celular y como transporte de fragmentos de ADN (Clavijo et al., 2008).

- **Nanocubiertas:** se trata de estructuras ópticamente activas, formadas por un núcleo de silicio rodeado por una delgada capa metálica, generalmente de oro. Se emplean para la detección de cambios celulares específicos y para el tratamiento del cáncer (Clavijo et al., 2008).

- **Nanotubos:** se constituyen de átomos de carbono en disposición cilíndrica, en una sola capa (SWNT) o en varias (MWNT). Pueden hacerse solubles en agua y aumentar su biocompatibilidad mediante la activación de su superficie.

Utilizados en la detección de cambios celulares específicos; como sistema liberador de agentes de contraste para imagen y fármacos; y como sustrato de crecimiento celular y regeneración de tejidos (Clavijo et al., 2008).

- **Nanopartículas superparamagnéticas:** usualmente preparadas por coprecipitación alcalina de proporciones adecuadas de sales de  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  en agua en presencia de un polímero adecuado como dextrano o polietilenglicol. Se han descrito para diagnóstico por resonancia magnética (Clavijo et al., 2008; ResearchGate, 2018).

#### **1.4. Enfermedades cardiovasculares**

Cuando hablamos de patología cardiovascular nos referimos a un amplio grupo de enfermedades que perjudican tanto al corazón como a los vasos sanguíneos.

**1.4.1. Enfermedad Coronaria:** se produce cuando en la cara interna de las arterias coronarias se deposita una placa compuesta por colesterol y otras sustancias, lo cual da lugar a la aterosclerosis. Esta placa se va a ir endureciendo con el paso de los años y las arterias se van a ir estrechando, pudiendo desembocar en una angina de pecho o en un infarto agudo de miocardio en los casos más graves. El infarto se produce normalmente por el desprendimiento de un coágulo que interrumpe de forma brusca el flujo sanguíneo al corazón.

Otra posible consecuencia de la enfermedad coronaria pueden ser la insuficiencia cardíaca y las arritmias, que aparecerán por debilitamiento del músculo cardíaco (Medline Plus, 2018a).

**1.4.2. Enfermedad cerebrovascular (o ictus):** se produce por una alteración en la circulación cerebral que afecta a parte del cerebro, pudiendo producir daños permanentes, por ello una rápida actuación y detección de la enfermedad es fundamental aquí. Existen dos tipos: el infarto cerebral, que se da por una obstrucción en el flujo sanguíneo de una arteria, que hace que descienda el riego sanguíneo de esa zona. El segundo tipo es la hemorragia o derrame cerebral, dado por la rotura de una arteria y donde la isquemia puede aparecer horas más tarde (Clínica Universidad de Navarra, 2018).

**1.4.3. Enfermedad vascular periférica:** en ésta se va a producir un estrechamiento de los vasos sanguíneos de fuera del corazón, en las arterias y venas periféricas que suministran sangre a las extremidades. También es producida a causa de la aterosclerosis.

En estos vasos se acumula placa en la pared, que los obstruye y estrecha, interrumpiendo así el flujo sanguíneo hacia las extremidades inferiores. Si la obstrucción fuera muy severa se puede producir la muerte de tejidos e incluso llegar a la amputación del miembro.

Cuando esta enfermedad afecta a las arterias se conoce como enfermedad arterial periférica (Serrano Hernando, 2007; Medline Plus, 2018b).

**1.4.4. Aterosclerosis:** es una enfermedad caracterizada por la presencia de placas con un alto contenido en lípidos y otros materiales en la pared de las arterias de medio y gran calibre. Estas placas ricas en lípidos son conocidas también como “inestables”, “vulnerables” o “de alto riesgo” porque tienen facilidad para romperse, desencadenando un capítulo agudo. La principal manifestación clínica de esta enfermedad es la formación de un trombo agudo que se pega a la placa, la cual está rota o erosionada, de modo, que el término que definiría más característicamente a esta enfermedad es el de aterotrombosis (Pedro-Botet, 2004; Ibañez, 2007).

**1.4.5. Aneurismas aórticos:** los aneurismas son dilataciones parecidas a un globo que tienen lugar en la pared de un vaso sanguíneo. Los aneurismas aórticos son los que se producen en la arteria aorta, que va desde el corazón al pecho y al abdomen. Estos aneurismas pueden llegar a romperse por una dilatación excesiva, a causa de que el aneurisma vaya creciendo, produciendo un sangrado muy peligroso que, si no se controla a tiempo, puede producir la muerte (Medline Plus, 2018c; Texas Heart Institute, 2018).

**1.4.6. Trombosis:** se caracteriza por la acumulación de plaquetas y fibrina inducida por la activación de los factores de coagulación, que desembocan en la formación de coágulos de sangre (trombos) que obstruyen el flujo sanguíneo y que pueden dar lugar a síndromes

arteriales agudos como el infarto agudo de miocardio o la embolia pulmonar, que ponen en serio riesgo la vida (McCarthy et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

Este trabajo de revisión tiene como Objetivo Principal recopilar las posibilidades que las nanopartículas podrían ofrecer a la terapéutica de las enfermedades cardiovasculares mejorando la eficacia y seguridad del tratamiento farmacológico.

Para alcanzar ese objetivo principal se ha procurado desarrollar los siguientes objetivos parciales:

- i) recoger las principales enfermedades cardiovasculares,
- ii) describir los principales sistemas nanoparticulares empleados en terapéutica, y
- iii) analizar formulaciones de nanopartículas que están siendo estudiados para, basándose en la demostración de su eficacia y seguridad, ser propuestas como alternativas terapéuticas.

## 3. METODOLOGÍA

En la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos procedentes de distintas bases de datos, entre ellas PubMed y el catalogo FAMA de la biblioteca de la US. También se han consultado distintas páginas web y artículos que no están en las bases de datos citadas.

Puesto que el trabajo trata sobre las enfermedades cardiovasculares y las posibles terapias basadas en la nanotecnología, las palabras clave incluidas en la búsqueda fueron *nanotecnología, nanopartículas, enfermedades cardiovasculares, aterotrombosis y placas de ateroma*.

Después de la búsqueda se seleccionaron los artículos que contenían información sobre nanoterapias que actuaran lisando, detectando o tratando coágulos *in situ*. A continuación, se procedió a su lectura para extraer la información necesaria para realizar esta memoria.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El principal uso de la nanotecnología en enfermedades cardiovasculares consiste en el diagnóstico de la placa de ateroma, si es estable o vulnerable, y la detección de trombos in vivo, para poder realizar un tratamiento farmacológico adecuado.

Cuando la placa de ateroma se rompe se produce un desequilibrio en el sistema de coagulación que puede dar lugar a la formación de trombos, de modo que la detección temprana de cualquier problema en la placa de ateroma será determinante para evitar esos desequilibrios y que se puedan formar trombos que den lugar a consecuencias más graves en el paciente.

La identificación de alteraciones en la placa puede basarse en la detección de moléculas específicas asociadas con la inflamación o angiogénesis, para lo cual, se usan técnicas de imagen celular y molecular, como por ejemplo la resonancia magnética (MR) (Wickline et al., 2006).

Los principales tipos de nanosistemas usados para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades cardiovasculares son:

- a) Nanopartículas de óxidos metálicos, pueden estar recubiertas por dextrano, fosfolípidos u otros componentes que mejoran su estabilidad y les permitan ser usados como agentes localizadores, puesto que las partículas de hierro al tener una vida media bastante larga permiten detectar, mediante imagen de resonancia magnética (MRI), procesos inflamatorios patológicos como las placas de ateroma.
- b) Nanopartículas de cáscara de oro (120 nm), usadas para diagnóstico por imagen y tratamiento.
- c) Nanotubos de carbono y fullerenos (4nm), útiles para el tratamiento de la oclusión vascular.
- d) Puntos cuánticos (2 a 8 nm), hechos de materiales semiconductores (p. ej., seleniuro de cadmio) con propiedades fluorescentes estables en varias longitudes de onda dependiendo de su composición. Para poder usarlas in vivo, deben estar recubiertas de materiales (polímeros) que permitan que las partículas sean solubles evitando también la lixiviación de los metales pesados tóxicos (Schmitz et al., 2000; Wickline et al., 2006).

##### **4.1. Aplicaciones de la nanotecnología en las enfermedades cardiovasculares**

- **Diagnóstico y tratamiento de aterosclerosis.** En el caso de las enfermedades cardiovasculares, al ocupar los primeros puestos de mortalidad en los países desarrollados, es imprescindible detectar a nivel molecular y celular las lesiones ateroscleróticas. Esto

puede hacerse mediante nanopartículas que se unan a factores producidos por la activación de la placa aterosclerótica a nivel local (factor tisular o fibrina). También se pueden unir a marcadores de angiogénesis y macrófagos, lo cual es interesante, porque así se localiza la lesión a la vez que se libera el fármaco que vehiculiza la nanopartícula, logrando inhibir la angiogénesis y la proliferación celular responsables del estrechamiento del vaso sanguíneo que está afectado por la placa (Clavijo et al., 2008).

Es interesante el hecho de que en determinados pacientes en los que ya existe isquemia miocárdica, además de permitir la obtención de una imagen de la zona afectada, con la utilización de nanopartículas se podrían introducir en la maquinaria genética de las células del corazón genes de factores de crecimiento, de este modo se estimularía a las células cardíacas a fabricar proteínas “terapéuticas” (Wickline et al., 2006; Yang, 2007).

- **Control del sangrado.** Esta aplicación podría conseguir una mejoría en los métodos convencionales de hemostasia como, por ejemplo, cauterización, presión o uso de fármacos, que van a necesitar unas condiciones determinadas y además de ocluir el vaso afectado mediante vasoconstricción también afectan a los tejidos anexos, lo que lleva a la afectación por falta de oxígeno y nutrientes de esos tejidos y células sanas.

Se están probando soluciones nanohemostáticas que consiguen reducir el tiempo de sangrado sin afectar a las células adyacentes, lo que permite usar como materia prima los compuestos básicos de la propia célula (aminoácidos sobre todo) para el proceso de regeneración (Clavijo et al., 2008).

- **Disminución de posibles complicaciones al utilizar stents coronarios.** Con el uso de nanotecnología se abre un campo alternativo a la cirugía de bypass. Se está investigando el uso cubiertas nanotexturizadas para estimular que el stent se quede “pegado” a las células musculares lisas y endoteliales evitando de este modo que se produzca una nueva estenosis con su consecuente trombosis (Caves y Chaikof, 2006).

- **Detección del trombo crónico in vivo.** La trombosis es una de las principales complicaciones que derivan de una enfermedad cardiovascular. En los procesos trombóticos es muy importante lograr determinar tanto la edad como la situación del trombo in vivo; para ello, aunque es complicado, el uso de agentes de contraste de fibrina resulta útil para la detección in vivo de trombos crónicos en comparación con otras técnicas.

Por ello es importante desarrollar terapias que consigan detectar y determinar la edad del trombo para actuar y prevenir posibles complicaciones derivadas de la rotura de la placa.

Como ya sabemos, la formación de un trombo supone un momento clave para que se produzca un episodio de accidente cerebrovascular o coronario y algunos estudios avalan

que el infarto agudo de miocardio viene precedido por la formación de un trombo, el cual se puede formar desde días a incluso meses antes de que ocurra infarto, lo cual da la oportunidad de poder actuar antes de que se produzca el episodio e incluso prevenirlo (Ojio et al., 2000; Sirol et al., 2005).

#### **4.2. Terapias estudiadas en la detección y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares**

##### **4.2.1. Activadores del plasminógeno encapsulados en nanopartículas de PLGA recubiertos con quitosano para acelerar la trombolisis (Chung et al., 2008):**

Los principales fármacos antitrombóticos usados en la terapia convencional de enfermedades cardiovasculares, como el infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular, que han demostrado resultados favorables, son el activador del plasminógeno tisular (tPA) y la estreptoquinasa (SK), cuyos efectos secundarios más desfavorables son las hemorragias y la reoclusión vascular. El hecho de poder encapsular estos fármacos en sistemas como nanopartículas ofrece la posibilidad de poder entregarlos justo donde se encuentra el coágulo, para que se liberen y actúen allí evitando los efectos secundarios de estos fármacos trombolíticos.

Los resultados de estudios realizados en animales, tanto in vivo como in vitro, de Nguyen et al. (1990) y Leach et al. (2003) demostraron que encapsular el tPA en liposomas o microesferas poliméricas elevaba el potencial del fármaco en la terapia trombolítica. Partiendo de ellos surgen novedosas ideas para el tratamiento de este tipo de patologías: si se podía encapsular el tPA en esas estructuras poliméricas y de ese modo protegerle de sus inhibidores, también se podrían usar sistemas nanoportadores que los llevaran directamente al sitio del coágulo por presión o por fuerzas impulsadas por convección.

Partiendo de esta base, Chung et al. (2008) realizaron los estudios para ver si el tPA encapsulado en nanopartículas de ácido poli-(lactida-co-glicolida) (PLGA) recubiertas con quitosano (CS) y otros biomateriales de recubrimiento (por ejemplo, el péptido RGD) eran efectivos en la lisis de los coágulos, para ello, se experimentó en un modelo de tubo ocluido con un coágulo.

El PLGA es un poliéster muy conocido con distintas proporciones de lactida y glicolida. Es biodegradable y biocompatible. Normalmente, ha sido usado como portador en nanopartículas y micropartículas para administrar fármacos; en este trabajo Chung et al. (2008), lo usarán como núcleo de las nanopartículas que van a transportar el fármaco.

Chung et al. (2008) fabricaron nanopartículas (NPs) de tPA encapsuladas en PLGA, PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD para determinar su tamaño de partícula y los perfiles de liberación y,

además, se compararon el tiempo de lisis del coágulo y la cantidad de coágulos digeridos por estas NPs en comparación con el uso de una solución de tPA libre en un modelo in vitro de tubo ocluido con coágulos.

El quitosano (CS) es un amino-polisacárido (poli 1,4-D-glucoamina) no tóxico y biocompatible, ampliamente usado en la administración de fármacos, al igual que el PLGA.

El RGD, es un péptido de adhesión celular para células plasmáticas y proteínas extracelulares, incluyendo el factor de Von Willenbrand, la fibronectina y el colágeno (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987). Este péptido se ha usado para promover el crecimiento de células en distintos biomateriales como por ejemplo, el poli-(ε-caprolactona) (PCL) (Chung et al., 2002; 2005) y en este trabajo Chung et al. (2008) lo usó injertado en quitosano (CS-GRGD) para modificar la superficie de las nanopartículas de PLGA y ver los efectos que podía producir sobre la fibrinólisis.

Los materiales empleados para este trabajo fueron trombina procedente de suero bovino (BSA), quinacrina (QR) y PLGA (con un 50% de lactida y un 50% de glicolida), péptido GRGD y SANPAH (N-succinimidil-6-[40-azido-20-nitrofenilamino]-hexanoato), activador del plasminógeno recombinante humano (rt-PA), lutrol F-68, acetato de polivinilo con grado de polimerización de 2000, diclorometano, cloroformo, etanol y otros reactivos y quitosano con un 96 % de desacetilación.

Para elaborar las NPs de tPA con PLGA, y las recubiertas con CS y CS-GRGD, se usó un método de recubrimiento similar al método de emulsión- evaporación del solvente. Se vio que el tamaño de partícula de las NPs recubiertas era mayor que el de las NPs de PLGA, y el índice de poli-dispersión (PDI) que indica el grado de homogeneidad de la población de partículas producidas, mostró para las distintas formulaciones una distribución estrecha. También se comprobó que las nanopartículas de PLGA y de PLGA/CS eran esféricas y que su diámetro estaba en un intervalo de entre 100-300 nm.

Las NPs de PLGA presentaban potencial zeta negativo, mientras que el potencial zeta fue positivo para las NP recubiertas con CS.

La eficacia de encapsulación de estas NPs estuvo en torno al 65-70% y aunque se ven poco afectadas por el recubrimiento de CS y de CS-GRGD, éstas sí que eran considerablemente más grandes que las de PLGA.

Las NPs de PLGA/CS eran las que mostraban una liberación más rápida, tanto la inicial como la acumulada final, demostrando así que el tamaño de partícula no tenía nada que ver con la velocidad de liberación.

Por otro lado se estudió la trombolisis de los coágulos, en un modelo de tubo ocluido con una solución de plasma fresco, al añadir soluciones de tPA libre y soluciones de tPA



recubiertas por los otros biomateriales. Se vio que la lisis del coágulo se producía en menor tiempo con las NPs de PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD que con la solución de tPA libre, y además eran también más cortos respecto al de las NPs solo con PLGA. También se vio que las NPs recubiertas digerían mayor cantidad de coágulos que la solución libre de tPA, siendo las NPs de PLGA/CS-GRGD las que lisaron el coágulo de mayor tamaño.

Con esto, se llegó a la conclusión de que las NPs recubiertas con PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD digerían coágulos de mayor tamaño que las elaboradas solo con PLGA y además, aunque éstas últimas poseían un tiempo más corto de lisis de los coágulos que la solución libre de tPA, éste era superior en las NPs revestidas con CS.

Por último, para comprobar la permeación a los coágulos de sangre de las NPs con recubrimientos, se les añadió una capa de NPs fluorescente y se tomaron medidas de la intensidad fluorescente media emitida por esas NPs en cada capa de los coágulos. Las NPs de PLGA/CS-GRGD emitían la intensidad fluorescente más fuerte, mientras que las recubiertas sólo con PLGA emitían la más débil, indicando que las primeras se quedaban en las capas superficiales del coágulo, con lo cual se conseguía una mayor lisis del mismo.

También era importante el hecho de que las NPs, dado su tamaño, podían formar agregados, éstos fueron observados en los coágulos, y en mayor medida para las NPs de PLGA/CS-GRGD que para las de PLGA.

Conclusiones:

Con este estudio, Chung et al. (2008), pone de manifiesto los efectos entre los distintos biomateriales y la fibrina, de modo que se ve que las interacciones electrostáticas que se producen entre la fibrina y éstos biomateriales, sobre todo el CS, hacen que la trombolisis se produzca a una mayor velocidad. Las NPs recubiertas con quitosano: PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD, son de mayor tamaño que las que sólo se elaboran con PLGA y además producen potenciales zeta positivos (tabla 1), lo cual favorece que las NPs penetren en los coágulos, que poseen potenciales zeta negativos.

Tabla 1. Tamaño de partícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulación de las NPS (media  $\pm$  S.D.,  $n = 5$ ). Tomada de Chung et al., 2008.

Propiedades	PLGA NPs	PLGA/CS NPs	PLGA/CS-GRGD
Tamaño de partícula (nm)	265.27 $\pm$ 7.4	320.97 $\pm$ 7.2	320.17 $\pm$ 5.7
Potencial zeta (mV)	-6.847 $\pm$ 0.64	20.187 $\pm$ 1.66	5.187 $\pm$ 1.42
Eficiencia encapsulación (%)	65.477 $\pm$ 4.08	70.537 $\pm$ 3.13	67.337 $\pm$ 1.21

Con este estudio se pretendía acelerar la trombolisis y reducir el tamaño del trombo con NPs cargadas con tPA, de modo que lo ideal sería que al llevar un recubrimiento de PLGA se

evitara la inactivación del tPA por sus inhibidores, principalmente el inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1), consiguiendo una liberación más rápida del t-PA cerca del coágulo y reduciendo la fibrinólisis sistémica (evitando efectos secundarios como las hemorragias).

Los efectos de las de NPs de tPA con PLGA (reducción del tiempo de lisis del coágulo y aumento de la cantidad de coágulos digeridos) fueron demostrados, y si además se usan recubrimientos con CS se ven aumentados esos efectos, lo cual corroboraba el hecho de que las interacciones electrostáticas entre el CS y el coágulo eran beneficiosas. Las interacciones electrostáticas o ligando-receptor entre las NPs de PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD y los componentes de los coágulos (fibrina y receptores GPIIb/IIIa de la membrana plaquetaria) eran importantes en la permeación de estas NPs al interior del coágulo y para poder producir la liberación de tPA en su interior. Sin embargo, se descartó que la permeación por presión de las NPs en el coágulo tuviera efectos en la aceleración de la trombolisis, ya que la disminución de la presión en el modelo de tubo oclusivo era prácticamente cero (Figura 1).

El tamaño de las partículas también influía en la liberación de tPA, ya que NPs de tamaño entre 250 y 320 nm podían penetrar más fácilmente en la estructura porosa de los coágulos (Wolber, 2007) y liberar el tPA en su interior, haciendo que aumente la trombolisis del coágulo.

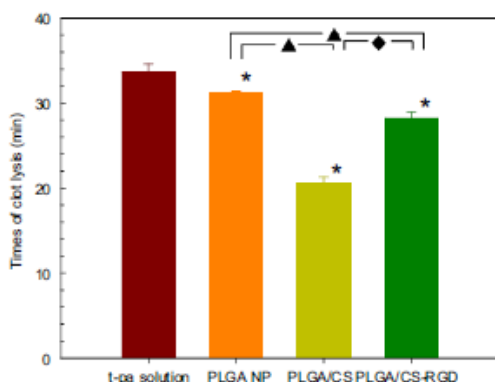


Figura 1. Tiempos de lisis para coágulos de sangre con solución de t-PA libre y NPs de PLGA encapsulados en t-PA. Tomada de Chung et al., 2008.

Los tiempos de lisis de coágulo para todas las NPs (Figura 1) son significativamente más cortos ( $P < 0.01$ ,  $n=5$ ) que el de la solución de tPA, que es el más largo en este trabajo. Las NPs de PLGA/CS tienen el más corto, y es significativamente más corto que el de las NPs de PLGA/CS-GRGD ( $P < 0.01$ ,  $n=5$ ). Además, el tiempo de lisis del coágulo para NPs de PLGA es significativamente más largo ( $P < 0.01$ ,  $n=5$ ) que para NPs de PLGA/CS y PLGA/CS-GRGD.

La conclusión final de este trabajo es que las NPs de PLGA portadoras de t-PA y recubiertas con CS o con el sistema CS-GRGD, son capaces de acelerar la trombolisis mediante las interacciones electrostáticas o ligando-receptor que se producen entre las NPs y la

superficie del coágulo. Las NPs de PLGA/CS poseen el menor tiempo de lisis mientras que las PLGA/CS-GRGD son las que digieren coágulos de mayor peso.

Por tanto, en un modelo de tubo ocluido la trombolisis es más rápida usando estos biomateriales que usando tPA libre. Cabe destacar el hecho de que las NPs de menor tamaño (250-320 nm) penetran con más facilidad en el coágulo y que al ser recubiertas protegen al t-PA de sus inhibidores en el plasma (PAI-1), ayudando a que el tPA se libere en el interior y haga su efecto.

Así, los nuevos transportadores de NPs en el tratamiento trombolítico pueden beneficiar a muchos pacientes que usan la terapia trombolítica convencional.

#### **4.2.2. Nanoagentes multimodales para la detección de trombos intravasculares (McCarthy et al., 2009):**

Partiendo de la base de distintas estrategias de focalización y detección de la trombosis como el estudio de Jaffer et al. (2004), en el que se sintetizó un agente peptídico marcado fluorescentemente dirigido al FXIIIa, y usando la unión no covalente de un péptido apetente por la fibrina de los trombos, se llegó a la conclusión de que se podían sintetizar y caracterizar dos nanoagentes multimodales dirigidos a trombos, los cuales se podían unir a ellos de forma covalente o no.

Para ello, McCarthy et al. (2009), tomaron nanopartículas de óxido de hierro reticulado (CLIO) y las marcaron fluorescentemente con agentes peptídicos que fueron dirigidos a fibrina y a FXIIIa y que al estar marcados por fluorescencia se podían detectar mediante MRI e imagen óptica. El CLIO es un núcleo de óxido de hierro de 5 nm que está recubierto por dextrano aminado y reticulado con epiclorhidrina (Josephson et al., 1999) cuya utilidad es seguir in vivo la formación de los coágulos.

La fluorescencia usada tenía distintos espectros de radiación, con lo cual se podía ver al mismo tiempo cómo la fibrina y el FXIIIa actuaban en la formación del trombo, además de poder determinar su edad y ver la eficacia trombolítica de la terapia empleada.

Se llevó a cabo la síntesis de un determinado número de péptidos y péptidos control para poder realizar las distintas combinaciones de marcación de las NPs CLIO y ver cuál de ellas era la más eficaz. Los péptidos fueron los siguientes:

- Péptido GNQEQVSPLLLKC para la focalización del factor XIII: FXIII.
- Control del péptido de GNAEQVSPLLLKC: CXIII.
- Péptido dirigido a fibrina: GPRPP.
- Péptido de control del péptido dirigido a fibrina: GPSP.

- CLIO-VT680: al CLIO se le agregó el éster succinimidilico de VivoTag 680.
- CLIO-Cy7: al CLIO se le agregó el éster succinimidilico de Cy7.
- Péptido CLIO-FXIII: compuesto por FXIII-CLIO-VT680.
- Péptido control CLIO-CXIII: compuesto por CXIII-CLIO-VT680.
- Péptido CLIO-GPRPP: compuesto por GPRPPGGSKGC-CLIO-Cy7.
- Péptido control CLIO-GPSPP: compuesto por GPSPPGGSKGC-CLIO-Cy7.

La síntesis de estos péptidos se realizó por síntesis del péptido/núcleo de secuenciación de proteínas utilizando estrategias convencionales de síntesis Fmoc y, al igual que todos los procedimientos llevados a cabo para ello, se describe con más detalle en McCarthy et al. (2009).

A continuación, se realizó un ensayo de unión a coágulos in vitro para ver si estos agentes eran capaces de unirse a los coágulos. Los coágulos fueron creados con plasma fresco (FFP) en pocillos. Una vez obtenidos los coágulos se tomaron imágenes por reflectancia de fluorescencia (FRI) en los canales de Cy7 y VT680 (tiempos de exposición de 1-10 s) y se obtuvieron MRI del gel que contenía los coágulos en el sistema OV100 para la correlación de imágenes de fluorescencia y resonancia magnética.

Los resultados obtenidos sobre la capacidad de los agentes sintetizados para unirse a los coágulos in vitro fueron los siguientes:

- Para el agente dirigido a fibrina, CLIO-GPRPP, tras incubarlo con los coágulos se vió que la señal de fluorescencia medida con una radiación comprendida entre 780 y 2500nm (NIRF), era bastante mayor que la correspondiente a los coágulos incubados con los agentes de control CLIO-GPSPP y CLIO-Cy7 (Figura 2).

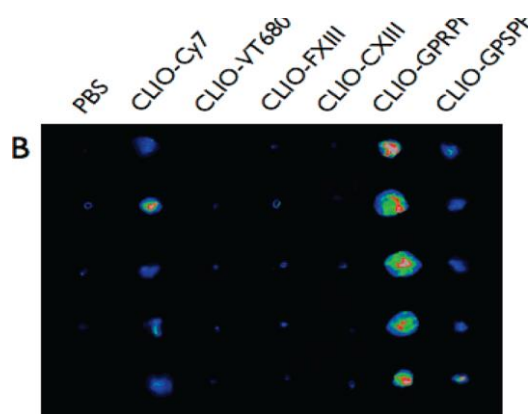


Figura 2. Imágen de reflectancia de fluorescencia de la unión in vitro de los agentes a coágulos de FFP en el canal Cy7. Tomada de McCarthy et al., 2009.

➤ Para el agente dirigido a FXIIIa, el CLIO-FXIII, incubado con los coágulos, la señal NIRF también era considerablemente mayor que para los coágulos incubados con los agentes de control, CLIO-CXIII y CLIO-VT680 (Figura 3).

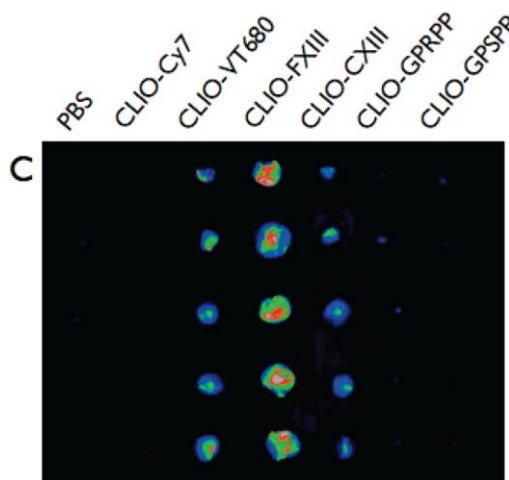


Figura 3. Imágen de reflectancia de fluorescencia de la unión in vitro de los agentes a coágulos de FFP en el canal VT680. Tomada de McCarthy et al., 2009.

Estos resultados daban a entender que los agentes dirigidos a FXIIIa marcados con VT680 tenían una mayor avidéz por los trombos que los marcados con Cy7, que eran los dirigidos a fibrina.

Para medir las capacidades multimodales de estos nanoagentes se utilizaron MRI y FRI. Se tomaron MRI de los coágulos que obtuvieron los resultados más relevantes en el experimento previamente introducidos en agar al 2%. En las MRI para los agentes CLIO-GPRPP (fibrina) y CLIO-FXIII (FXIIIa) unidos a los coágulos se producía una gran pérdida de señal de MRI, mientras que los controles (CLIO-GPSP y CLIO-CXIII), también incubados con los coágulos, apenas sufrían cambios en la señal de MRI.

En las FRI de los coágulos se vió que los agentes CLIO-FXIII se depositaban en mayor medida en el canal VT680 y los agentes CLIO-PRPP se depositaban en el canal Cy7, corroborando de esta forma que eran agentes multimodales.

Por último, para medir la capacidad de focalización de lo nanoagentes se realizaron estudios de trombosis in vivo con animales (ratones). Los trombos in vivo fueron inducidos por daño con cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) en la vena yugular. Los ratones se anestesiaron usando un preparado intraperitoneal (IP) compuesto por ketamina, xilazina y solución salina estéril. A continuación, se realizó una incisión en el cuello exponiendo aproximadamente 1 cm de la vena yugular y el  $\text{FeCl}_3$  se aplicó localmente en la vena yugular produciendo una lesión. 30 minutos después de producir la lesión, se inyectó por vía i.v. a través de un catéter las

NPs dirigidas al trombo (CLIO-GPRPP, CLIO-FXIII) y el agente de control (CLIO-GPSPP, CLIO-CXIII). Luego, 30 minutos después de la inyección del agente los ratones fueron sacrificados, la vena yugular que contenía el trombo y la vena yugular de control contralateral se extirparon y su imagen fue captada en el canal Cy7 (fibrina) y VT680 (FXIII) mediante FRI.

Las nanopartículas CLIO con cada uno de los péptidos indicados anteriormente fueron modificadas para que se les pudiera seguir, como agente de imagen, en su conjugación con fibrina y FXIIIa.

La principal diferencia entre los nanosistemas que usaron para la fibrina y el FXIIIa era la longitud de onda del colorante fluorescente que usaron, para marcar el péptido CLIO-FXIII se usó VT680 y para marcar el péptido dirigido a fibrina (CLIO-GPRPP) se usó Cy7, lo cual permitía obtener imágenes in vivo a la vez de como se iban acumulando ambos agentes y las imágenes de fluorescencia simultáneas de ambos agentes (Cy7 y VT680 son espectralmente distintas). Como resultado, estos dos agentes podían localizar trombos a través de nanopartículas dirigidas a fibrina y determinar la edad y lisis del trombo mediante las dirigidas al FXIII.

#### Conclusiones:

En este trabajo, McCarthy et al. (2009), demostraron que era posible sintetizar dos nanoagentes multimodales y dirigirlos a moléculas claves en los trombos, como son la fibrina y el FXIIIa. Se comprobó in vitro que los coágulos se unían fuertemente a los nanoagentes y que además esto se podía detectar por MRI y FRI. Con los estudios realizados in vivo con ratones se pudo comprobar que los nanoagentes eran capaces de acumularse más fácilmente en los coágulos vasculares que los agentes de control sintetizados de forma simultánea a los nanoagentes. Y, por último, se demostró que estos nanoagentes también servían para poder comprobar la edad de los trombos gracias a la visualización de la fibrina y el FXIIIa en los trombos agudos y subagudos.

#### **4.2.3. Nanoagentes multifuncionales para la terapia fibrinolítica dirigida a trombos (McCarthy et al., 2012):**

Actualmente, solo los activadores del plasminógeno exógenos son los encargados de lisar coágulos, consiguiendo restaurar el flujo sanguíneo muy rápidamente y disminuyendo la mortalidad derivada de los trombos vasculares. Pero se ha visto que aunque esta terapia consigue restaurar el flujo y prevenir la muerte de tejidos y órganos, cuenta con numerosos “fallos”, ya que no es capaz de restaurar al 100% el flujo de los vasos afectados y además puede llegar a afectar a la normalidad del sistema hemostático pudiendo provocar hemorragias.

En este estudio, McCarthy et al. (2012) propone la síntesis de determinados péptidos que actúen, tanto in vitro como in vivo, como nanoagentes dirigidos y que cotengan nanomateriales trombolíticos; en concreto, la síntesis del nanoagente CLIO-FXIII-PEG-tPA, en el que el tPA es el agente trombolítico que va unido a un nanosistema transportador constituido por CLIO-FXIII-PEG. El péptido FXIII se une covalentemente al coágulo y lo modifica (otros agentes dirigidos a trombos no se pueden unir covalentemente al coágulo) pudiendo acumularse libremente en el coágulo sin que exista ninguna interferencia.

El objetivo de esta modificación, la adición de un péptido que dirija al nanoagente a la molécula diana, es que se produzca un conjugado estable.

También se sintetizaron NPs con la secuencia peptídica CXIII (GNAEQVSPLTLKLC).

Para conseguir la fluorescencia que permitiera detectar y evaluar la acción de las NPs, se marcaron con VivoTag 680 (VT680) como fluoróforo NIR. Por otro lado, se les adicionó polietilenglicol (PEG) para enlazar el fármaco fibrinolítico a la partícula, además de minimizar las interacciones estéricas.

El estudio de la unión de las NPs a los coágulos in vitro se realizó con coágulos obtenidos a partir de FFP, siguiendo el procedimiento que se describe en McCarthy et al. (2009) y para evaluar la actividad fibrinolítica in vitro se realizó un ensayo ELISA IMUCLON (American Diagnostica Inc., Stamford, CT).

Para evaluar la actividad del nanoagente in vivo se usaron ratones, en los que mediante una microscopía de fluorescencia se pudo ver la trombosis arterial y venosa. Así, induciendo una embolia pulmonar en el ratón, se pudo determinar la actividad fibrinolítica de los nanoagentes sintetizados comparándolo con la actividad del tPA libre.

McCarthy et al. (2009) describieron entre sus principales resultados los siguientes:

Los agentes trombolíticos obtenidos y sus respectivos controles fueron sintetizados capa por capa, de modo que la capacidad de unión de estos nanoagentes a los coágulos se comprobó en cada etapa de la síntesis, para asegurar que no se produjeran efectos indeseados en la orientación de los agentes a medida que se iban añadiendo capas.

Mediante espectroscopia se cuantificó el número de péptidos que existían por partícula, las funcionalizadas con FXIII y con CXIII. El resultado fue de 34 péptidos, lo cual hizo que aumentara mínimamente el diámetro hemodinámico de las NPs.

Como control se sintetizaron NPs CLIO-PEG-tPA, un nanoagente no dirigido ya que no poseía el péptido FXIII, siguiendo la misma metodología que para el nanoagente dirigido.

Tras la incubación de los nanoagentes con los coágulos se tomaron FRI y los resultados obtenidos revelaron que todos los nanoagentes mostraban señal de fluorescencia pero los dirigidos con FXIII eran las que mostraban mayor señal en cada etapa de la síntesis.

Tanto el nanoagente peptídico dirigido (CLIO-FXIII-PEG-tPA) como su control (CLIO-CXIII-PEG-tPA) llevaban conjugados entre 3 y 4 moléculas de tPA, mientras que el conjugado no peptídico (CLIO-PEG-tPA) sólo llevaba una, por ello, en posteriores estudios McCarthy et al. (2012) abandonaron el estudio del conjugado no peptídico y siguió con los otros nanoagentes, el CLIO-FXIII-PEG-tPA y su control CLIO-CXIII-PEG-tPA.

Respecto a la capacidad fibrinolítica del nanoagente peptídico dirigido (CLIO-FXIII-PEG-tPA) in vitro, ésta se evaluó con el ensayo del dímero-D. El nivel de dímero-D en sangre nos indica la presencia o no de un trombo, niveles bajos indicarían que no existiría un trombo. Los resultados obtenidos de dímero-D cuando se usó el nanoagente dirigido eran similares a los obtenidos usando tPA libre, lo cual indicaba una eficacia trombolítica similar.

A continuación, la capacidad de unión del nanoagente dirigido al coágulo in vivo se evaluó en un modelo murino de arteria y trombosis venosa. Tras la inducción local del trombo se les inyectó a los animales un dextrano de alto peso molecular marcado fluorescentemente (FITC-dextrano) para poder ver la vasculatura y dónde se encontraba el trombo. Luego, se les inyectó a los animales el nanoagente dirigido y su control, y se les dejó circular libremente por el torrente sanguíneo durante una hora para a continuación tomar imágenes mediante una microscopía de fluorescencia intravital (IVFM). A continuación, se vió que el nanoagente dirigido, CLIO-FXIII-PEG-tPA, se podía dirigir muy fácilmente hacia los trombos mientras que el control no. También, según la fluorescencia observada, se comprobó que CLIO-FXIII-PEG-tPA quedaba fundamentalmente en la periferia del coágulo pero no era capaz de penetrarlo (Figura 4A), de modo que en las imágenes se veía el centro del coágulo oscuro y su periferia marcada intensamente con un anillo fluorescente que indicaba la unión con el nanoagente, con lo cual la unión del nanoagente a la superficie del trombo es un proceso que esta favorecido.

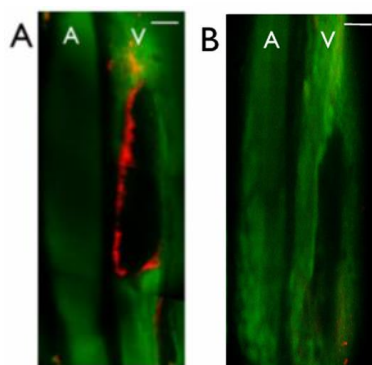


Figura 4. Imágenes de microscopía de fluorescencia intravital (IVFM) (A) muestran como el nanoagente se une a la superficie del coágulo (rojo); (B) donde no se aprecia unión alguna del nanoagente al coágulo. Tomada de McCarthy et al., 2012.



Sin embargo, en los ratones que recibieron el control se vió que la unión de éstos a los coágulos era insignificante (Figura 4B).

Por último, para analizar la capacidad fibrinolítica in vivo del nanoagente usaron un modelo de embolismo pulmonar murino humanizado. Primero se marcó el fibrinógeno humano nativo con [<sup>125</sup>I] en tubos de yodación y con la inyección de un coágulo de plasma humano marcado con <sup>125</sup>I en la vena yugular del ratón, se indujo la embolia pulmonar. A las 2 horas de la inyección los ratones fueron sacrificados para poder visualizar la radioactividad residual del trombo. Diferentes grupos de animales fueron tratados con tPA libre y con nanoagente CLIO-FXIII-PEF-tPA. Se comprobó que cuando se trataba a los animales con CLIO-FXIII-PEF-tPA y tPA libre, a la misma dosis, la eficacia de disolución del coágulo marcado radiactivamente del nanoagente era muy similar a la del tPA libre.

Sin embargo, los autores de esta investigación indican que un posible impedimento estérico entre el nanoagente y la molécula diana, puede provocar una disminución de la unión a fibrina y por tanto de actividad.

#### Conclusiones:

En este estudio no se demostró que el nanoagente estudiado tuviera una eficacia superior frente a los fármacos libres (por ejemplo, el tPA libre), pero si se demuestra que es un prometedor agente dirigido a los trombos para poder diagnosticarlos y tratarlos con, además, un buen perfil de seguridad. Su empleo podría evitar el principal efecto secundario de los fármacos trombolíticos que es la hemorragia, especialmente la hemorragia intracraneal, ya que los nanoagentes no consiguen atravesar la barrera hematoencefálica, de modo que se podrán asociar a los nanoagentes distintos fármacos trombolíticos disminuyendo los efectos secundarios y consiguiendo una mayor eficacia.

#### **4.2.4. Nanoterapias activadas por cizallamiento para la orientación de fármacos a los vasos sanguíneos obstruidos (Korin et al., 2012):**

Se trata de una técnica muy importante para tratar enfermedades potencialmente mortales derivadas de la obstrucción aguda de los vasos sanguíneos del corazón, cerebro y pulmón principalmente.

Con este tipo de nanoterapia lo que se pretende conseguir es una disolución rápida del coágulo, haciendo que el flujo sanguíneo vuelva a ser normal. Todo ello mediante nanopartículas que van a ir cargadas con el activo deseado y que van a ser activadas por cizallamiento en la zona de la oclusión del vaso. Esta estrategia va dirigida a llevar más específicamente el fármaco al sitio deseado, es decir donde esté la obstrucción y, mantenerlo ahí en lugar de que pueda acceder libremente al resto del cuerpo como hacen

los fármacos fibrinolíticos tradicionales, evitando así los posibles efectos indeseados que se puedan producir, principalmente las hemorragias como ya hemos dicho anteriormente.

Cuando la pared vascular está engrosada por la placa de ateroma se produce una elevada fuerza de cizallamiento entre el flujo y la placa de modo que estos nanosistemas aprovechan esa gran fuerza de cizalla para pegarse al coágulo que se ha formado y poder disolverlo.

Los nanosistemas desarrollados en este trabajo (SANT) consisten en agregados de varias nanopartículas de tamaño nanométrico, de modo que el agregado es similar al tamaño de una plaqueta (1-5  $\mu\text{m}$  diámetro).

La hipótesis de trabajo es que estos microagregados se desagregarán por cizallamiento de modo que las nanopartículas individuales ejercerán su efecto sobre el coágulo. Cuando estos agregados se ven sometidos a una elevada fuerza de cizalla se van a romper, de modo que las NPs van a quedar libres y al ser tan pequeñas sufren menor arrastre pudiendo adherirse mucho más fácilmente a la superficie donde está el coágulo.

Además, estas NPs se van a poder recubrir con moléculas específicas que se unan a su diana, en este caso al coágulo de fibrina. Así, se conseguiría reunir una mayor cantidad de agente terapéutico en el lugar de la oclusión vascular.

Los SANTs se obtuvieron mediante secado de pulverizaciones de soluciones concentradas de PLGA para obtener agregados de tamaño micrométrico (microagregados) compuestos de partículas más pequeñas (Figura 5A).

Los microagregados de PLGA se mantienen estables en soluciones acuosas gracias a su hidrofobicidad pero se rompen cuando las fuerzas cohesivas que unen las nanopartículas se ven vencidas por fuerzas mecánicas como la fuerza de cizallamiento (Figura 5B).

A continuación, se comprobó la posibilidad de vehicular los SANTs selectivamente a la región obstruida de los vasos con unas condiciones determinadas de flujo hemodinámico.

Los microagregados SANTs se marcaron fluorescentemente y se mide su sensibilidad a la fuerza de cizalla mediante un reómetro, que aplica fuerzas de cizallamiento controladas in vitro. Para ello se usó un modelo tridimensional que imitaba a los vasos sanguíneos con una obstrucción del 90%, lo cual producía una fuerza de cizalla aproximadamente 100 veces mayor a la del flujo sanguíneo normal, comprobando de esta forma que cuando se alcanzaban las 100  $\text{dinas}/\text{cm}^2$  aumentaba 16 veces la liberación de las NPs en comparación con niveles normales de cizallamiento (1 ó 10  $\text{dinas}/\text{cm}^2$ ) (Figura 5C), lo cual era positivo puesto que esta fuerza de cizalla se produce en múltiples enfermedades cardiovasculares.

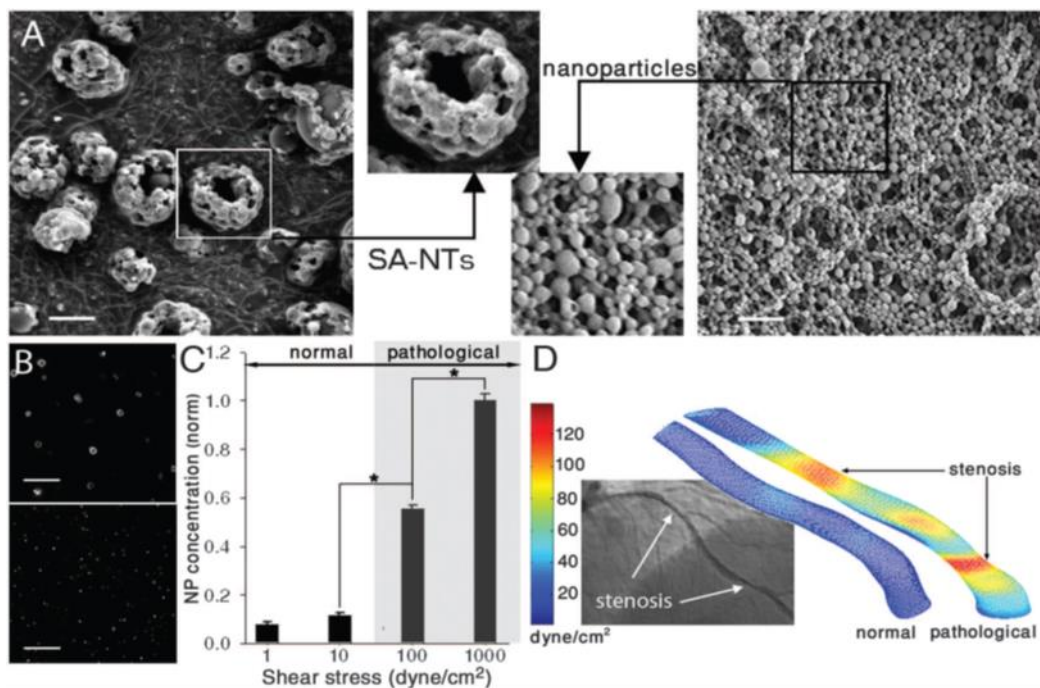


Figura 5: (A) Imágenes de microscopía electrónica de SANT (izquierda) (~ 2-5 mm) y las NPs de PLGA (~ 180 nm) (derecha). (B) Micrografías de fluorescencia que demuestran SANTs intactos (arriba) y NPs dispersas tras su exposición a 1000 dinas/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos usando un reómetro. (C) Liberación de NPs fluorescentes de los SANTs por la fuerza de cizalla (aumenta la liberación al aumentar la fuerza de cizalla a niveles patológicos). (D) Simulaciones fluidodinámicas computacionales (CFD) del esfuerzo cortante fluido en una arteria coronaria normal (izquierda) y en un vaso estenótico con una obstrucción del 60% (derecha). Angiograma de la arteria coronaria izquierda estenótica de un paciente de 63 años en el recuadro izquierdo Tomada de Korin et al., 2012.

Para evaluar la capacidad de estos SANT para disolver coágulos in vivo, lo que se hizo fue marcar fluorescentemente las nanopartículas recubiertas con un fármaco trombolítico, el activador del plasminógeno tisular (tPA), aprobado por la FDA, y se indujo la formación de un coágulo in vivo de forma endógena en un ratón, que será el modelo arterial, mediante la exposición directa con cloruro férrico. Lo cual llevó a que se formaran enormes coágulos de sangre en muy corto periodo de tiempo (minutos) en las arterias mesentéricas, obstruyendo los vasos en un 80% y aumentando la fuerza de cizalla unas 15 veces (aproximadamente 450 dinas/cm<sup>2</sup>).

A los 8 minutos de producir la lesión fueron inyectados por vía i.v. los SANTs que contenían el tPA y que fueron marcados fluorescentemente. De este modo se consiguió visualizar claramente la lesión y además se vio como el tPA que llevan las nanopartículas comenzaba a erosionar el trombo a los 5 minutos de haber sido inyectados.

También se conseguía hacer un seguimiento continuo de los vasos durante 15 minutos confirmándose que los SANTS seguían circulando por el torrente sanguíneo donde no había coágulos (vasculatura normal) intactos sin romper los microagregados.

Con la liberación inducida de SANTS se consigue volver a abrir las arterias ocluidas y retrasar el tiempo de obstrucción del vaso en comparación con la administración de tPA libre. No se obtuvieron los mismos resultados con microagregados de tPA termofundidos (que no se disocian frente a elevadas fuerzas de cizalla) o de nanopartículas de tPA (tPA-NP).

En ensayos donde el vaso estaba casi totalmente obstruido, los SANTS-tPA fueron capaces de unirse al coágulo y degradarlo, logrando su total destrucción y la recanalización del vaso. Así, se concluyó que los SANTS eran eficaces para llevar la terapia trombolítica al sitio de oclusión vascular y obtener una visualización in situ a tiempo real de la lesión vascular.

A continuación, se realizaron otros 2 ensayos más con el fin de evaluar el potencial de estos SANTS para tratar patologías oclusivas embólicas que hacen peligrar la vida del paciente, uno para estudiar la embolia pulmonar in vitro y otro para la embolia pulmonar en ratones vivos.

El primero de estos ensayos se realizó en un modelo in vitro de embolia pulmonar para evaluar si los SANTS tienen la suficiente capacidad de cizalla como para contrarrestar los efectos de la embolia. Se usó un pulmón entero de ratón al que inyectaron por la arteria pulmonar una solución con los coágulos ya preformados y en los que se formaron microcoágulos que al ocluir la arteria hacían que aumentara la presión pulmonar más del triple de sus valores normales, 30 mmHg frente a 8 mmHg. A continuación, se infundieron los SANTS recubiertos con tPA y se realizó un análisis fluorescente microscópico que efectivamente confirmó que se producía un aumento de las NPs con tPA superior a 25 veces en el sitio de oclusión vascular y, además, se conseguía la regularización de la presión arterial pulmonar 1 hora después de la infusión de los SANTS a través de la lisis de los coágulos. Esto era muy positivo puesto que para conseguir los mismos efectos con tPA soluble se debería administrar una dosis 100 veces superior, ya que a la misma concentración no se observaban efectos significativos.

El segundo y último ensayo, estudió la embolia pulmonar en ratones vivos. Los coágulos inyectados por la vena yugular eran más pequeños y se acumulaban en los vasos periféricos. Si los SANTS recubiertos con tPA se administraban justo después de los coágulos, se conseguía disminuir el tamaño y el número de coágulos más del 60%, mientras que si los administraban 30 minutos después solo se conseguía reducir un 30%.

También se administró una infusión de coágulos de un tamaño mayor, los cuales se iban depositando en las arterias pulmonares, similar a lo que ocurre en los humanos en el caso

de una embolia pulmonar. Se hicieron 2 grupos, al primero, el grupo control, se le administró solo el tPA libre y al segundo, los SANTS recubiertos con tPA, inmediatamente después de administrar los coágulos. En el grupo 1, la tasa de supervivencia fue cero, mientras que en el grupo 2 sobrevivieron más del 80% de los ratones y además, no se observaron dificultades respiratorias en ninguno de ellos.

Conclusiones:

Por un lado, se vio que los SANTS presentaban una serie de ventajas que eran bastante aprovechables de cara al desarrollo de nuevas terapias ya que mejoraban la seguridad de las terapias trombolíticas consiguiendo disminuir la dosis de fármaco usada obteniendo los mismos resultados, minimizaban el sangrado y la neurotoxicidad al poder ser eliminados rápidamente de la circulación (80% de aclaramiento en 5 minutos), al ser de mayor tamaño que el tPA libre era más difícil que pudiesen entrar en los tejidos lesionados y se podían usar en la prevención de la formación de trombos cuando las características de la lesión cambian.

Por otro lado, también se demuestra que la técnica de cizallamiento presenta buenos resultados, ya que trata y disuelve coágulos de fibrina en pacientes que ya han sufrido un accidente cardiovascular (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, etc.), al aumentar la fuerza de corte cuanto más estrechamiento se produce en el vaso nos ofrece una estrategia muy útil para la orientación del fármaco, con lo cual se podría llegar a conseguir la administración inmediata de la terapia en aquellos pacientes en los que se sospecha puedan tener un coágulo que amenace su vida y esa administración podría hacerla tanto el cuidador como cualquier sanitario incluso antes de que el paciente llegue al centro hospitalario.

Por tanto, este estudio arroja la esperanza de que en un futuro, se pueda llegar a diseñar y fabricar SANTS cargados con más de un medicamento o también con agentes de imagen para poder así visualizar y localizar en tiempo real las patologías relacionadas con la oclusión vascular.

**4.2.5. Nanosistemas con agentes antiplaquetarios derivados de N-acilhidrazina (Sathler et al., 2014):**

Basándose en el estudio de Jordão et al. (2009), dónde se caracterizó el perfil antiplaquetario de una serie de derivados N-sustituidos-fenilamino-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazidas, a los que nombraremos como 2a, 2c, 2e, 2g y 2h (Figura 6), se vio que algunos de ellos conseguían inhibir la agregación plaquetaria por ácido araquidónico (2c-

$IC_{50} = 8.8 \mu\text{g/mL}$ ), epinefrina ( $2h-IC_{50} = 7.8 \mu\text{g/mL}$ ) y ADP ( $2a - IC_{50} = 19.04 \mu\text{g/mL}$ ), pero sus perfiles antitromboticos in vivo y su toxicidad in vitro no se pudieron determinar.

Por ello, en este estudio Sathler et al. (2014) pretendía caracterizar in vitro e in vivo el perfil biológico y toxicológico de los derivados de N-acilhidrazina comparándolos con la aspirina (antiagregante plaquetario clásico), además de corroborar que las NPs eran las moléculas más prometedoras para la administración de fármacos antitrombóticos, comprobando también la estabilidad del compuesto más activo una vez encapsulado en las NPs de PLGA y PCL.

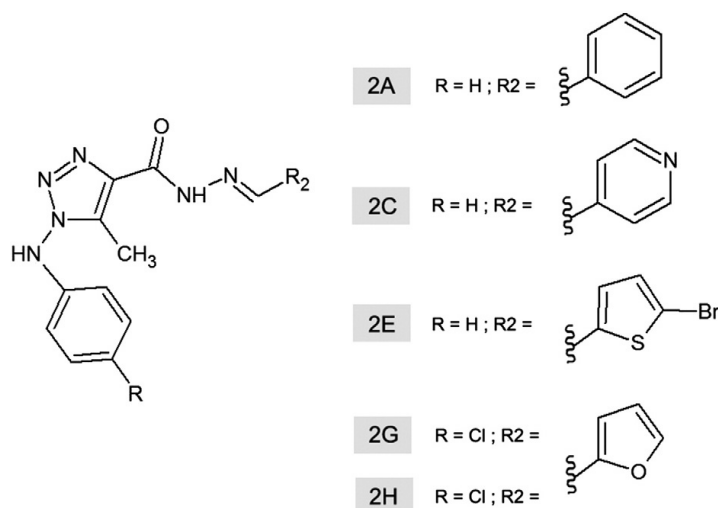


Figura 6. Estructura química de los derivados de N-acilhidrazina. Tomada de Sathler et al., 2014.

Para evaluar la actividad antihemostásica se realizaron dos ensayos:

➤ Ensayos de agregación plaquetaria: se tomaron muestras de sangre de voluntarios adultos que no hubieran consumido fármacos en los 15 días previos, para que no se produjesen interferencias con el experimento y se obtuvo el plasma humano por centrifugación diferencial. Seguidamente, se analizó el efecto de los derivados contra la agregación plaquetaria inducida por trombina usando plaquetas humanas lavadas como se describe Assafim et al. (2013). Las distintas concentraciones del vehículo (DMSO 1%) y los derivados se preincubaron durante 2 minutos antes de añadir el agonista, en este caso el colágeno ( $3 \mu\text{g/mL}$ ) y la trombina (30 unidades de trombina (NIH)/mL de trombina).

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente y se compararon con los que obtuvo el grupo de investigación utilizando como agonistas el ácido araquidónico, ADP y epinefrina.

Estos datos indicaban que de los 5 derivados el 2e tenía mayor efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno (68%) que una concentración similar de aspirina (62%), pero cuando se usó trombina no se observó efecto alguno para ningún derivado.

Por otro lado, los ensayos para determinar la concentración que inhibe el 50% ( $IC_{50}$ ) de la agregación plaquetaria inducida por colágeno dieron como resultado que el valor más bajo era para el derivado 2e ( $IC_{50}$ =65.6  $\mu$ g/ml), seguido de 2a ( $IC_{50}$  = 72.4  $\mu$ g/ml), 2c ( $IC_{50}$ = 90.1  $\mu$ g/ml) y 2g ( $IC_{50}$  = 99.6  $\mu$ g/ml). Estos resultados eran cercanos a los de la aspirina ( $IC_{50}$  =54.4  $\mu$ g/ml) que usamos como control y a los de otros agonistas que también se usaron (Figura 7).

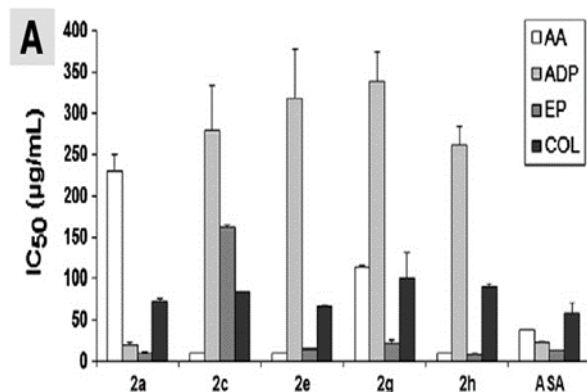


Figura 7. Comparación del perfil antiplaquetario de la aspirina (AAS), y los derivados (100  $\mu$ g/ml) contra la agregación plaquetaria inducida por colágeno y por otros agonistas descritos por Sathler et al., 2014, incluye ácido araquidónico (AA), ADP y epinefrina (EP). Tomada de Sathler et al., 2014.

➤ Ensayo de coagulación: para realizar los ensayos de tiempo de tromboplastina parcial activada (PTT<sub>a</sub>) y de tiempo de protrombina (PT) se usaron distintas muestras de plasma citratadas de voluntarios del Hospital Universitario Antõnio Pedro (HUAP) que no tuvieran alteraciones en el sistema hemostásico.

El resultado de los efectos de los derivados de N-acilhidrazina sobre la coagulación de la sangre mostró que ninguno de ellos tenía efecto significativo sobre el PTT<sub>a</sub> y el PT en comparación con los controles, que en este caso fueron heparina y argatroban (figura 8A y 8B).

A continuación, se determinó el perfil toxicológico in vitro e in vivo para ver así, cuál era el derivado más prometedor. Para ello, se realizaron distintas pruebas de toxicidad: ensayo de reducción de MTT, ensayo de captación de rojo neutro, ensayo de hemólisis, ensayo de toxicidad in vivo y ensayos antitrombóticos.

En los 3 primeros, donde los derivados fueron incubados con una solución de eritrocitos, los resultados arrojaron que los derivados 2g y 2c presentaban un menor nivel inhibitorio de células viables en 8h, similar a la aspirina. Todos los compuestos presentaron un nivel de citotoxicidad más bajo que la aspirina (25%) y no presentaban un perfil hemolítico significativo después de 3h de incubación.

Para ver los resultados de los ensayos antitrombóticos y de toxicidad in vivo se usó un modelo animal de tromboembolismo pulmonar para detectar la supervivencia de estos derivados in vivo, para ello se usaron ratones y se administraron los derivados por vía oral

(10 mmol/Kg). Se comprobó que los derivados tenían unas tasas de supervivencia elevadas, hasta del 83% en 24h, en comparación con la aspirina (33%).

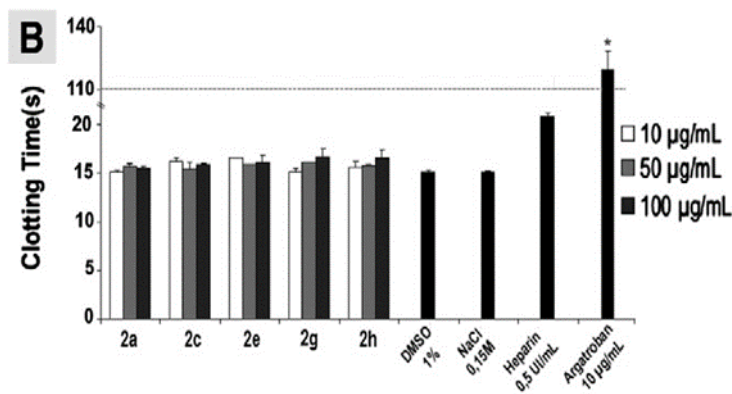


Figura 8A. Evaluación del perfil anticoagulante de los derivados en el tiempo de protrombina (PT). Tomada de Sathler et al., 2014.

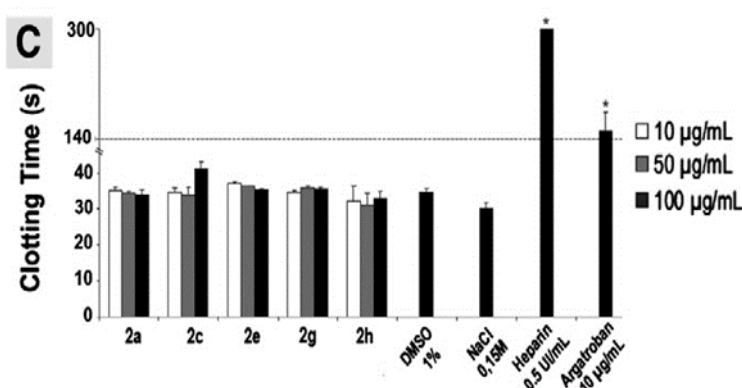


Figura 8B. Ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activada (PTTa). Tomada de Sathler et al., 2014.

Los resultados de ambas figuras son la media de dos experimentos realizados por triplicado con  $P < 0.05$  (ANOVA de una vía, prueba de Tukey).

A continuación, se realizaron análisis histopatológicos del tejido pulmonar de los ratones de los grupos tratados con los derivados de N-acilhidrazina y se vio una disminución en la formación de los trombos en el pulmón en comparación con los del grupo control que no tenían tratamiento alguno. Los tratados con los derivados 2c, 2e y 2h además, presentaban menos hiperemia y hemorragia que los tratados con aspirina, sin embargo, los tratados con los derivados 2a y 2g presentaron una hemorragia intensa.

En el análisis histopatológico de los órganos de los ratones tratados con los derivados de N-acilhidrazina a una dosis terapéutica, se vió que los pulmones se conservaban intactos pero con pequeñas zonas hemorrágicas y cierta dilatación en los vasos sanguíneos debidas a las alteraciones vasculares. Los riñones tanto de los ratones tratados con los derivados como de los tratados con aspirina presentaban pequeñas zonas hemorrágicas y vasos sanguíneos hiperémicos, además los pretratados con los derivados 2a, 2e y 2h presentaban pérdida del área glomerular. Los análisis del tejido hepático revelaron la existencia de hepatocitos conservados sin áreas hemorrágicas en los ratones pretratados tanto con los derivados como con la aspirina en comparación con el grupo control no tratado.



Por otro lado, la preparación y caracterización de las nanopartículas de PLGA y PCL que contenían los derivados de N-acilhidrazina se hizo mediante el método de evaporación-precipitación del solvente similar al que usó Barichello et al. (1999), que consistía en usar 75 mg de PLGA ó 10 mg de PCL y 1.3 mg de cada derivado y disolverlos en 5 ml de acetona con una solución de metanol (90:10). Las nanopartículas se formaron de manera inmediata y los disolventes orgánicos se quitaron de la suspensión coloidal por evaporación rotatoria a 25°C bajo presión reducida (Sathler et al., 2014).

También se llevaron a cabo determinaciones del índice de polidispersidad (PDI), del diámetro, del potencial zeta de la NPs y de la eficacia de carga (LE) de los derivados.

Se comprobó que el derivado 2c presentaba un significativo potencial antitrombótico ya que aumentaba la supervivencia de los ratones con coagulación intravascular diseminada (DIC) un 80% (casi el doble de lo que se conseguía con la aspirina) y además presentaba un mejor perfil de seguridad siendo menos citotóxico que la aspirina. El derivado 2c, por tanto, era el que poseía mayor supervivencia, mayor efecto inhibitorio y menor toxicidad, siendo éste el elegido para llevar a cabo un posible tratamiento para la trombosis.

Durante el estudio se corroboró que los mejores polímeros para preparar las NPs que iban a contener al derivado 2c eran el PLGA y el PCL. La morfología esférica y el tamaño en escala nanométrica eran compatibles con los obtenidos en las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS), su tamaño de 300 nm era adecuado para que las NPs pudiesen circular por el torrente sanguíneo, incluso por los capilares de menor tamaño, sin problema alguno. El potencial zeta dio valores negativos para ambas NPs, lo cual hacía posible aumentar el tiempo de circulación en el organismo del nanosistema debido a la repulsión electrostática que se produce entre las cargas del nanosistema y el endotelio vascular.

Por último, se determinó la liberación de fármacos in vitro. Para realizar estos estudios se agregaron 7.5 ml de la suspensión de NPs de PLGA con el derivado 2c en un tubo de diálisis y se usó un método cromatográfico para analizar la solución. Todo el proceso se hizo siguiendo el descrito por Prabu et al., (2009).

Los resultados obtenidos indicaban que el nanosistema que contenía el derivado 2c tuvo una liberación inicial del mismo durante la primera hora del 36.37%, alcanzando una liberación de casi el 51% en su quinta hora. El perfil de liberación resultó ser lineal del día 8 al 21 y al finalizar la tercera semana (21 días) la liberación había sido del 100%. Además, los valores bajos del índice de polidispersidad indicaban que presentaban una alta homogeneidad en la liberación del compuesto encapsulado.

Conclusiones:

Los derivados 2c y 2g resultaron ser los mejores de la serie de los 5 derivados y también en comparación con la aspirina, ya que mostraron el mejor perfil en los ensayos de citotoxicidad in vitro.

De estos dos el mejor resultó ser el 2c, puesto que presentaba la mejor actividad antitrombótica con los menores efectos secundarios (incidencia hemorrágica más baja) en el modelo in vivo de tromboembolismo pulmonar inducido por trombina y además, no presentaba perfil hemolítico. También fue el que tenía el mejor perfil biológico, era el mejor inhibidor de la agregación plaquetaria y el que tenía mayor supervivencia en el organismo, con lo cual se llegó a la conclusión de que este derivado sería el adecuado para el desarrollo de los nanosistemas que interesaban.

Por otro lado, se comprobó que los polímeros PLGA y PCL resultaban adecuados para contener al derivado 2c y que la nanoprecipitación, tal como describió Barichello et al. (1999), era el mejor procedimiento para encapsularlas. El hecho de que las NPs fueran esféricas y su alta eficiencia de carga, indicaban que estos nanosistemas serían útiles, en un futuro, como tratamiento terapéutico antitrombótico.

Por último, se pudo constatar que las NPs de PLGA tenían una liberación inmediata durante la primera hora, observando un perfil de liberación constante entre 8 y 21 días, lo cual indicaba que poseían un elevado control sobre la tasa de liberación de 2c.

Con todos estos resultados, se puso de manifiesto que el derivado 2c encapsulado en nanopartículas de PLGA era viable como sistema de antiagregación plaquetaria en la primera hora tras alcanzar el torrente sanguíneo y además, 2c contribuye al cumplimiento y adherencia al tratamiento debido a su perfil de liberación controlada, haciendo que el número de dosis administradas al paciente sea menor.

## **5. CONCLUSIONES**

1. Queda corroborado que el recubrimiento de las NPs aporta numerosas ventajas, ya que el fármaco trombolítico que vamos a recubrir o a asociar con nanoagentes, va a ver aumentada su eficacia al estar protegido de sus inhibidores. Esto conlleva que la liberación del fármaco sea más rápida y más cercana al coágulo y así, el proceso de trombolisis se produzca de forma más rápida.

2. El hecho de usar otros polímeros, aparte del PLGA, para recubrir NPs hace que éstas posean unas características diferentes, facilitando entre otras cosas la penetración de las NPs en los coágulos logrando que la trombolisis se produzca en menor tiempo.

3. Aprovechando las interacciones electrostáticas que se producen entre las NPs recubiertas con CS o con el sistema CS/GRGD y la superficie del coágulo o entre los componentes del coágulo, por ejemplo la fibrina, se consigue acelerar la trombolisis.

4. El uso de agentes multimodales es una técnica muy prometedora para la determinación de la edad del trombo, aspecto muy importante en la patología cardiovascular. Además estos agentes multimodales presentan un perfil de seguridad adecuado.

5. Se demuestra que la técnica de MRI es una de las mejores para poder detectar los coágulos marcados con las NPs, al igual que la fluorescencia.

6. Se abren nuevos campos de investigación para visualizar y localizar en tiempo real las patologías vasculares y también la administración inmediata de la terapia desde el primer momento que se sospecha de la aparición de un coágulo.

7. La técnica de activación por cizallamiento demuestra ser muy adecuada para tratar y disolver coágulos en pacientes que ya han sufrido un accidente cardiovascular.

8. La nanotecnología mejora la seguridad de las terapias trombolíticas consiguiendo una disminución del sangrado (efecto secundario de la terapia trombolítica tradicional) y de la neurotoxicidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrada, Ana María. Nanotecnología: descubriendo lo invisible, Editorial Maipue, 2012. ProQues Ebook Central [en línea]. [Consultado en enero de 2019]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uses/detail.action?docID=3200038>.
- Assafim M, Ferreira MS, Frattani FS, Guimarães JA, Monteiro RQ, Zingali RB. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by Bothrops jararacá snake venom. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 807-13.
- Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25: 471-6.
- Caves J, Chaikof E. The evolving impact of microfabrication and nanotechnology on stent design. *J Vasc Surg.* 2006; 44: 136-8.
- Centro de investigación biomédica en red. Biomedicina, biomateriales y nanomedicina [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ciber-bbn.es/programas-transversales/programa-de-difusion-e-internacionalizacion/biomedicina-con-y-para-la-sociedad/miniserie-de-tv/nanomedicina>.
- Chung TW, Lu YF, Wang SS, Lin YS, Chu SH. Growth of human endothelial cells on the photo-chemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans. *Biomaterials* 2002; 23: 4803–4.
- Chung TW, Yang MG, Liu DZ, Chen WP, Pan CI, Wang SS. Enhancing growth human endothelial cells on Arg-Gly-Asp (RGD) embedded poly (ε-caprolactone) (PCL) surface with nanometer scale of surface disturbance. *J Biomed Mater Res* 2005; 72A: 213–9.
- Chung TW, Wang SS, Tsai WJ. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Biomaterials* 2008; 29: 228–237.
- Clavijo D, García G, Clavijo DM, Casadiego C, Zamora R, Alarcón JR, et al. De las nanopartículas a los nanodispositivos. *Universitas Médica.* 2006; 46: 134-7.
- Clavijo D, García G, Mejía O, et al. La frontera entre la biología molecular y la nanotecnología y su impacto en la medicina. *Iatreia.* 2007; 20: 297-307.
- Clavijo D., García G.A., Casadiego C.A., Nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento médico. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, 2008; 49 (3): 388-398.
- Clínica Universidad de Navarra. Accidente cerebrovascular [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/ictus>.

- Euroresidentes [en línea]. [Consultado en septiembre de 2018]. Disponible en: [https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia\\_responsable/nanotecnologia\\_beneficios\\_medicina.htm](https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia_responsable/nanotecnologia_beneficios_medicina.htm).
- Ibañez, Borja. Nuevas técnicas de imagen para la cuantificación de la carga aterosclerótica global. *Revista española de cardiología*, 2007; 60; 3: 299-309 [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.revespcardiol.org/es/nuevas-tecnicas-imagen-cuantificacion-carga/articulo/13100282/>.
- Jaffer, F. A., Tung, C. H., Wykrzykowska, J. J., Ho, N. H., Houg, A. K., Reed, G. L., and Weissleder, R. Molecular imaging of factor XIIIa activity in thrombosis using a novel, near-infrared fluorescent contrast agent that covalently links to thrombi. *Circulation* 2004; 2: 170–176.
- Jaffer, F. A., Vinegoni, C., John, M. C., Aikawa, E., Gold, H. K., Finn, A. V., Ntziachristos, V., Libby, P., and Weissleder, R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* 2008; 18: 1802–1809.
- Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clin Chem*. 2007; 53: 2002-9.
- Jordão AK, Ferreira VF, Lima ES, de Souza MCBV, Carlos ECL, Castro HC, et al. Synthesis, antiplatelet and in silico evaluations of novel N-substituted-phenylamino-5-methyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazides. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 3713-9.
- Josephson, L., Tung, C. H., Moore, A., and Weissleder, R. (1999) High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjugate Chem*. 2, 186–191.
- Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*. 2005; 1: 193- 212.
- Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, Crescente M, Bhata D, Coskun AU, Feldman CL, Wagner DD, Ingber DE. Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Sciencemag* 2012; 337: 738-742.
- Leach JK, O'Rear EA, Patterson E, Miao Y, Johnson AE. Accelerated thrombolysis in a rabbit model of carotid artery thrombosis with liposome-encapsulated and microencapsulated streptokinase. *Thromb Haemost* 2003; 90: 64–70.
- McCarthy JR, Patel P, Botnaru I, Haghayeghi P, Weissleder R, Jaffer FA. Multimodal nanoagents for the detection of intravascular thrombi. *Bioconjug Chem*. 2009; 20: 1251–1255.

- McCarthy JR, Sazonova Y, Sibel Erdem S, Hara T, Thompson BD, Patel P, Botnaru I, Lin CP, Reed GL, Weissleder R, Jaffer FA. Multifunctional nanoagent for thrombus-targeted fibrinolytic therapy. 2012; 7: 1017–1028.
- Medline Plus. Aneurisma aórtico [en línea]. 2018c. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/aorticaneurysm.html>.
- Medline Plus. Enfermedad de las arterias coronarias [en línea]. 2018a. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/coronaryarterydisease.html>.
- MedlinePlus. Enfermedad arterial periférica [en línea]. 2018b. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/peripheralarterialdisease.html>.
- Monografias.com. Nanotecnología, riesgos y beneficios [en línea] [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos87/nanotecnologia-riesgos-y-beneficios/nanotecnologia-riesgos-y-beneficios.shtml>.
- Nguyen PD, O'Rear EA, Johnson AE, Patterson E, Whitsett TL, Bhakta R. Accelerated thrombolysis and reperfusion in a canine model of myocardial infarction by liposomal encapsulation of streptokinase. *Circ Res* 1990; 66: 875–8.
- Ojio S, Takatsu H, Tanaka T, Ueno K, Yokoya K, Matsubara T, Suzuki T, Watanabe S, Morita N, Kawasaki M, Nagano T, Nishio I, Sakai K, Nishigaki K, Takemura G, Noda T, Minatoguchi S, Fujiwara H. Considerable time from the onset of plaque rupture and/or thrombi until the onset of acute myocardial infarction in humans: coronary angiographic findings within 1 week before the onset of infarction. *Circulation* 2000; 102: 2063–2069.
- Pedro-Botet J, Jericó C. Etiopatogenia de la aterosclerosis. Aspectos celulares y moleculares del daño vascular. *Aten Primaria* 2004; 34 (Supl 2): 10-18.
- Perez, J. M., O'Loughin, T., Simeone, F. J., Weissleder, R., and Josephson, L. (2002) DNA-based magnetic nanoparticle assembly acts as a magnetic relaxation nanoswitch allowing screening of DNA-cleaving agents. *J. Am. Chem. Soc.* 12, 2856–2857.
- Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, *et al.* Nanoencapsulation II: biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine*. 2006; 2: 53-65.
- Prabu P, Chaudhari AA, Dharmaraj N, Khil MS, Park SY, Kim HY. Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded with anticancer drug. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90: 1128-36.

- ResearchGate. Sistemas nanoparticulados a base de poliésteres [en línea]. [Consultado en noviembre de 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/268807821\\_Sistemas\\_nanoparticulados\\_a\\_base\\_de\\_poliesteres](https://www.researchgate.net/publication/268807821_Sistemas_nanoparticulados_a_base_de_poliesteres).
- Rojas-Aguirre Y. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? Science Direct. 2016; 27: 286-291 [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X16300295#sec0010>
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 1987; 238:491–7.
- Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discov Today. 2003; 8: 1112-20.
- Sathler PC, Lourenço AL, Range Rodrigues C, Rodrigues Pereira da Silva LC, Mendes Cabral L, Kappel Jordão A, Cunha AC, Bastos Vieira MC, Ferreira VF, Eponina Carvalho-Pinto C, Chung Kanf H, Castro HC. In vitro and in vivo analysis of the antithrombotic and toxicological profile of new antiplatelets N-acylhydrazone derivatives and development of nanosystems. Determination of novel NAH derivatives antiplatelet and nanotechnological approach. Thrombosis Research 2014; 134: 376-383.
- Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse M, Semmler W, Wolf KJ. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Invest Radiol. 2000; 35:460–471.
- Serrano Hernando, Francisco J. Enfermedad arterial periférica: aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. Revista española de cardiología, 2007; 60; 9: 969-982 [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.revespcardiol.org/es/enfermedad-arterial-periferica-aspectos-fisiopatologicos/articulo/13109651/>.
- Sirol M, Fuster V, Badimon JJ, Fallon JT, Moreno PR, Toussaint J-F, Fayad ZA. Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance Imaging and a fibrin-targeted contrast agent. Circulation 2005; 112: 1594-1600.
- Texas Heart Institute. Aneurismas aórticos [en línea]. [Consultado en diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/aneurismas-aorticos/>.
- Verschraegen CF, Gilbert BE, Loyer E, et al. Clinical evaluation or the delivery and safety of aerosolized liposomal 9-nitro20(s)-camptothecin in patients with advance pulmonary malignancies. Clin Cancer Res. 2004; 10: 2319-26.

- 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: 435-441.
- Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* 2007; 21: 131-42.
- Yang, Xiaoming. Nano- and microparticle-based imaging of cardiovascular interventions. *Radiology* 2007; 23; 2: 340-347.



## **ABREVIATURAS**

CLIO: partículas de óxido de hierro reticulado.

CS: quitosano.

CS-GRGD: péptido injertado en quitosano.

DLS: dispersión dinámica de la luz.

DMSO: dimetilsulfóxido.

FDA (Food and Drug Administration): administración de alimentos y medicamentos de EE.UU.

FeCl<sub>3</sub>: cloruro férrico.

FFP: plasma fresco congelado.

FRI: imágenes de reflectancia de fluorescencia.

IP: preparado intraperitoneal.

IVFM: microscopía de fluorescencia intravital.

MR: resonancia magnética.

MRI: imagen de resonancia magnética.

NHI: unidades de trombina.

NIRF: fluorescencia medida con una radiación entre 780 y 2500 nm.

NP: nanopartícula.

PAI: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1.

PCL: poli-(ε-caprolactona).

PDI: índice de poli-dispersión.

PEG: polietilenglicol.

PLGA: ácido poli-(lactida-co-glicolida).

PT: tiempo de protrombina.

PTTa: tiempo de tromboplastina parcial activada.

rt-tPA: activador del plasminógeno tisular recombinante.

SANT: nanosistema con agregados de varias nanopartículas de menor tamaño.

siARN: ARN de interferencia.

SK: estreptoquinasa.

tPA: activador del plasminógeno tisular.