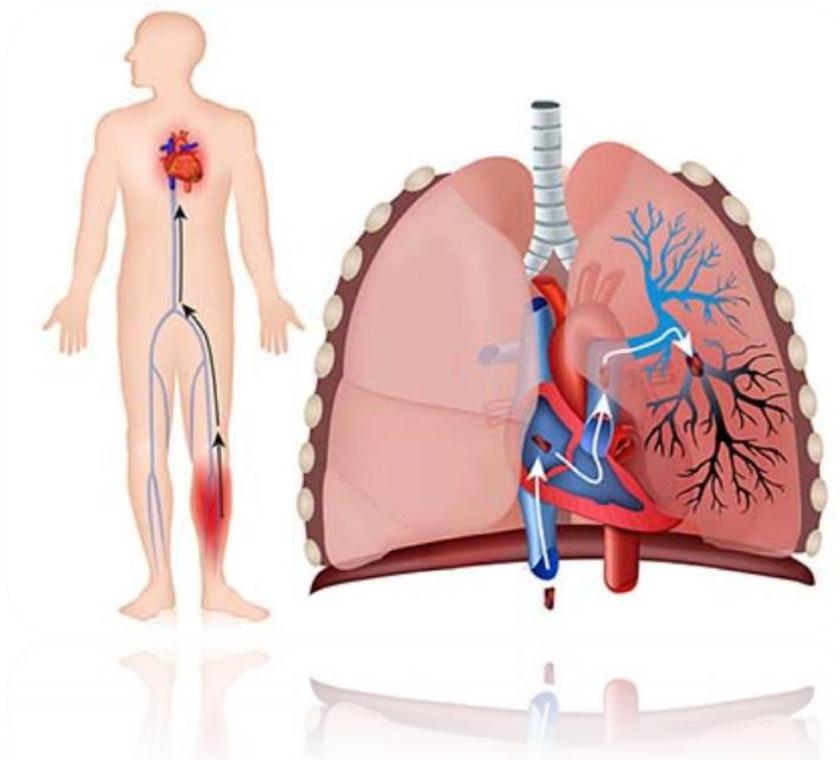




**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



# **ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TROMBOEMBOLISMO PULMONAR. NUEVAS PERSPECTIVAS**



**Miranda Vázquez Bouanani**





**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **GRADO EN FARMACIA**

**ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL**  
**TROMBOEMBOLISMO PULMONAR.**  
**NUEVAS PERSPECTIVAS**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

Trabajo Fin de Grado realizado por **Miranda Vázquez Bouanani**.  
Ha sido dirigido por la tutora **Josefa Álvarez Fuentes**.

**TFG de carácter bibliográfico**

**Facultad de Farmacia. Febrero, 2019**



## **RESUMEN**

El tromboembolismo pulmonar se encuentra entre las patologías de mayor impacto sobre la salud poblacional en el mundo desarrollado, situándose como la tercera causa de morbilidad y mortalidad. Consiste en la aparición de un coágulo sanguíneo en el sistema arterial pulmonar que obstruye el paso de la sangre de forma adecuada, comprometiendo la circulación sistémica del organismo y sometiendo al corazón a una sobrecarga que puede derivar en fallo cardiaco, este hecho lo convierte en una enfermedad muy grave. En muchas ocasiones puede ser prevenible, siempre y cuando los posibles factores de riesgo y los primeros síntomas sean detectados de forma precoz, en este aspecto juega un papel muy importante realizar un diagnóstico correcto, pero el proceso puede resultar difícil porque que sus síntomas pueden ser comunes a otras patologías, o bien, presentarse de forma asintomática.

Si se emplean las técnicas apropiadas y se termina diagnosticando un caso se procederá a la instauración del tratamiento más acorde a las características del paciente. Los esquemas terapéuticos van a tener como objetivo el restablecimiento del flujo sanguíneo y que el sistema arterial pulmonar recupere su correcto funcionamiento. La terapia se elegirá en función del nivel de riesgo que presente el paciente, en cuanto a las posibles complicaciones que pueda sufrir como consecuencia de padecer la enfermedad. En casos de bajo riesgo sería suficiente la administración de heparinas o anticoagulantes orales, pero si el riesgo es elevado habría que recurrir a una terapia trombolítica.

El presente trabajo se ha enfocado principalmente en el caso de un riesgo elevado. Para atacar al trombo responsable de la obstrucción se emplean los fármacos trombolíticos, aquellos que poseen la capacidad de romperlo y disolverlo. El problema que presenta este grupo de fármacos es el escaso tiempo de permanencia en sangre, que conllevaría aplicar altas dosis; y el efecto de sangrado a nivel sistémico. Para solucionar estos inconvenientes se han expuesto distintos diseños terapéuticos empleando nanosistemas que han sido sometidos a una optimización de su estructura con el fin de transportar los fármacos de la forma más selectiva posible hacia el trombo. Las nuevas perspectivas de tratamiento pretenden maximizar la eficacia trombolítica empleando dosis de fármaco más pequeñas que hagan disminuir los efectos secundarios.

## **PALABRAS CLAVES**

*Tromboembolismo pulmonar, Tratamiento tromboembolismo, Nanopartículas trombosis, Liposomas trombosis, Targeting trombo.*

## ABREVIATURAS

- Fármacos:
  - **rt-PA**: activador del plasminógeno tisular recombinante
  - **SK**: estreptoquinasa
  - **t-PA**: activador del plasminógeno tisular
  - **UK**: uroquinasa
  
- Otras abreviaturas:
  - **cRGD**: péptido arginina-glicina-ácido aspártico cíclico
  - **ICG**: colorante verde de indocianina
  - **MNPs**: nanopartículas magnéticas
  - **NETs**: transductores derivados de eritrocitos NIR
  - **NIR**: infrarrojo cercano
  - **NPs**: nanopartículas
  - **NS**: nanosistemas
  - **PEG**: polietilenglicol
  - **TEV**: tromboembolismo pulmonar
  - **TVP**: trombosis venosa profunda

## ÍNDICE

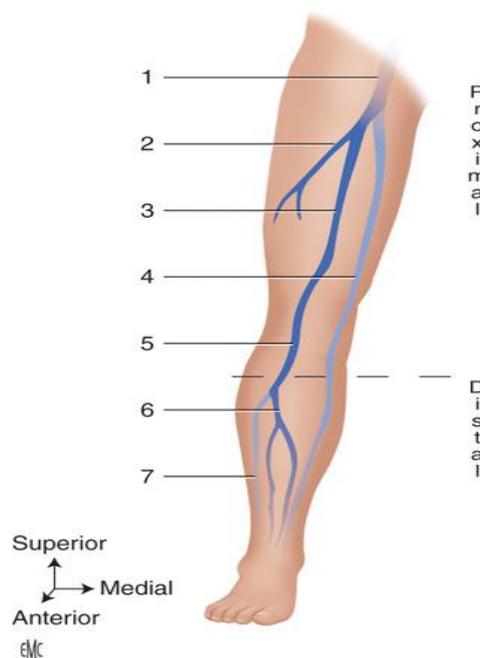
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. <u>Fisiología del tromboembolismo pulmonar</u> .....	6
1.2. <u>Terapia del tromboembolismo pulmonar: fármacos según el nivel de riesgo</u> .....	11
1.2.1. Ante riesgo bajo o intermedio: heparinas y anticoagulantes orales.....	11
1.2.2. Ante riesgo alto: fármacos trombolíticos.....	13
1.3. <u>Objetivos</u> .....	15
2. METODOLOGÍA.....	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1. <u>Tipos de nanosistemas para vehiculización de fármacos</u> .....	18
3.1.1. Nanocápsulas y nanoesferas.....	18
3.1.2. Liposomas.....	19
3.2. <u>Targeting</u> .....	20
3.2.1. <i>Targeting</i> activo.....	20
3.2.2. <i>Targeting</i> pasivo.....	21
3.3. <u>Terapias novedosas del tromboembolismo pulmonar con nanosistemas</u> .....	23
3.3.1. Agregados de nanopartículas de t-PA activadas por cizallamiento.....	24
3.3.2. Nanopartículas de magnetita conjugadas con uroquinasa.....	25
3.3.3. Nanopartículas conjugadas con estreptoquinasa y t-PA: biosíntesis extracelular a partir de <i>Streptococcus equi</i> .....	27
3.3.4. Liposomas pegilados de t-PA funcionalizados con un péptido del fibrinógeno .....	29
3.3.5. Liposomas pegilados de uroquinasa funcionalizados con el péptido cRGD .....	30
3.3.6. Nanopartículas de rt-PA funcionalizadas con fucoidan.....	32
3.3.7. Nanopartículas derivadas de eritrocitos conjugadas con t-PA.....	34
4. CONCLUSIONES .....	36
5. BIBLIOGRAFÍA .....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Fisiología del tromboembolismo pulmonar

El tromboembolismo pulmonar (TEP) es una patología producida como consecuencia de una complicación de la trombosis venosa profunda (TVP), la cual es resultado de la formación de un coágulo sanguíneo (trombo) en el sistema venoso profundo de las extremidades inferiores y la región pélvica. El desarrollo del TEP consiste primeramente en la fragmentación de ese coágulo formado, y posteriormente en su migración por el torrente sanguíneo hasta localizarse en el sistema arterial pulmonar provocando ahí la obstrucción parcial o total de la circulación sanguínea (Alba et al., 2012; Esteban-Jiménez et al., 2013).

La TVP desencadenante del TEP normalmente se desarrolla en las venas de la pantorrilla, aunque también en válvulas y confluencias venosas de la vena poplítea, femoral o ilíaca (Figura 1). Puede verse afectado un solo segmento venoso o varios (Otero y Jara, 2016). Los trombos situados en las venas próximas a la rodilla son los que presentan mayor riesgo de embolia pulmonar (Qaseem et al., 2007).



**Figura 1.** Sistema venoso de las extremidades inferiores. En azul oscuro aparecen las venas profundas y en azul claro las venas superficiales (Moumneh et al., 2018).

Como se muestra en la Figura 1 podríamos destacar las siguientes venas: 1. vena femoral común, 2. vena femoral profunda, 5. vena poplítea y 6. vena tibial, aquellas que,

fundamentalmente, desarrollan trombos que acaban migrando al sistema arterial pulmonar (Moumneh et al., 2018).

### Triada de Virchow

Resulta interesante mencionar la tríada de Virchow, la cual explica que el mecanismo fundamental del tromboembolismo venoso precisa de tres factores para producirse, estos son la hipercoagulabilidad, la estasis de la sangre y la lesión del vaso sanguíneo. Entre estos factores de riesgo, al menos uno de ellos va a contribuir en el desarrollo de la trombosis venosa.

Los coágulos de sangre que aparecen en la arteria pulmonar tienen su origen mayoritariamente en venas alejadas, como son las venas de la pantorrilla en el caso de la TVP. Según esto último, una trombosis en la arteria pulmonar in situ no suele producirse, sino que en los pulmones va a prevalecer la aparición de émbolos en lugar de trombos. Concretamente un émbolo se trata de un trombo que se ha desprendido del endotelio vascular, de venas lejanas en el caso de TEP, pasando a circular por el torrente sanguíneo. (Cha et al., 2015).

### Repercusiones

Cuando se desarrolla TEP la cantidad de sangre que regresa al ventrículo izquierdo del corazón es menor, esto disminuye el gasto cardiaco (volumen de sangre bombeado por minuto), y por lo tanto la circulación sistémica puede verse alterada y posiblemente comprometida; por otro lado, la disminución de la presión sanguínea en el ventrículo derecho provoca su sobrecarga dilatándose para compensar el gasto cardiaco, pudiendo sufrir una isquemia e insuficiencia cardiaca derecha. Todo ello puede progresar a un infarto ventricular derecho, y en última instancia causar la muerte por fallo del ventrículo derecho (Lualdi y Goldhaber, 1995).

### Incidencia

Es una causa de morbimortalidad importante, en concreto, según la *British Thoracic Society* (una organización benéfica registrada) supone la tercera causa de muerte cardiovascular, tras la cardiopatía isquémica y el ictus (Esteban-Jiménez et al., 2013) llegando a alcanzar el 30% de mortalidad cuando no se recibe tratamiento. Es una enfermedad grave y frecuente, que va en aumento. Es cierto que puede ser prevenible en muchos casos, para ello es importante detectar posibles factores de riesgo y la detección precoz de los primeros síntomas (Alba et al., 2012). En la actualidad, la incidencia del TEP en la población general es de 1-2 casos cada 1.000 personas al año (Carrión-Martínez y Rivera-Caravaca, 2016).

### Factores de riesgo

Los factores que pueden aumentar la predisposición a padecer esta enfermedad son los siguientes: edad, genética, embarazo, cirugías, hábitos de vida (sedentarismo, tabaquismo), administración de fármacos, presencia de manifestaciones clínicas agudas (accidente cerebrovascular, infarto agudo de miocardio, traumatismos, neoplasias), o bien, de manifestaciones crónicas (hipertensión arterial, enfermedad pulmonar, diabetes mellitus, obesidad, neoplasias) (Alba et al., 2012).

### Signos y síntomas

El TEP se puede presentar, a veces, de forma asintomática. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 1, cuando es sintomático la aparición de disnea de forma súbita supone el síntoma más frecuente cuando los pacientes acuden a urgencias. A la disnea le sigue, como segundo síntoma más frecuente, el dolor torácico de tipo pleurítico (Alba et al., 2012).

Síntomas	Signos
• Disnea 80%	• Taquipnea (> 20 rpm) 85%
• Dolor torácico pleurítico 52%	• Taquicardia (> 100 lpm) 58%
• Dolor torácico opresivo 12%	• Fiebre (> 37,5°) 50%
• Dolor en la pantorrilla 39%	• Signos de TVP extremidades inferiores 41%
• Sudoración-ansiedad 36%	• Cianosis 11%
• Palpitaciones 10%	
• Dolor anginoso 1%	
• Tos 20%	
• Hemoptisis 11%	
• Síncope 19%	

**Tabla 1.** Manifestaciones clínicas, síntomas y signos, en el TEP ordenadas según el porcentaje de frecuencia en el que aparecen (Alba et al., 2012).

### Diagnóstico

El diagnóstico de esta patología no es precisamente fácil, ya que presenta signos y síntomas inespecíficos, de tal forma que ante la sospecha clínica de estar ante un caso de TEP puede que realmente no sea así. Debido a esto, es necesario recurrir a técnicas que permitan establecer una valoración clínica lo más adecuada, objetiva y científica posible (Otero y Jara, 2016).

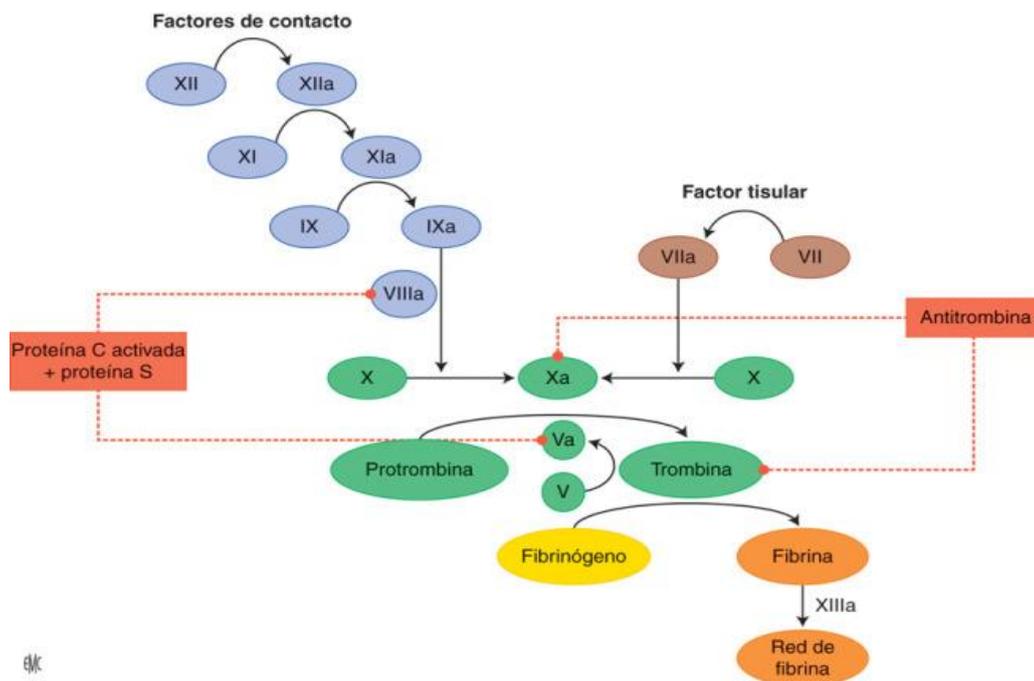
En la unidad de urgencias hospitalarias resultan muy beneficiosas las siguientes pruebas o técnicas: el electrocardiograma, la gasometría (medición de gases en sangre), la radiografía de

tórax, la gammagrafía de ventilación/perfusión, la prueba del dímero D (producto de degradación de la fibrina), la angiografía por tomografía computarizada (angioTAC, técnica de alta especificidad y sensibilidad, no accesible en todos los servicios vasculares), y la arteriografía (no está muy disponible) (Alba et al., 2012).

La información clínica, extraída con las distintas pruebas o técnicas realizadas, supondrá una gran ayuda en el establecimiento de la probabilidad diagnóstica y en la determinación de la gravedad del paciente; permitiendo además la construcción de distintas escalas de riesgo (Baloira y Ruiz, 2010).

### Cascada de coagulación

A continuación, se muestra en la Figura 2 un esquema de los pasos y factores que intervienen en la cascada de la coagulación.



**Figura 2.** Esquema de la cascada de coagulación. La parte izquierda representa la vía intrínseca y la parte derecha representa la vía extrínseca. En rojo se representa el mecanismo de acción de los inhibidores de la coagulación (Suchon et al., 2018).

La hemostasia se puede definir como la respuesta fisiológica que se produce ante una lesión de los vasos sanguíneos, a consecuencia de la cual se va a formar un coágulo para mantener la sangre en el interior del sistema vascular. Se divide en (Barmore y Burns, 2018):

- Hemostasia primaria: consiste en la formación de un tapón blando de plaquetas que conlleva un efecto vasoconstrictor.

- Hemostasia secundaria: consiste en la transformación del fibrinógeno en fibrina que acaba convirtiendo el tapón blando de plaquetas en un coágulo insoluble y endurecido de fibrina.

A continuación, se explican las tres vías de coagulación que existen dentro de la hemostasia primaria y secundaria (Barmore y Burns, 2018):

- ❖ 1. Vía intrínseca: se corresponde con la lesión interna repentina del endotelio vascular. Intervienen los factores de coagulación XII (factor de Hageman), XI (antecedente de tromboplastina plasmática), IX (factor de Christmas) y VIII (factor A antihemofílico).

El comienzo de esta vía consiste en la activación del factor XII, a través de la interacción con colágeno subendotelial en presencia de un zimógeno (proenzima o precursor enzimático en forma inactiva).

La activación del zimógeno a enzima es lo que se designa con la letra “a”, es decir, los factores que llevan la letra “a” es porque se trata de su forma activa.

El factor XIIa activa al XI en XIa, lo que conducirá a la activación del IX en IXa (serina proteasa). En el último paso podemos observar cómo la unión VIIIa-IXa activa el factor X en Xa y se llega a la vía o etapa final común.

- ❖ 2. Vía extrínseca: se activa de forma secundaria ante el suceso de un trauma externo. Intervienen los factores de coagulación VII (factor estabilizador) y III (factor tisular de tromboplastina).

Esta vía implica una menor complejidad para llegar a la vía común. El factor VII al unirse con el III (factor tisular), se transforma en una proteasa activa que va a convertir el factor X en Xa y se llega a la vía común.

- ❖ 3. Vía común: en ella van a confluir las vías intrínseca y extrínseca. Intervienen los factores de coagulación X (Stuart-Prower), V (proacelerina), II (protrombina) y por último el XIII (factor de estabilización de la fibrina). Los megacariocitos (células gigantes de la médula ósea) van a producir las plaquetas y también van a participar en la producción del factor V.

Esta vía consiste en la conversión del fibrinógeno en fibrina y como paso final una vez que la fibrina interacciona con el factor XIIIa se desarrolla la red de fibrina que conformará el coágulo.

De forma más detallada, se procede a explicar la vía común: cuando se produce una lesión vascular la protrombina (factor II) pasa a trombina (factor IIa) a través de la protrombinasa (complejo formado por el factor Xa, Va, iones calcio y fosfolípidos). La acción de la trombina

implica la transformación del fibrinógeno en fibrina, la activación de las plaquetas y el aumento de la permeabilidad endotelial. Todo ello conduce por un lado a la detención de flujo sanguíneo en el lugar de la lesión, y por otro lado a la reparación del sistema vascular dañado.

Por este motivo, la importancia del mecanismo de acción del eje protrombina/trombina; hay terapias anticoagulantes que enfocan su objetivo terapéutico en esta parte de la cascada (Chinnaraj et al., 2018).

La reticulación de la fibrina, en cuanto a las cadenas R y  $\gamma$ , es llevada a cabo por el factor XIIIa, esto incrementa la resistencia a la fibrinólisis característica de los trombos agudos (McCarthy et al., 2009).

## **1.2. Terapia del tromboembolismo pulmonar: fármacos según el nivel de riesgo**

Ya se ha comentado que en la trombosis se acumulan plaquetas y fibrina, inducidas por la activación de factores de coagulación; es la antesala para padecer otros síndromes cardiovasculares que resultan potencialmente mortales, como son el infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular y la embolia pulmonar (principales causas de muerte en el mundo desarrollado).

Por esta razón, es muy importante localizar y caracterizar correctamente los trombos in vivo, de manera que nos permita establecer el tratamiento más adecuado (McCarthy et al., 2009).

En el TEP es necesario conocer la situación hemodinámica concreta del paciente en el momento del diagnóstico, ya que la elección de la terapia será en función de que presente bajo o alto riesgo de sufrir complicaciones en su salud como consecuencia de padecer la enfermedad (Castuera et al., 2015):

- En el caso de un riesgo bajo o intermedio el tratamiento de elección consiste en la administración de anticoagulantes en función de las características del paciente.
- En el caso de un riesgo alto se recurre a fármacos trombolíticos, es decir, fármacos que destruyen los coágulos sanguíneos.

### **1.2.1. Ante riesgo bajo o intermedio: heparinas y anticoagulantes orales**

#### **Tratamiento tradicional**

Consiste en la administración por vía parenteral de heparina no fraccionada (HNF), o bien, heparina de bajo peso molecular (HBPM) (Páramo et al., 2015).

Algunos ejemplos de heparinas empleadas son: **heparina sódica** y **heparina cálcica** (HNF); **enoxaparina**, **nadroparina** y **tinzaparina** (HBPM) (Moumneh et al., 2018).

En segundo lugar, se administran antagonistas de la vitamina K (implicada en la síntesis de algunos factores de coagulación) que actúan como inhibidores competitivos de la misma, en concreto actúan inhibiendo la carboxilación dependiente de vitamina K de los factores II, VII, IX y X, disminuyendo así el efecto coagulante.

En este grupo tenemos la **warfarina** y el **acenocumarol**, que son anticoagulantes orales (Páramo et al., 2015; Seguel, 2015).

#### Nuevos anticoagulantes orales

En los últimos años, los estudios clínicos realizados con nuevos anticoagulantes orales han demostrado una eficacia similar e incluso superior al tratamiento tradicional, donde caben destacar los siguientes grupos de fármacos (Páramo et al., 2015; Seguel, 2015):

##### *a) Los inhibidores selectivos de la trombina*

En la formación del coágulo sanguíneo es esencial que la trombina convierta el fibrinógeno en fibrina.

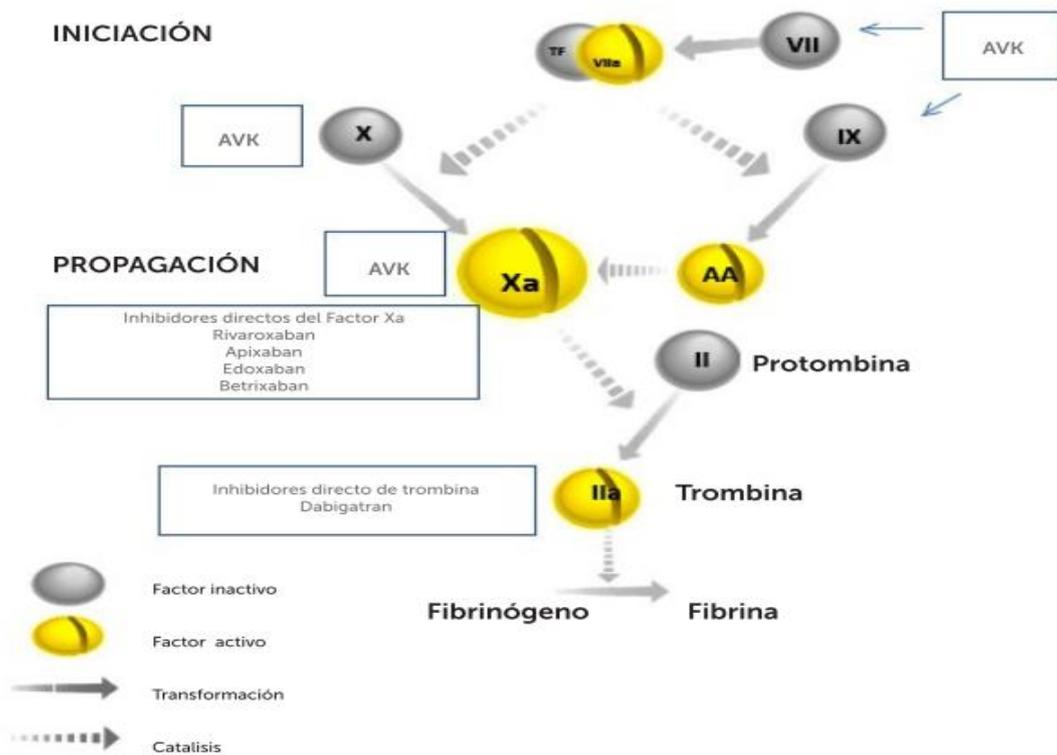
Estos fármacos son capaces de inhibir la acción de la trombina, tanto la que está libre por el torrente sanguíneo como la que está unida al coágulo, bloqueando así el último paso de la cascada, es decir, la formación de una red de fibrina por interacción del factor XIIIa con la fibrina. Aquí tenemos el **dabigatrán** que se emplea para prevenir la embolia, su acción es reversible, apenas tiene interacción con otros fármacos, no interacciona con ningún alimento y no requiere una monitorización diaria.

##### *b) Los inhibidores selectivos del factor Xa*

El factor Xa supone un paso decisivo en las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación, ya que en su ausencia no se puede formar la trombina.

Esta alternativa terapéutica tiene la ventaja de no precisar monitorización de la coagulación. En esta clasificación tenemos **rivaroxabán**, **apixabán** y **edoxabán**, que también se emplean para prevenir la embolia.

En la Figura 3 se ilustra el mecanismo de acción de los antagonistas de la vitamina K (AVK) sobre los factores de coagulación VII, IX y X; y el mecanismo de acción de los nuevos anticoagulantes orales como inhibidores directos del factor Xa y de la trombina (Seguel, 2015).



**Figura 3.** Lugar de acción de los antagonistas de la vitamina K (AVK) y de los nuevos anticoagulantes orales en la cascada de coagulación (Seguel, 2015).

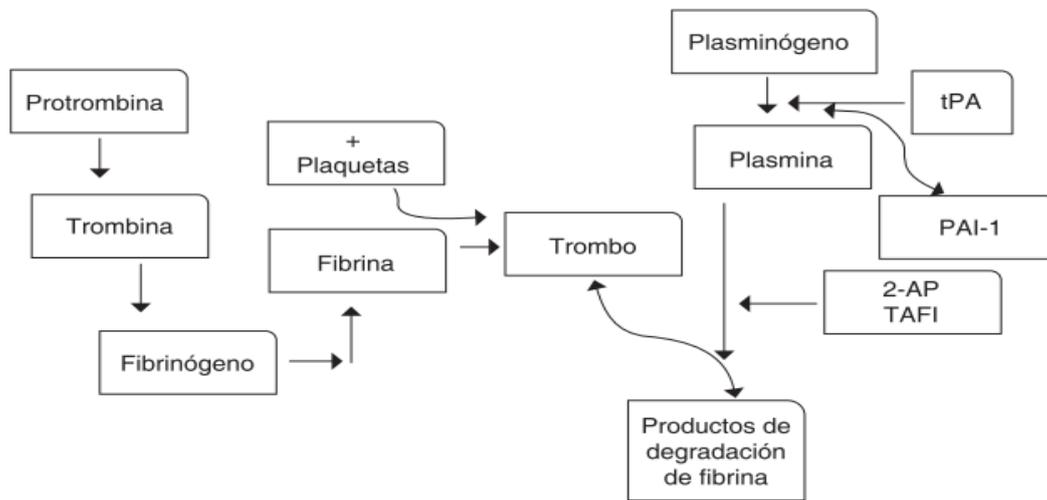
### 1.2.2. Ante riesgo alto: fármacos trombolíticos

En las situaciones de alto riesgo se recurre a los fármacos trombolíticos o fibrinolíticos, son aquellos que rompen los coágulos para posteriormente disolverlos. En este grupo farmacológico tenemos (Baloira y Ruiz, 2010; Tadayon et al., 2015):

- Activador del plasminógeno tisular (t-PA):** enzima natural.
- Activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA):** enzima recombinante.
- Uroquinasa o activador del plasminógeno tipo uroquinasa (UK):** enzima natural.
- Estreptoquinasa (SK):** proteína no enzimática obtenida a partir del cultivo de estreptococos betahemolíticos (bacterias).

Como se representa en la Figura 4, la acumulación de fibrina en el sistema intravascular está relacionada con el desarrollo de trombos, de modo que el proceso de fibrinólisis (degradación de la fibrina) va a ser fundamental para romperlos y proteger ante un proceso agudo de trombosis; y es donde van a actuar los fármacos trombolíticos ya que activan el paso de plasminógeno a plasmina, lo que rompe las redes de fibrina (Flores-Rivera et al., 2014).

En definitiva, el equilibrio entre la hemostasia y la fibrinólisis es lo que conservará la integridad del sistema vascular. En el momento que se produzca una alteración del equilibrio se manifestarán eventos hemorrágicos o trombóticos (Flores-Rivera et al., 2014).



**Figura 4.** Esquema que compara los procesos de coagulación (parte izquierda) y fibrinólisis (parte derecha). PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1, TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (Flores-Rivera et al., 2014).

Los trombolíticos anteriormente citados tienen unas propiedades farmacológicas en común: i) permanecen poco tiempo en sangre (vida media demasiado corta) lo que implicaría la necesidad de administrar dosis altas, y ii) desencadenan efectos secundarios importantes a nivel sistémico (como el riesgo hemorrágico) porque son incapaces de identificar el trombo para ir directamente hacia él sino que implican una activación sistémica del plasminógeno, que pasa a plasmina, alterándose el equilibrio de la hemostasia (Zhang et al., 2018).

Es de especial importancia asegurarse de que no exista ninguna contraindicación, puesto que los trombolíticos pueden provocar un sangrado resultante bastante peligroso. Generalmente, solo se administran a personas que están padeciendo una embolia pulmonar que puede poner realmente en peligro su salud e incluso causarles la muerte. Cuando exista un riesgo bajo no debería emplearse, y en caso de un riesgo intermedio habría que valorarlo (Baloira y Ruiz, 2010).

Existen contraindicaciones absolutas para el uso de fármacos trombolíticos que son los accidentes cerebrovasculares, los traumatismos, las intervenciones quirúrgicas recientes, la propensión al sangrado, las hemorragias digestivas recientes y las neoplasias intracraneales. Por otro lado, las embarazadas son un grupo de riesgo donde la contraindicación es relativa, es decir, en los casos más graves sí está permitido el tratamiento trombolítico (Baloira y Ruiz, 2010).

La trombólisis puede desencadenar complicaciones sobre la salud tales como fiebre, náuseas, vómitos, hipotensión, alergias..., pero la complicación más importante de todas es la aparición de hemorragias, con un riesgo de 6 a 20%. Dentro de las hemorragias, la más preocupante es la intracraneal cuya incidencia oscila entre 0,6 y 3%. Como factores de riesgo tenemos la presencia de un catéter pulmonar, el incremento de la dosis administrada de fármacos trombolíticos, el aumento de edad, la hipertensión crónica, una masa corporal baja y el sexo femenino (Harris y Meek, 2005).

### **1.3. Objetivos**

El presente trabajo tiene como Objetivo Principal el planteamiento de posibilidades terapéuticas, basadas en innovaciones tecnofarmacéuticas, que podrían mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento farmacológico del TEP.

Para ello ha sido necesario abarcar los siguientes objetivos parciales: i) conocer la fisiopatología, tratamiento y complicaciones del TEP, ii) describir los principales nanosistemas usados para investigar la aplicabilidad y eficacia de estas innovaciones, y iii) explicar diferentes formulaciones de nanosistemas cargados con activos trombolíticos que han sido estudiadas para, basándose en la demostración de su eficacia y seguridad, ser propuestas como alternativas terapéuticas.

## 2. METODOLOGÍA

Para adquirir la información necesaria en la elaboración de la presente memoria, se ha recurrido a las bases de datos: ScienceDirect, PubMed y SciELO (pero fundamentalmente a las dos primeras). En estas bases de datos se fueron introduciendo distintas palabras claves para ir tratando cada objetivo de la revisión. En el caso de ScienceDirect y PubMed como son bases de datos en inglés, también se han empleado palabras clave en este idioma.

A continuación, se expone de forma más detallada la estrategia de búsqueda:

### ➤ En cuanto a la introducción:

- Para explicar la fisiología de la enfermedad se buscó “tromboembolismo” dando un número muy elevado de artículos, por lo que se concretó como “tromboembolismo pulmonar” para facilitar la recopilación de información.

- Para plantear la cascada de coagulación y la fibrinólisis se emplearon los términos “hemostasia”, “sistema hemostático” y “fibrinólisis”.

- Para presentar las diversas terapias se introdujo primeramente “tratamiento trombo” y después, para concretar más, se puso “tratamiento tromboembolismo”. Algunos artículos utilizados en la fisiología ya incluían los tratamientos, por lo que se ha recurrido nuevamente a ellos para desarrollar esta parte.

Se ha llevado a cabo una búsqueda de documentos científicos publicados desde el año 2005 hasta la actualidad, exceptuando la explicación de las repercusiones del TEP donde se obtuvieron incluso referencias de 1995 porque se amplió el filtro de búsqueda desde ese año hasta la actualidad.

También se ha recurrido a algún libro on-line, como “Manual de diagnóstico y terapéutica en Neumología” (3ª Edición, 2016), interesante para explicar el desarrollo de la TVP desencadenante del TEP y la dificultad del diagnóstico de este último.

### ➤ En cuanto a los resultados y discusión:

- Para la descripción de los tipos de nanosistemas se utilizaron las palabras “nanopartículas”, “nanotransportadores” y “liposomas”.

- Para los tipos de targeting se puso “targeting thrombus”.

- Para las nuevas estrategias terapéuticas fueron de gran ayuda los artículos que se habían empleado en la introducción porque ya se nombraban los distintos fármacos trombolíticos que

podían emplearse. De este modo, se procedió a realizar la búsqueda poniendo como palabra clave “nanopartículas” o “liposomas” o sus términos en inglés “nanoparticles” y “liposomes”, seguido o antecedido del nombre del fármaco trombolítico concreto en español o inglés (este apartado se ha centrado por completo en los trombolíticos), por ejemplo: i) “plasminógeno liposoma” (en español), ii) “urokinase nanoparticles”, “streptokinase nanoparticles” (en inglés), iii) otras palabras claves: “liposomas trombosis”, “nanoparticles thrombosis”.

Para obtener las terapias más actuales se enfocó la búsqueda a títulos publicados entre 2013 y 2018, prestando mayor interés por las publicaciones entre 2015 y 2018, pero dando aún más relevancia a las de 2018, procurando la mayor actualización posible porque este trabajo ha sido propuesto con el título “Nuevas perspectivas” para el tratamiento del TEP. Además, se ha considerado como aportación importante la inclusión de los ensayos preclínicos y clínicos realizados por las distintas investigaciones que han sido detalladas, ya que así se ofrece más información sobre la posibilidad de que se pudieran llevar a la aplicación clínica de las terapias.

En cuanto a las imágenes que aparecen a lo largo de esta revisión bibliográfica han sido obtenidas a partir de los artículos científicos aquí incluidos; y no han sido modificadas respecto a las fuentes bibliográficas de las que se han extraído originalmente.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

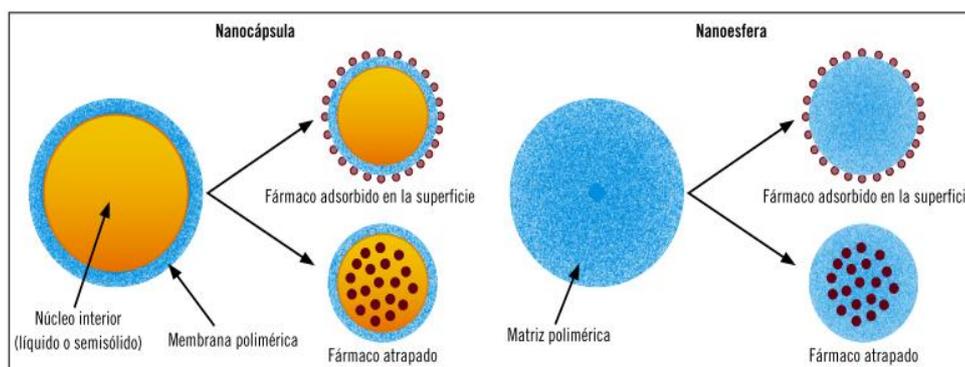
#### 3.1. Tipos de nanosistemas para vehiculización de fármacos

Para mostrar los resultados del trabajo primeramente se ha expuesto, de forma generalizada, las características de los nanosistemas (NS) más usuales en terapéutica. En segundo lugar, se ha explicado cómo se puede conseguir dirigirlos a la diana terapéutica, y por último se han abordado varios ejemplos de estrategias terapéuticas que podrían ser aplicadas en el tratamiento del TEP.

##### 3.1.1. Nanocápsulas y nanoesferas

Las nanoestructuras suponen una línea de investigación de especial interés para la tecnología farmacéutica. Se incluyen dentro de este tipo de sistemas las nanoesferas y las nanocápsulas (Figura 5), ambas nos permiten llevar a cabo una vectorización de los fármacos hacia las células o tejidos diana, optimizándose así la actividad farmacológica de los mismos, por incrementar la selectividad de interacción con la diana terapéutica. Son de tamaño nanométrico (Suñé-Pou y Suñé-Negre, 2016):

- Nanocápsulas: consisten en un núcleo (core) que puede ser líquido o sólido, y está envuelto por una membrana polimérica sólida. Si el núcleo es oleoso sirve para encapsular fármacos lipófilos, y si es acuoso sirve para los fármacos hidrófilos. El fármaco se presenta atrapado en el núcleo aunque también puede encontrarse adsorbido a la envoltura polimérica.
- Nanoesferas: consisten en una matriz polimérica sólida, cuya composición puede estar basada en lípidos, en un nanogel, o en un complejo polielectrólito. El fármaco se localiza atrapado en el interior de la red matricial aunque también puede estar adsorbido en la superficie.



**Figura 5.** Diferencias entre nanocápsulas y nanoesferas (Suñé-Pou y Suñé-Negre, 2016).

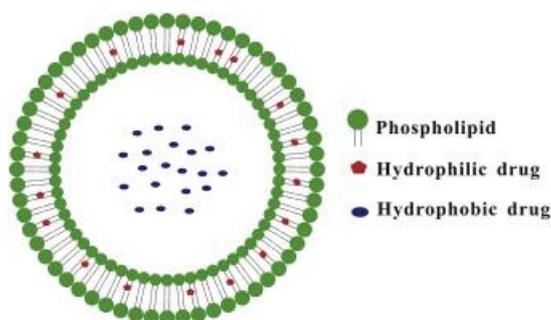
### 3.1.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas aproximadamente esféricas de tamaño nano o micrométrico, compuestas por una parte lipófila en forma de bicapa y otra parte hidrófila, de manera que son moléculas anfifílicas, basadas en la estructura de las membranas biológicas. Se forman por una agregación espontánea de los lípidos (naturales o sintéticos) en un medio acuoso, de manera que tenemos una fase acuosa interna rodeada de una o varias bicapas lipídicas. Es posible incorporar tanto fármacos lipófilos como hidrófilos; los de naturaleza lipófila van a estar en los dominios hidrofóbicos de esta bicapa y los de naturaleza hidrófila van a estar disueltos en el interior acuoso de la vesícula. Este tipo de sistema fue descubierto por Bangham, también permiten la vectorización de los medicamentos, y la consecuente reducción de posibles efectos tóxicos para el organismo (Lanio et al., 2009; Montenegro et al., 2018).

En mayor detalle, los lípidos están formados por la unión de dos cadenas hidrocarbonadas (parte hidrofóbica) con una molécula de glicerol (parte hidrófila) mediante un enlace éster resultando la formación de glicerolípidos; aunque si en lugar de tener el glicerol tenemos como parte hidrófila una molécula de ceramida resultaría la formación de esfingolípidos. Tanto la cabeza polar de glicerol como la de ceramida pueden llevar unidos grupos azúcares (glicolípidos), o bien, grupos fosfatos (fosfolípidos) (Lanio et al., 2009).

Los liposomas pueden clasificarse según el número de bicapas concéntricas que presente su estructura y según el tamaño de los mismos en (Lanio et al., 2009):

- Vesículas multilamelares: presentan varias bicapas lipídicas concéntricas con espacios acuosos entre una y otra. En cuanto al tamaño es de 0.1–10  $\mu\text{m}$ .
- Vesículas unilamelares: presentan una sola bicapa lipídica con la fase interna acuosa (Figura 6). En cuanto al tamaño pueden ser de 3 tipos: de diámetro pequeño (<100 nm), grande (100–500 nm), o gigante ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ).



**Figura 6.** Estructura esquemática de un liposoma y la distribución de los fármacos según su naturaleza (Li et al., 2015).

### **3.2. Targeting**

En esta parte de la memoria se va a proceder a explicar los tipos de *targeting* que se pueden poner en práctica para mejorar la actividad terapéutica de los fármacos incorporados en los NS descritos anteriormente, concretamente para el tratamiento del TEP.

El *targeting* son procedimientos de direccionamiento de los NS específicamente al tejido u órgano diana. El modo de conseguirlo en muchas ocasiones está directamente relacionado con la patología que se pretende tratar.

Existen dos tipos de *targeting*.

#### **3.2.1. *Targeting* activo**

El *targeting* activo consiste en añadir a los NS, a parte del fármaco, un elemento distinto que les permita dirigirse de forma específica hacia la diana terapéutica, el trombo, ejerciendo allí su acción y no en otro sitio que no sea el de interés.

En el caso de los fármacos trombolíticos es muy común que provoquen como efecto secundario hemorragias a nivel sistémico e incluso, la más peligrosa, hemorragia intracraneal. Esto se debe a que no son capaces de concentrar únicamente su actividad farmacológica en la diana cuando son administrados mediante inyección intravenosa como moléculas de forma libre sino que implican una activación sistémica del plasminógeno a lo largo del sistema circulatorio alterando el equilibrio hemostático (Harris y Meek, 2005; Zhang et al., 2018).

Este problema se puede solucionar gracias a la incorporación de elementos que reconozcan exclusivamente al trombo que está provocando la obstrucción de la circulación sanguínea desencadenante del TEP.

Existen diseños de terapias trombolíticas enfocadas en los epítomos de la fibrina que son partes de la molécula reconocidas por el sistema inmunitario; de modo que se pueden diseñar NS que incorporen anticuerpos para dirigirse selectivamente hacia la fibrina presente en el coágulo (Vankayala et al., 2018).

En otros casos se tiene como objetivo las plaquetas activadas o los componentes de la superficie celular del endotelio porque pueden aportar esa selectividad hacia los trombos buscada (Bader et al., 2015).

En esta revisión bibliográfica se explican con más detalle varios ejemplos de *targeting* activo puestos en práctica por distintos investigadores como, por ejemplo:

### I. Adición de péptidos

- ✓ Péptido del fibrinógeno: cadena gamma C-terminal del fibrinógeno (Absar et al., 2013).
- ✓ Péptido cRGD: péptido arginina-glicina-ácido aspártico, en forma cíclica (Zhang et al., 2018).

En ambos casos se produce una conjugación de los NS con estas partículas en su superficie, de modo que se dirigen al complejo GPIIb/IIIa implicado en la activación de las plaquetas formadoras del coágulo. Este complejo GPIIb/IIIa es concretamente el receptor que más abunda sobre la superficie de las plaquetas activadas, participa en la unión de estas al endotelio vascular y en la agregación plaquetaria. Entre los posibles ligandos de GPIIb/IIIa se encuentra el fibrinógeno (ligando principal) y otras proteínas con la secuencia RGD, por este motivo se conseguiría focalizar la acción de un fármaco trombolítico incorporado en NS que presenten cualquiera de los dos tipos de péptidos propuestos (López y Macaya, 2013).

### II. Adición de polisacáridos

- ✓ Fucoidan: dirige hacia la P-selectina, que es una glicoproteína transmembrana sobreexpresada tanto en las plaquetas activadas que van a formar el coágulo como en las células endoteliales activadas de los tejidos isquémicos. Al conjugar el NS con fucoidan se posibilitaría un tratamiento dirigido del fármaco trombolítico incorporado hacia el coágulo (Juenet et al., 2018).

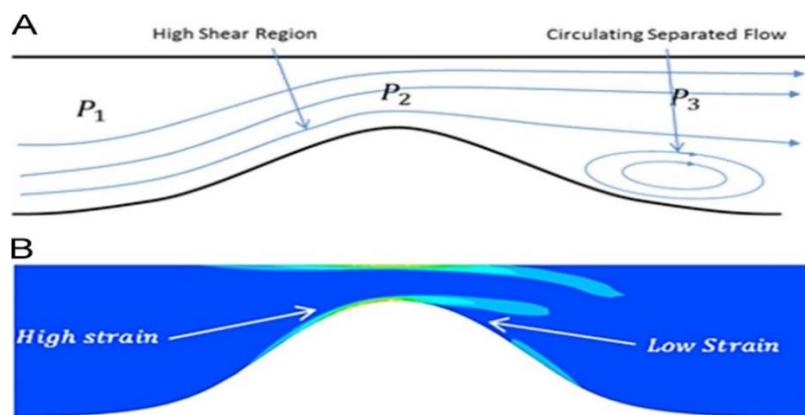
#### **3.2.2. Targeting pasivo**

En este caso, el factor que desencadena el direccionamiento no está incluido o no viene definido estrictamente por el diseño del NS.

#### Consideraciones hemodinámicas (Epshtein y Korin, 2017)

Los vasos sanguíneos estenóticos se caracterizan por presentar una sección estrechada, esto hace que se diferencien de los vasos normales en el estrés o tensión de cizalla del fluido.

La Figura 7 esquematiza un caso de estenosis local en un vaso sanguíneo que provoca zonas de alto y bajo cizallamiento, esto hace que el vaso sea más susceptible a desarrollar un trombo, contribuyendo en gran medida a que avance la enfermedad trombo-oclusiva.



**Figura 7.** A) Representación de las líneas de corriente en un vaso sanguíneo estenótico.  
 B) Ilustración cualitativa de la variación de tensión de cizalla (Epshtein y Korin, 2017).

En la Figura 7A la presión inicial de entrada es  $P_1$ , la presión en la zona de mayor vasoconstricción es  $P_2$  y la presión corriente abajo tras el estrechamiento máximo es  $P_3$ . En este último punto ( $P_3$ ) el vaso sanguíneo recupera su anchura normal.

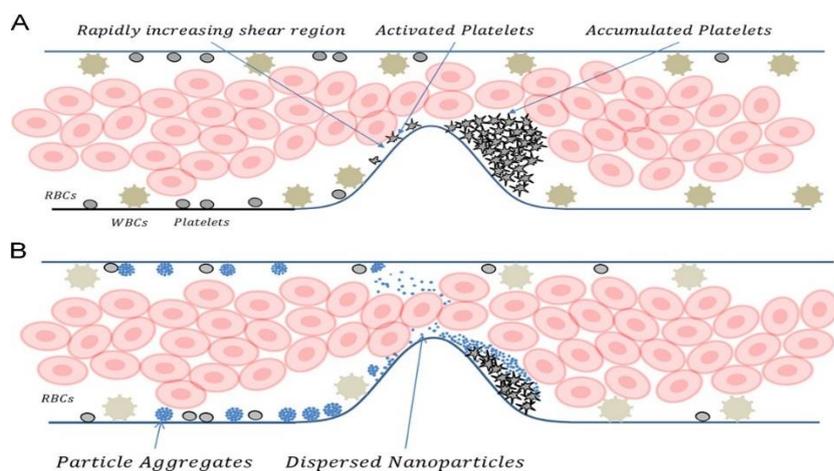
Las variaciones del flujo sanguíneo y el solapamiento de las líneas de corriente van a ejercer una fuerza sobre la pared del vaso que va a depender de la velocidad del flujo, pudiendo producir tensión de alto cizallamiento de forma transitoria.

La figura 7B ilustra de forma cualitativa la tasa de tensión a lo largo de un vaso sanguíneo estenótico, donde se da tensión de alta cizalla en la cúspide del estrechamiento y justo antes de él. Seguidamente, tras el estrechamiento máximo, se pasa a una sección de recirculación del flujo corriente abajo donde se da una menor tensión de cizalla. Se ha confirmado que la región de flujo perturbado y de baja cizalla conduce a la disfunción endotelial, lo que está íntimamente relacionado con el crecimiento del trombo.

#### Activación plaquetaria por cizallamiento (Epshtein y Korin, 2017)

Las plaquetas se pueden activar de forma mecánica por un estrés de cizalla alto prolongado durante un tiempo, al activarse van a unirse a la pared vascular y entre ellas (agregación plaquetaria).

En la Figura 8 se representan los elementos que fluyen por el vaso estenótico como son las plaquetas y los glóbulos blancos, que están sometidos a la alta cizalla de las paredes. Justamente después del estrechamiento se desacelera el flujo y las plaquetas tienden a chocar unas con otras y a agregarse quedando depositadas tras salir del vértice de estrechamiento, y van a estimular el desarrollo del trombo.



**Figura 8.** A) Representación de la activación plaquetaria por cizallamiento en una estenosis vascular. B) Ilustración de la activación por cizallamiento de un agregado de nanopartículas (Epshtein y Korin, 2017).

Se puede visualizar en la Figura 8A que las plaquetas, primeramente, se activan en la región de alto estrés de cizalla y luego se agregan en la región corriente abajo que sigue a la estenosis vascular máxima. Por similitud a este mecanismo natural de las plaquetas, se refleja en la figura 8B qué ocurriría con un agregado de nanopartículas (NPs); este se va a romper en la región de alto estrés de cizalla dispersándose en NPs individuales que van a quedar adheridas localmente en el lugar de la corriente abajo.

En definitiva, una posible estrategia terapéutica podría consistir en aprovechar la tensión de cizallamiento de la propia estenosis u obstrucción vascular como mecanismo para un tratamiento dirigido de los NS de fármacos trombolíticos.

### **3.3. Terapias novedosas del tromboembolismo pulmonar con nanosistemas**

En este apartado se abarca la descripción de nuevas perspectivas para el tratamiento del TEP basadas en NS de fármacos de acción trombolítica: t-PA, rt-PA, UK y SK.

La terapia aguda ante una embolia pulmonar requiere ser administrada al poco tiempo de presentarse los síntomas para lograr un mejor resultado terapéutico. Consiste en combinar fármacos trombolíticos, administrándolos a nivel sistémico, o bien, administrarlos a nivel hospitalario mediante un catéter colocado previamente dentro del vaso sanguíneo obstruido. La dosis de estos fármacos tiene que ser limitada y bien controlada ya que hay un riesgo de sangrado importante al estar distribuyéndose por todo el organismo libremente. Para intentar evitar este riesgo, se ha llevado a cabo un diseño estratégico de NS de manera que dirijan y concentren selectivamente los fármacos trombolíticos en el lugar obstruido (Korin et al., 2012).

### 3.3.1. Agregados de nanopartículas de t-PA activadas por cizallamiento (Epshtein y Korin, 2017)

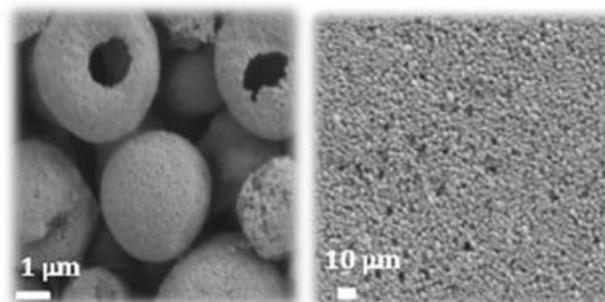
En base a los conocimientos sobre la activación plaquetaria inducida por estrés de cizalla se ha abordado una estrategia nanoterapéutica que consiste en la elaboración de agregados de NPs sensibles a procesos mecánicos como el citado estrés de cizalla; que va a inducir la dispersión del agregado en sus componentes nanoparticulares individuales en la vasculatura estenótica.

Las NPs han sido elaboradas a partir de un polímero compatible biológicamente y biodegradable que es el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

El gran tamaño de los agregados micrométricos minimiza la probabilidad de adhesión a la pared del vaso sanguíneo al ser arrastrado por una fuerza hidrodinámica elevada, por esta razón deben dispersarse en las NPs que lo componen para poder quedar adheridas.

Las NPs permanecen unidas en forma de agregado de tamaño micrométrico mediante fuerzas de Van-der-Waals (uniones bastante débiles), hasta que llegan a una región de alta fuerza de cizalla donde podrán separarse unas de otras. Una vez que las fuerzas adhesivas que mantenían unidas las NPs han sido vencidas, se produce el depósito de éstas en la zona de corriente abajo del vaso estrechado.

En la Figura 9 se puede observar el agregado, inicialmente micrométrico, compuesto por partículas nanométricas agregadas entre ellas.



**Figura 9.** Morfología de agregados de tamaño micrométrico (izquierda), y de agregados de las NPs individuales (derecha) (Epshtein y Korin, 2017).

En esta investigación, las NPs que conforman los agregados están recubiertas con el trombolítico t-PA, de modo que el fármaco actúa una vez que se produce la desagregación de las NPs alcanzándose una lisis del trombo más eficaz con una menor dosis, lo que permitiría reducir el riesgo hemorrágico.

Se ha probado la capacidad de lisis de émbolos tanto *ex vivo* como *in vivo* en un modelo de ratón con embolia pulmonar inducida obteniéndose buenos resultados:

- *Ex vivo*: la presión de la arteria pulmonar volvió a niveles normales tras la aplicación de los agregados de NPs de t-PA, y para lograr el mismo efecto se tenía que administrar una cantidad de t-PA libre mucho mayor; entonces esta estrategia suponía una ventaja en cuanto a la reducción de la dosis.
- *In vivo*: se consiguió la supervivencia de la mayoría de los ratones, quedando demostrada la eficacia trombolítica. Además, posteriormente se ha estudiado en varios modelos *in vivo* quedando también demostrada su eficacia.

Sin embargo, hay que aclarar que esta estrategia también puede presentar limitaciones, una de ellas es que la capacidad de permanencia en la circulación sanguínea de las NPs es corta, aunque siempre mayor que la del t-PA que presenta una semivida de minutos. En cualquier caso, siempre es beneficioso cualquier incremento en el tiempo de permanencia en la circulación.

### **3.3.2. Nanopartículas de magnetita conjugadas con uroquinasa (Prilepskii et al., 2018)**

La magnetita es un mineral de hierro y el único material magnético aprobado por la FDA y la EMA para la administración intravenosa de activos farmacológicos. Las más empleadas para la elaboración nanopartículas magnéticamente dirigibles (MNPs), por aplicación de un campo magnético externo, son las basadas en óxido de hierro ( $Fe_3O_4$ ) puesto que son las más biocompatibles a largo plazo.

Los estudios realizados por Prilepskii et al. (2018) explican que la UK se podía unir a la magnetita quedando inmovilizada, empleando para ello sílice o polímeros orgánicos y moléculas que actúan como enlazadoras, pero la biocompatibilidad del producto final podía verse afectada. Además, evaluaron que las NPs así elaboradas no implicaran efectos tóxicos graves, ni que se alcanzara la dosis de fármaco capaz de provocar la muerte del 50% de los individuos del ensayo ( $LD_{50}$ ).

Habiendo comprobado en estudios anteriores que la estructura de magnetita aseguraba la estabilidad de las enzimas protegidas en su interior, investigaron el atrapamiento de enzimas trombolíticas como la UK; en esta investigación demostraron que estas MNPs de UK eran más activas que la UK libre y, además, tanto los efectos secundarios como la dosis requerida eran menores. No obstante, aunque obtuvieron buenos resultados, el rendimiento seguía siendo bajo (en cuanto a síntesis, purificación y filtración) de modo que decidieron probar una variación en la formulación, la conjugación de la enzima trombolítica en la superficie de la MNP.

Entonces probaron la elaboración de MNPs con un recubrimiento de heparina, la cual actuaría como un agente de reticulación proporcionando la interacción electroestática necesaria con la enzima UK para que quedase, en este caso, adsorbida en superficie.

La heparina se eligió por varios motivos, como son, su propia actividad anticoagulante, su compatibilidad biológica y su capacidad de interacción con la superficie de magnetita al presentar grupos carboxílicos y grupos sulfatos con cargas negativas. Debido a la carga positiva que presenta la UK se consiguió por un lado una gran adsorción de esta y, por otro lado, una gran estabilidad del sistema coloidal final.

Se evidenció una mayor actividad trombolítica a través de los estudios:

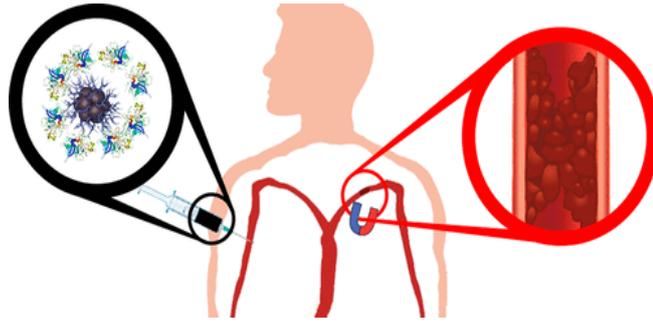
- *In vitro*: empleando un modelo de coágulo, generado por la adición de trombina a plasma sanguíneo, se pudo observar la lisis del mismo.
- *In vivo*: en modelos animales de ratas y conejos que desarrollaron coágulos inducidos por una solución de cloruro de hierro y ácido ascórbico. La inyección intravenosa proporcionó una disolución del coágulo muy eficaz, superando a la de UK libre, sin complicaciones tóxicas graves ni hemorragia sistémica que comprometiesen la vida de los animales tras probar distintas dosis terapéuticas. Solo se observó cierta acumulación de hierro en algunos órganos como riñón, hígado y bazo sin complicaciones graves, de forma temporal.

Esta nueva formulación permitía la conjugación de una cantidad elevada de UK sobre la superficie de las MNPs, un hecho que compensaba la actividad de los inhibidores plasmáticos situados cerca del coágulo; así se prolongaba el tiempo de lisis

En definitiva, quedó demostrado con este estudio que se trataban de NPs biocompatibles y de preparación sencilla, capaces de combatir los coágulos sanguíneos permitiendo la recuperación de un flujo sanguíneo normal. Por otro lado, la heparina no supuso ningún efecto inhibitor sobre la actividad del fármaco.

Es fundamental resaltar que el control magnético, por aplicación exterior de una pauta magnética dirigida, mejoró todavía más la eficacia trombolítica porque permite que sea un tratamiento dirigido específicamente al trombo.

En la figura 10 se esquematiza una administración hipotética de la nueva estrategia en humanos para que actúe sobre el sistema arterial pulmonar obstruido por un trombo, pero no se ha llegado a hacer ningún ensayo clínico.



**Figura 10.** Ilustración de una posible administración de MNPs conjugadas con UK (Prilepskii et al., 2018).

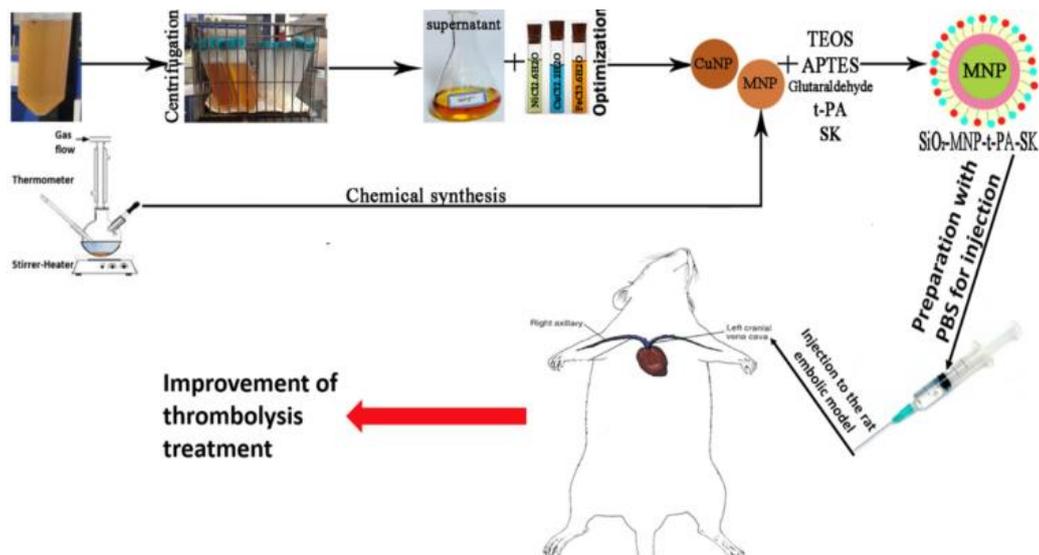
### **3.3.3. Nanopartículas conjugadas con estreptoquinasa y t-PA: biosíntesis extracelular a partir de *Streptococcus equi* (Tadayon et al., 2015; Tadayon et al., 2016)**

En el ámbito de la nanotecnología, se han empleado diversas formas de producción de NS; la síntesis biológica supone otra opción más que resulta atractiva y no debe pasar desapercibida.

El proceso de biosíntesis extracelular presenta una serie de ventajas: requerimientos energéticos inferiores, disgregación en medio acuoso, no toxicidad y coste bajo. Además, permite la obtención de fármacos dirigibles porque hay microorganismos, como las bacterias, que pueden reducir el hierro de su metabolismo obteniéndose magnetita como producto final con un tamaño nanométrico ya definido y esto permitiría la elaboración de MNPs. Además de la magnetita se pueden obtener otros metales del metabolismo bacteriano, como por ejemplo el cobre.

Los autores elaboraron MNPs y NPs de cobre empleando un sobrenadante de cepas de *Streptococcus equi* (procedente de caballos de Irán) para la biosíntesis extracelular, en gran volumen, de las mismas. Al evaluarse la capacidad productiva de *S.equi* se vio que las NPs producidas resultaron ser estables y con buena dispersión.

En la Figura 11 se compara la síntesis química de las MNPs con su biosíntesis a partir de un sobrenadante de *S.equi*; y además se representa la biosíntesis de las NPs de cobre a partir del mismo sobrenadante. En ambos casos, los NS obtenidos fueron recubiertos con óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) para cargar los fármacos puesto que aportaba gran cantidad de poros uniformes; y con grupos amino porque se sabía que este hecho aumentaba la velocidad de fibrinólisis. En el último paso se conjugaron las moléculas de SK y t-PA que fueron inmovilizados mediante glutaraldehído (agente de reticulación). Posteriormente se probó la eficacia trombolítica de ambos NS guiados por un imán externo, tras ser inyectados por vía intravenosa en un modelo de rata con embolia.



**Figura 11.** Obtención de NPs metálicas (de magnetita y de cobre) conjugadas con SK y t-PA, e inyección en modelo de rata (Tadayon et al., 2016).

En la investigación de Tadayon et al. (2016), la lisis local, en un modelo de rata con embolismo inducido, pudo ser evaluada tras someter al animal a un campo magnético externo con un imán que permitía el tratamiento dirigido, siendo así menor el tiempo necesario para obtener la acción farmacológica. Además, se logró minimizar el riesgo hemorrágico y la dosis, y aumentar la semivida de los fármacos.

La eficacia *in vitro* de las MNPs, cuya composición se refleja en la Figura 11, había sido demostrada anteriormente por Tadayon et al. (2015), empleando sangre humana procedente de un voluntario sano (extraída varias veces), a la que añadieron trombina para obtener los coágulos. Se aplicó un campo magnético que redujo el tiempo de trombólisis. Dedujeron que la inmovilización de SK y t-PA (con el agente de reticulación glutaraldehído) retendría su actividad hasta llegar a la diana, lo que disminuiría el riesgo de sangrado.

Es interesante destacar que las MNPs obtenidas a partir de este método, en comparación con la síntesis química, eran más estables porque fueron preparadas en el sobrenadante bacteriano de *S.equi*. Por otro lado, este método también proporcionaba un control adecuado de la magnetita y de la temperatura del NS (requiriéndose una temperatura más baja que en la síntesis química).

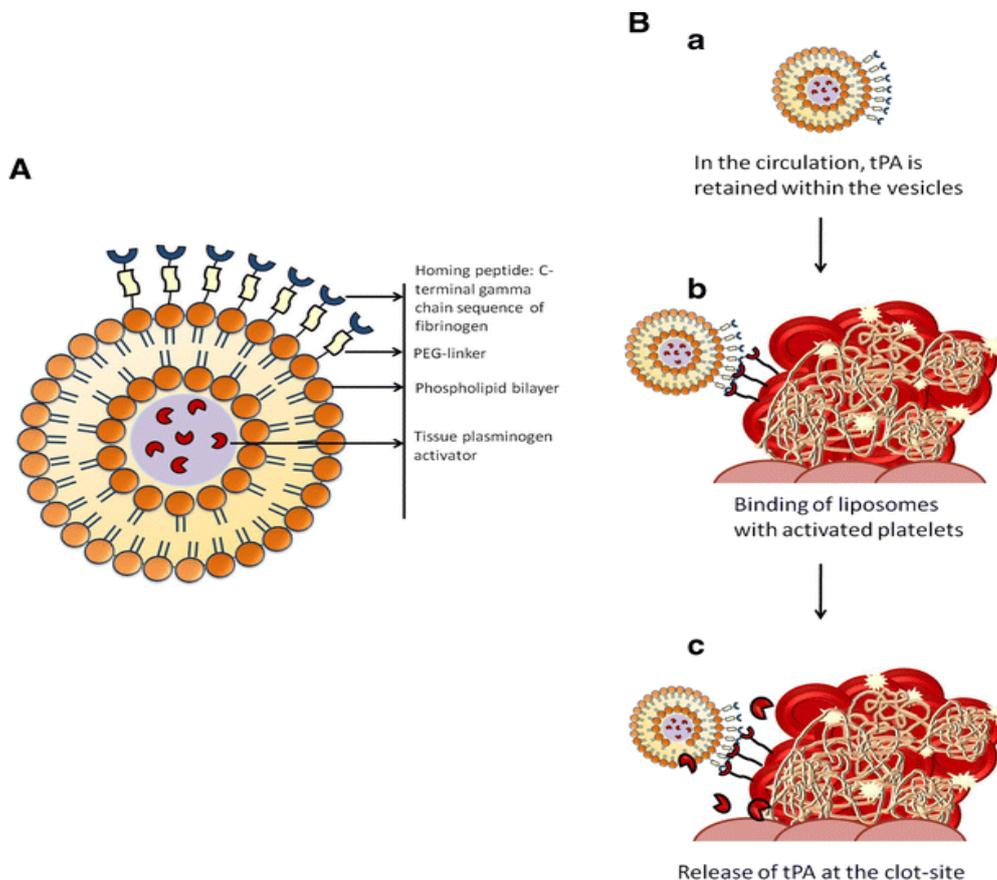
### 3.3.4. Liposomas pegilados de t-PA funcionalizados con un péptido del fibrinógeno (Absar et al., 2013)

La pegilación o unión de cadenas de polietilenglicol (PEG) aporta estabilidad a los preparados liposomales, y NS en general, prolongando el tiempo de vida media de los fármacos incorporados en ellos con un perfil de liberación mejorado.

Absar et al. (2013) prepararon liposomas pegilados cuya superficie fue recubierta con la secuencia peptídica de la cadena gamma C-terminal del fibrinógeno. La finalidad de adicionar estas cadenas peptídicas era propiciar la unión selectiva del liposoma a las glicoproteínas GPIIb/IIIa expresadas por las plaquetas activadas en un proceso trombótico.

El objetivo terapéutico consiste en afianzar la liberación del t-PA de forma continua para evitar la reaparición de un evento trombótico, lo que resulta bastante común tras la recuperación del fluido normal dentro de los vasos sanguíneos.

En la Figura 12 se representa el esquema de esta estrategia terapéutica basada en el tratamiento dirigido hacia las plaquetas activadas que forman el trombo.



**Figura 12.** Ilustración de liposomas pegilados de t-PA y cubierta peptídica. A) Preparado liposomal objetivo. B) Interacción liposoma-coágulo (Absar et al., 2013).

La interacción de estos liposomas con el trombo se detalla en la figura 12B de la siguiente forma: (a) el fármaco está atrapado en la vesícula liposomal, (b) las vesículas interaccionan con las plaquetas activadas, (c) el fármaco se libera para ejercer su actividad sobre el trombo.

Las distintas propiedades de estos liposomas fueron evaluadas de la siguiente forma:

- *In vitro* se ha observado: i) la actividad fibrinolítica del t-PA (en placa de agar con fibrina y ensayos de lisis de sangre humana coagulada), ii) el perfil de liberación y estabilidad.
- *In vivo*, a partir de un modelo de rata con trombosis en vena cava inferior, se ha evaluado: i) el anclaje de liposomas marcados con péptidos fluorescentes a las plaquetas activadas (por microscopía de fluorescencia), ii) el perfil farmacocinético (ensayo cromogénico de la concentración de tPA en extracción de sangre), iii) eficacia anticoagulante (observación y pesada de los coágulos).

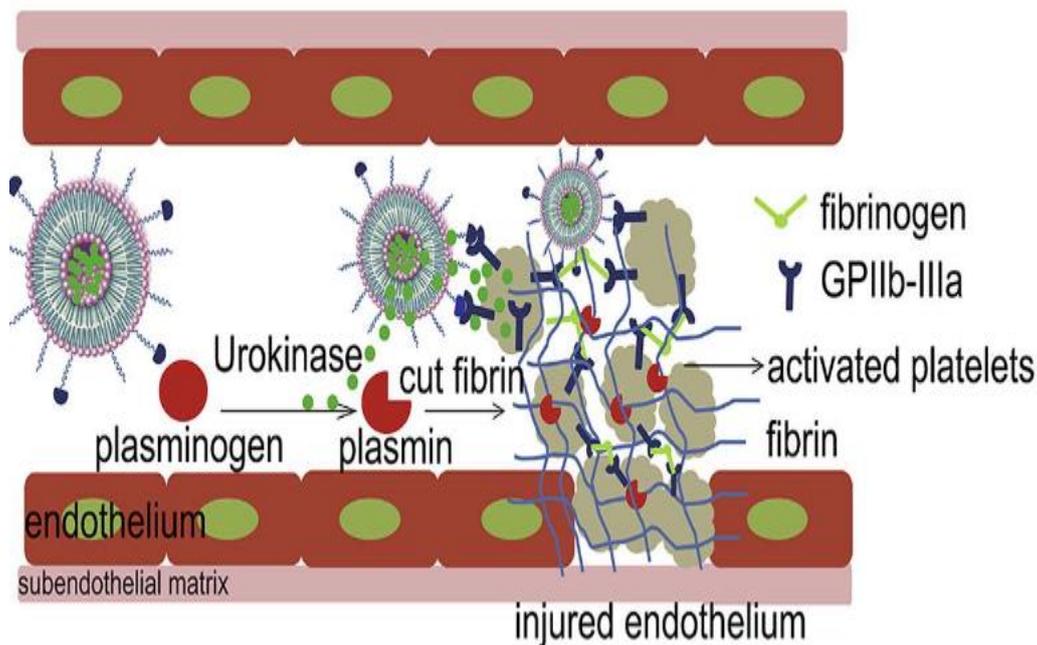
Con esta estrategia, se puede acumular el t-PA atrapado dentro del liposoma de forma específica sobre el coágulo que obstruye el paso de la sangre, por el anclaje selectivo explicado anteriormente; pudiendo reducir su efecto sistémico sobre los distintos factores de coagulación circulantes, siendo mayor la cantidad de t-PA que llega al trombo objetivo para su posterior lisis. Así se reduce el riesgo de hemorragias que sí implica la administración de t-PA libre y se mejora la actividad farmacológica.

### **3.3.5. Liposomas pegilados de uroquinasa funcionalizados con el péptido cRGD (Zhang et al., 2018)**

El péptido cRGD puede servir para funcionalizar liposomas pegilados cargados con UK. Se sabe que la activación plaquetaria conlleva la formación del complejo GPIIb/IIIa que puede ser detectado, con una elevada afinidad, por el péptido cRGD. En esta propuesta, el péptido quedaría unido covalentemente a la superficie del liposoma a través del PEG, favoreciendo así la unión de los liposomas a las plaquetas activadas y no a aquellas que están en reposo. Se ha demostrado que en su forma cíclica el péptido tiene mayor potencial que en forma lineal.

Los liposomas pegilados conjugados con el péptido cRGD y UK encapsulada van a ser conducidos específicamente hacia el coágulo, básicamente porque se van a unir a las plaquetas activadas y estas forman el coágulo. La demostración de este suceso se puso de manifiesto gracias al uso de la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo.

El mecanismo de interacción del NS propuesto se puede apreciar en la Figura 13 de forma más detallada. Una vez que el NS se encuentra con el coágulo va a interaccionar con las plaquetas activadas.



**Figura 13.** Representación de la actividad fibrinolítica del liposoma pegilado de UK funcionalizado con péptidos *cRGD* (Zhang et al., 2018).

Las propiedades del liposoma fueron estudiadas de la siguiente forma:

- *In vitro*, sobre coágulos sanguíneos se pudo apreciar: i) un perfil de liberación estable de la UK, pero incompleto, ii) selectividad por las plaquetas activadas, iii) potencial como fibrinolítico (reducción del tamaño del coágulo) pero se liberó solo la mitad de la UK cargada, y iv) se evitó la degradación de la UK por otras enzimas plasmáticas.
- *In vivo*, en un modelo de ratón con trombosis mesentérica (inducida por cloruro de hierro) se pudo observar que: i) se podía conseguir actividad fibrinolítica dirigida, derivando de ello menos efectos secundarios (menor tiempo de hemorragia en ensayos de sangrado de cola, comparado con la UK libre empleando la misma dosis), y ii) sería posible una reducción de las dosis para lograr una actividad trombolítica mejorada.

De ambas observaciones se deduce que la formulación desarrollada por Zhang et al. (2018) podría ser una terapia prometedora para ser aplicada en clínica con objeto de mejorar la eficacia de lisis de los coágulos con menos efectos secundarios, en contraposición con la UK libre. Sin embargo, la capacidad de carga de estos liposomas para la enzima UK no era significativamente alta; esto implicaría que antes de su aplicación en clínica habría que optimizar en mayor medida la encapsulación.

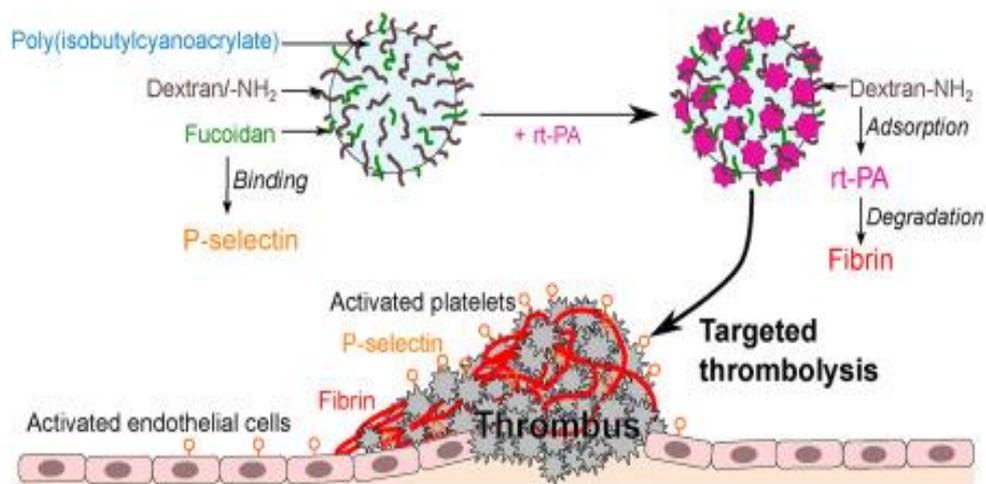
### 3.3.6. Nanopartículas de rt-PA funcionalizadas con fucoïdan (Juenet et al., 2018)

El fucoïdan se trata de un polisacárido muy sulfatado de origen natural (procedente de algas marinas), denominado así por su alto contenido en L-fucosa (monosacárido), que no presenta riesgo de carácter inmunogénico.

Las plaquetas activadas formadoras de coágulos sanguíneos expresan una glicoproteína transmembrana denominada P-selectina. Por otro lado, las células endoteliales vasculares se activan en los tejidos isquémicos sobreexpresando también la P-selectina. Por ambos motivos se deduce que la P-selectina sería una buena diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades trombo-oclusivas.

El fucoïdan tiene gran afinidad por la P-selectina porque su estructura molecular imita la del ligando principal de esta selectina, dicho ligando recibe el nombre de PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand 1).

En la figura 14 se refleja la composición de las NPs poliméricas propuestas para ser dirigidas selectivamente al trombo.



**Figura 14.** Obtención de NPs de rt-PA funcionalizadas con fucoïdan; y representación de su interacción con la P-selectina de las plaquetas activadas (Juenet et al., 2018).

Se pueden diferenciar tres etapas en la interacción con el trombo de esta nueva estrategia: 1. Acumulación selectiva de las NPs en el trombo e interacción con la P-selectina a través del fucoïdan. 2. Difusión del rt-PA al interior de la red de fibrina formando un complejo con el plasminógeno unido a fibrina. 3. Fibrinólisis provocada por la plasmina.

Las NPs poliméricas, sobre todo aquellas basadas en polisacáridos permiten integrar el fucoïdan junto con moléculas de rt-PA. En esta investigación, se diseñaron NPs basadas en

polisacáridos (dextranos y dextranos aminados) que fueron oxidados (mediante iones Cerio IV) quedando un radical libre para comenzar la polimerización por emulsión con monómeros de isobutilcianoacrilato dando lugar a copolímeros en bloque lineales y de carácter anfipático, todo ello en presencia de fucoïdan. En medio acuoso las NPs se ensamblan como nanocápsulas (estructura de núcleo y envoltura). El último paso es la conjugación de rt-PA por interacciones electrostáticas con los grupos aminados.

El estudio de Juenet et al. (2018) pretendía comprobar la eficacia del NS diseñado conteniendo rt-PA en forma de Actilyse®. El medicamento Actilyse® contiene rt-PA (también llamado alteplasa); en su formulación se emplea el aminoácido L-arginina (que tiene varios grupos aminos en su estructura molecular) para estabilizar el fármaco. Esa es la razón por la cual se añadió dextrano aminado en el momento de diseñar las NPs, buscando la estabilización del trombolítico. El hecho de incorporar dextrano aminado con carga positiva en la preparación de las NPs tenía como objeto proporcionar interacciones electrostáticas que imitasen los lugares de unión de la fibrina. Por esto mismo en la preparación farmacéutica del rt-PA se emplea la L-arginina para aumentar su estabilidad.

Juenet et al. (2018) consideraron que sería interesante investigar el uso de otro aminoácido a la hora de cargar el agente trombolítico; por ejemplo, la lisina ya que se puede unir a ciertos dominios del rt-PA que son los dominios kringle.

El potencial terapéutico de estas NPs fue evidenciado de la siguiente forma:

- *In vitro*, se evaluó bajo flujo: i) la liberación gradual del fármaco rt-PA del NS (por citometría de flujo), ii) la capacidad de interacción con P-selectina recombinante (visualizado por microscopía de fluorescencia) y con plaquetas activadas, iii) el potencial fibrinolítico (ensayo de lisis de fibrina).
- *In vivo*, empleando ratones con trombosis venosa mesentérica (inducida por cloruro de hierro), se observó: la liberación adecuada del fármaco del NS, demostrando su eficacia como fibrinolítico (observación de la densidad plaquetaria por microscopía intravital).

Por lo tanto, con los estudios preclínicos realizados parece prometedora la eficacia de estas NPs para el tratamiento de una trombosis aguda, los investigadores incluso argumentan que podría tratarse de una estrategia prometedora para ser aplicada en otras patologías donde existe una sobreexpresión de la P-selectina como ocurre en la trombosis.

Esa selectividad del polisacárido fucoidan por la P-selectina permite la acumulación de los NS sobre el trombo, sin necesidad de administrar dosis elevadas, de modo que podrían disminuirse los posibles efectos secundarios provocados por la administración de rt-PA libre.

No obstante, los autores aclaran que para los estudios *in vivo* planteados se ha recurrido a un modelo de ratón que se encuentra lejos de la variabilidad o complejidad de los trombos que puedan llegar a desarrollar los seres humanos, pero sin lugar a duda no deja de ser una nueva perspectiva terapéutica relevante que habrá que seguir investigando su comportamiento *in vivo* para alcanzar su introducción en clínica. Además, por el momento se desconoce cuál debería ser el tamaño más adecuado de las NPs.

### **3.3.7. Nanopartículas derivadas de eritrocitos conjugadas con t-PA (Vankayala et al., 2018)**

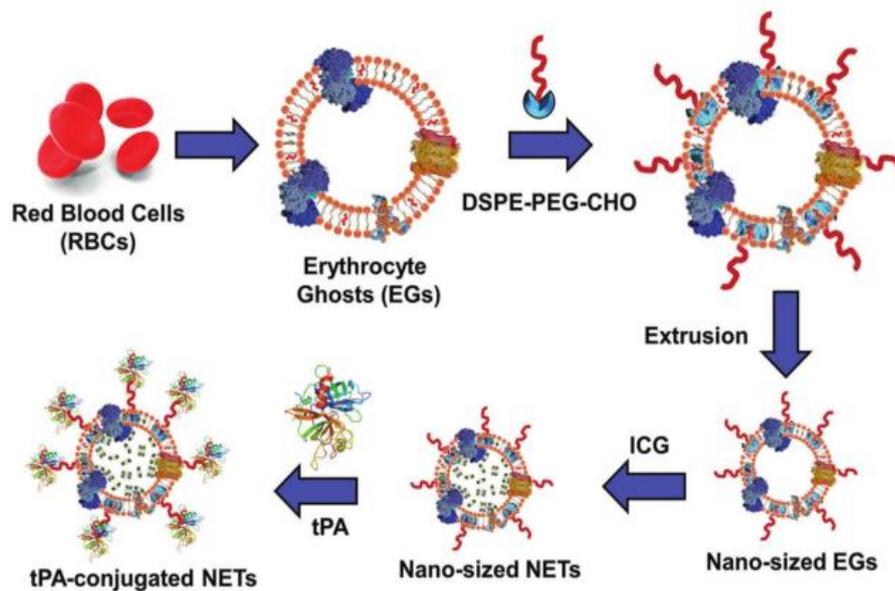
Los eritrocitos, como material biológico con fin terapéutico, presentan una ventaja respecto a otros sistemas de vehiculización de fármacos, se trata del tiempo que son capaces de circular por el torrente sanguíneo, el cual es bastante largo (permanecen en sangre entre 90 y 120 días), de este modo los NS elaborados a partir de eritrocitos podrían aumentar la permanencia de un fármaco fibrinolítico en el torrente circulatorio.

A partir de eritrocitos se han elaborado unos sistemas de eritrocitos fantasmas (incolores) de tamaño nanométrico que podían suministrarse con agentes de imagen, estos sistemas se llamaron transductores derivados de eritrocitos NIR (NETs).

El término NIR hace referencia al infrarrojo cercano, es decir, estos nuevos sistemas eran capaces de proporcionar imágenes al ser excitados mediante una luz cuya longitud de onda correspondiese al infrarrojo cercano (NIR). Para que pudiesen proporcionar las imágenes había que encapsular los NETs con el colorante verde de indocianina (ICG) que actuaría como el agente de imagen, está aprobado por la FDA.

A parte del fármaco y el colorante ICG, hay un tercer elemento que interviene como molécula enlazadora del fármaco y se llama DSPE-PEG-CHO (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol-aldehído).

En el proceso de diseño de esta novedosa estrategia se obtienen unos eritrocitos fantasmas con moléculas enlazadoras de DSPE-PEG-CHO; tras la obtención del tamaño nanométrico y la inclusión del colorante ICG se podrán conjugar con las moléculas de t-PA gracias al DSPE-PEG-CHO (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema de elaboración de NETs conjugados con t-PA y el agente de imagen ICG atrapado (Vankayala et al., 2018).

Los NETs poseen actividad fibrinolítica al estar conjugados con moléculas de t-PA (de forma covalente a través del DSPE-PEG-CHO) y permanecen más tiempo circulando por la sangre (sin que se produzca hemólisis de los eritrocitos portadores) comparado con el t-PA de forma libre. Así al administrar los NETs se emplearía una dosis más baja y disminuirían los efectos tóxicos (riesgo de hemorragias y toxicidad neuronal) asociados al t-PA libre.

No es imprescindible que las moléculas de t-PA tengan que separarse de los NETs para que posean la facultad de inducir la fibrinólisis. Sería éste un buen sistema para disolver coágulos ya que cumple las características de ser biocompatible, eficaz y seguro; por otro lado, a través de la obtención de imágenes gracias al ICG, es posible la visualización de la actividad farmacológica.

En conclusión, los resultados ofrecidos por el estudio de Vankayala et al. (2018) han justificado que estas nuevas NPs presentan una actividad fibrinolítica efectiva en modelos de sangre coagulada *in vitro*. En los estudios era importante, antes de emplear animales, optimizar tanto la concentración de colorante ICG como la concentración de t-PA con el objetivo de poder tratar la enfermedad trombolítica de la manera más eficaz posible. Los autores plantean investigar, en estudios posteriores, la efectividad *in vivo* empleando modelos de ratón.

#### 4. CONCLUSIONES

1. Numerosos investigadores plantean la optimización de nanosistemas transportadores y su direccionamiento al coágulo como unas interesantes alternativas terapéuticas para la administración de trombolíticos como el t-PA, el rt-PA, la uroquinasa y la estreptoquinasa.

2. Existen fundamentalmente dos estrategias para direccionar los sistemas mencionados en el punto anterior hacia el coágulo:

a) La funcionalización superficial de los nanosistemas con distintas moléculas con afinidad hacia el trombo (*targeting* activo).

b) La desagregación de microaglomerados de nanopartículas por el alto estrés de cizalla característico de los vasos sanguíneos estenóticos, seguido del depósito de los nanosistemas y liberación del fármaco en la región de bajo esfuerzo de cizalla donde está el coágulo (*targeting* pasivo).

3. El uso de nanotransportadores dirigidos de trombolíticos, en contraposición con la administración de los fármacos como moléculas libres, ha mostrado un incremento de la actividad trombolítica y una reducción tanto de dosis como de efectos indeseables (hemorragias principalmente) en los estudios en animales de experimentación.

4. La consecución de una trombólisis dirigida podría posibilitar la aplicación clínica de un tratamiento del tromboembolismo pulmonar más eficaz y seguro.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Absar S, Nahar K, Kwon YM, Ahsan F. Thrombus-Targeted Nanocarrier Attenuates Bleeding Complications Associated with Conventional Thrombolytic Therapy. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30(6): 1663–1676.
- Alba Tomé MR, Arenas Alcaraz JF, Paniagua Merchán MC, Linares Pardo A. Tromboembolismo pulmonar discordante. *SEMERGEN*. 2012; 38(1): 49–52.
- Baloira Villar A, Ruiz Iturriaga LA. Tromboembolismo pulmonar. *Arch Bronconeumol*. 2010; 46(Supl 7): 31–37.
- Barmore W, Burns B. *Biochemistry, Clotting Factors* [en línea]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing: actualizado 27 octubre 2018. [Consultado en enero 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507850/>.
- Carrión-Martínez A, Rivera-Caravaca JM. Cuidados de Enfermería en el tromboembolismo pulmonar en urgencias extrahospitalarias. *Enfermería Clínica*. 2016; 26(3): 199–205.
- Castuera AI, Fernández J, Martínez E, Muñoz I. Tromboembolismo pulmonar. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2015; 11(88): 5245–5253.
- Cha SI, Choi KJ, Shin KM, Lim JK, Yoo SS, Lee J et al. Clinical characteristics of in-situ pulmonary artery thrombosis in Korea. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2015; 26(8): 903–907.
- Chinnaraj M, Planer W, Pozzi N. Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants. *Front. Med*. 2018; 5: 281.
- Epshtein M, Korin N. Shear targeted drug delivery to stenotic blood vessels. *Journal of Biomechanics*. 2017; 50: 217–221.
- Esteban-Jimenez Ó, Velázquez-Lupiáñez L, Martínez-Raposo MC, Cebollada-Gracia AD. Tromboembolismo pulmonar en atención primaria. *Semergen*. 2013; 39(3): 175–178.
- Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Meza-Márquez JM, Nava-López JA. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2014; 37 (Octubre-Diciembre): 382-386.
- Harris T, Meek S. When should we thrombolyse patients with pulmonary embolism? A systematic review of the literature. *Emerg Med Journal*. 2005; 22(11): 766–771.

- Juenet M, Aid-Launais R, Li B, Berger A, Aerts J, Ollivier V et al. Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin. *Biomaterials*. 2018; 156 (February): 204–216.
- 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 (August): 738–742.
- Lanio ME, Luzardo MC, Laborde R, Sánchez O, Cruz-Leal Y, Pazos F et al. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cub. Física*. 2009; 26(1): 23-30.
- Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 10(2): 81–98.
- López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013; 13(B): 2–7.
- Lualdi JC, Goldhaber SZ. Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. *Am Heart J*. 1995; 130(6): 1276–1282.
- McCarthy JR, Patel P, Botnaru I, Haghayeghi P, Weissleder R, Jaffer FA. Multimodal nanoagents for the detection of intravascular thrombi. *Bioconjugate Chem*. 2009; 20(6): 1251–1255.
- Montenegro L, Turnaturi R, Parenti C, Pasquinucci L. Idebenone: Novel Strategies to Improve Its Systemic and Local Efficacy. *Nanomaterials*. 2018; 8(2): 87.
- Moumneh T, Penalzoza A, Roy PM. Trombosis venosa profunda. *EMC - Tratado de Medicina*. 2018; 22(1): 1–6.
- Páramo JA, Alfonso A, Lecumberry R. Nuevos anticoagulantes orales en el tratamiento del tromboembolismo venoso: análisis crítico de los resultados clínicos. *Angiología*. 2015; 67(5): 409–414.
- Prilepskii AY, Fakhardo AF, Drozdov AS, Vinogradov VV, Dudanov IP, Shtil AA et al. Urokinase-Conjugated Magnetite Nanoparticles as a Promising Drug Delivery System for Targeted Thrombolysis: Synthesis and Preclinical Evaluation. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018; 10 (43): 36764-36775.

- Qaseem A, Snow V, Barry P, Hornbake ER, Rodnick JE, Tobolic T et al. Current diagnosis of venous thromboembolism in primary care: a clinical practice guideline from the American Academy of Family Physicians and the American College of Physicians. *Ann Fam Med*. 2007; 5(1): 57–62.
- Seguel EM. NUEVOS ANTICOAGULANTES ORALES EN FIBRILACIÓN AURICULAR. *REV.MED.CLIN. CONDES*. 2015; 26(2): 223–233.
- Soto-Campos JG. Manual de diagnóstico y terapéutica en Neumología [en línea]. 3ª ed. Neumosur: 2016. [Consultado en octubre 2018]. Disponible en: [https://www.neumosur.net/publicaciones\\_ebooks\\_contenidos.php?id=12](https://www.neumosur.net/publicaciones_ebooks_contenidos.php?id=12).
- Suñé-Pou M, Suñé-Negre JM. Estrategias para la vectorización de fármacos mediante nanotecnología. *El Farmacéutico Hospitales*. 2016; 208: 4–9.
- Suchon P, Ibrahim M, Morange PE. Anomalías constitucionales de la coagulación que predisponen a la trombosis venosa. *EMC - Tratado de Medicina*. 2018; 22(1): 1–8.
- Tadayon A, Jamshidi R, Esmaeili A. Delivery of tissue plasminogen activator and streptokinase magnetic nanoparticles to target vascular diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 495(1): 428–438.
- Tadayon A, Jamshidi R, Esmaeili A. Targeted thrombolysis of tissue plasminogen activator and streptokinase with extracellular biosynthesis nanoparticles using optimized *Streptococcus equi* supernatant. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 501(1–2): 300–310.
- Vankayala R, Corber SR, Mac JT, Rao MP, Shafie M, Anvari B. Erythrocyte-Derived Nanoparticles as a Theranostic Agent for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Thrombolysis of Blood Clots. *Macromol Biosci*. 2018; 18(4): 1700379.
- Zhang N, Li C, Zhou D, Ding C, Jin Y, Tian Q et al. Cyclic RGD functionalized liposomes encapsulating urokinase for thrombolysis. *Acta Biomaterialia*. 2018; 70: 227–236.