

## NANOMEDICINA: ¿NUEVO ABORDAJE TERAPEUTICO EN EL MANEJO DE LA TROMBOSIS?

M.I. Vázquez Taveró<sup>1</sup>, M.D. Cayero Otero<sup>1</sup>, E. Arellano Orden<sup>2</sup>, L. Martín-Banderas<sup>1</sup>, R. Otero Candelera<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup>Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Universidad de Sevilla.

<sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

**Palabras clave:** Nanomedicina, trombosis, “targeting”, anticoagulantes, fibrinolíticos.

**Keywords:** nanomedicine, thrombosis, targeting, anticoagulants, fibrinolytics.

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. ¿Qué es la nanomedicina?

Aunque no existe una definición oficial, podemos decir que nanotecnología es llevar la ciencia, la ingeniería y la tecnología a la escala nanométrica. Desde hace años la nanotecnología se está perfilando como un área emergente en la ciencia y en la tecnología y se está aplicando en campos muy diversos como la agricultura, transporte, electrónica, comunicación, industria alimenticia y medicina<sup>1, 2</sup>. En este último contexto, la nanomedicina se definiría como la aplicación de la nanotecnología al campo de la salud. En esta escala nanométrica, los materiales adquieren unas propiedades que difieren, a veces de manera sorprendente, de las que presentan a sus escalas macroscópicas<sup>3</sup>. El desarrollo de sistemas a esta escala está permitiendo el progreso de nuevas herramientas para el diagnóstico precoz, la regeneración de órganos o tejidos o tratamientos individualizados<sup>4, 5</sup>.

Las propiedades de estos nuevos nanosistemas pueden proporcionar grandes ventajas en el campo de la nanomedicina: (i) el pequeño tamaño de las nanopartículas puede permitirles cruzar barreras biológicas; (ii) diferentes estructuras de nanopartículas pueden aumentar la biodisponibilidad de fármacos no solubles o inestables; (iii) la superficie modificable de las nanopartículas puede permitir la capacidad de focalización o targeting deseada en la diana terapéutica para imágenes o liberación específica de fármacos.

#### 1.2. Principales áreas de aplicación.

La llegada de la nanotecnología a las ciencias de la salud da lugar a la nanomedicina que tiene como objetivo desarrollar herramientas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades cuando están en estados poco

avanzados o en el comienzo de su desarrollo. Emplean nanoestructuras capaces de interactuar a nivel molecular<sup>10</sup> ya que la mayoría de los procesos biológicos ocurren a este nivel y puede resultar muy útil para detectar y resolver diversas patologías.

Algunos de estos sistemas ya han sido aprobados por *Food and Drug Administration* (FDA) y EMEA para uso en humanos<sup>11</sup> y otros se encuentran en investigación clínica.

La nanomedicina engloba tres áreas fundamentales: diagnóstico, terapia o liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa.

1) El **diagnóstico** a escala nano ha ido evolucionando por la creciente necesidad de satisfacer la demanda de diagnósticos clínicos más sensibles y que puedan realizar una detección más precoz de la enfermedad, permitiendo una rápida actuación en cuanto a terapia se refiere.

Se define nanodiagnóstico como el uso de la nanotecnología para fines diagnóstico<sup>12</sup>. Su fundamento es la utilización de nanodispositivos y sistemas de contraste, incluyendo la manipulación y valoración de moléculas individuales y, adaptación de sistemas para que sus propiedades puedan ser utilizadas a nanoescala y así, poder llevar a cabo la interacción entre superficies y biomoléculas<sup>13</sup>.

Los nanodispositivos pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*. Éstos últimos son los que los que más requisitos de biocompatibilidad deben cumplir ya que tienen contacto directo con el organismo para identificar y cuantificar, por ejemplo, una población de células malignas causantes de la enfermedad<sup>14</sup>.

La mayoría de los diagnósticos *in vivo* se basan en técnicas de imagen pero también incluyen dispositivos implantables. Dentro de las técnicas de imagen podemos citar tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (MRI), la tomografía por emisión de positrones, la fluorescencia y la imagen fotoacústica<sup>4</sup>.

Recibido: 16.11.2020. Aceptado: 19.01.2021

Dra. Remedios Otero Candelera  
[rotero@separ.es](mailto:rotero@separ.es)

Estos nanodispositivos celularmente específicos mejoran el rendimiento de pruebas ya existentes, como el PET, la resonancia magnética o el TAC, cada vez más importantes a la hora de la detección precoz de neoplasias o enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas; ya que al ser más específicas necesitan menos concentración de agentes de contraste, reduciendo los efectos secundarios.

Uno de los objetivos del diagnóstico *in vivo* es crear agentes que también puedan administrar y monitorear la terapia. A partir de esta idea surge el concepto "find, fight and follow" ("encontrar, luchar y seguir") que implica el diagnóstico precoz, la terapia y el control de la terapia, todo ello se engloba en el término *teragnóstico*<sup>15</sup>.

2) La **liberación** controlada de fármacos o nanoterapia es uno de los grandes retos de la medicina y, en concreto de la nanomedicina actual. Dicha disciplina propone un concepto llamando "direccionamiento de activos" o "*drug targeting*" en el cual se pone de manifiesto la capacidad de los nanosistemas para el control espacio-temporal de la liberación del fármaco, permitiendo su acumulación en el lugar de acción de manera selectiva y cuantitativa, independientemente de la vía de administración<sup>16</sup>. El direccionamiento puede producirse de manera pasiva cuando la nanoestructura recibe un determinado estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético)<sup>17</sup> o de manera activa, funcionalizando su superficie con moléculas o ligandos específicos (proteínas, anticuerpos, péptidos, etc.) capaces de unirse a un receptor concreto.

Existen distintos tipos de nanosistemas de liberación de fármacos, clasificándose de forma general en dos grandes grupos<sup>18</sup>:

- *Nanoestructuras orgánicas*. Bajo esta clasificación se encuentran aquéllas construidas con materiales poliméricos como nanoesferas, nanocápsulas, liposomas, micelas, dendrímeros y conjugados polímero-cápsula
- *Nanoestructuras inorgánicas*. En este grupo se encuentran las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílica mesoporosa y nanotubos de carbono.

Todas las nanoestructuras deben cumplir de forma ideal las siguientes características: baja toxicidad, correctas propiedades de transporte y liberación del fármaco y vida media prolongada.

Así mismo, cumplen unos objetivos comunes: (I) ser capaces de transportar fármacos de manera específica y controlada, (II) evitar problemas relacionados con la solubilidad y (III) proporcionar alternativas a las vías de administración.

Con los avances en la nanomedicina se ha podido

hacer frente a problemas presentes en los fármacos tradicionales como baja solubilidad o baja concentración en los tejidos diana, disminuyendo el efecto terapéutico. Los nanofármacos como liposomas y las micelas pueden crear ambientes tanto hidrófilos como hidrófobos aumentando la solubilidad del fármaco. Además, los nuevos sistemas de liberación incrementan la liberación del fármaco en el tejido diana. De esta manera se solventarían los problemas mencionados anteriormente<sup>19, 20, 21</sup>.

El concepto anteriormente mencionado de "direccionamiento pasivo" de fármacos surgió a finales de la década de los años 70 con el uso de liposomas termosensibles para la liberación del fármaco por hipertermia. Desde entonces, se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones sobre materiales sensibles a estímulos, en especial sobre las características de su diseño y aplicaciones. Los materiales pueden ser sensibles a estímulos exógenos como temperatura, ultrasonido, luz, campo magnético, electricidad o endógenos como pueden ser pH, potencial redox, enzimas<sup>17</sup>.

3) La última área que engloba la nanomedicina es la **medicina regenerativa**. Es objetivo es buscar el mantenimiento, mejorar o la restauración de funciones biológicas a nivel de células, tejidos y órganos aplicando técnicas relacionadas con terapia celular, ingeniería tisular, administración de sustancias biorregenerativas y terapia génica; todas ellas estimulan los propios mecanismos reparados del organismo<sup>15</sup>.

### 1.3. ¿Realidad o ficción?

Por todos es sabido que la producción científica y el número de patentes en nanomedicina están creciendo de forma exponencial en los últimos años. Según la base de datos *Scopus* en el periodo 2015-2019 se han registrado un total de 11.638 artículos científicos y 2.943 patentes, siendo China y Estados Unidos los países que lideran la investigación en esta área, ocupando España el noveno puesto.

Según este estudio, existen 350 productos basados en nanomedicina aprobados por la FDA. El estudio indica que de estos productos comercializados la mayoría de ellos se basan en liposomas (33%) y analizando su aplicación el 35% se destinan a tratamiento del cáncer, seguido de al tratamiento del dolor e inflamación (18%) siendo la intravenosa la vía de administración más empleada, un 59%, la oral ocupa el segundo puesto con un 21%. Solo durante el año 2016 la FDA aprobó 51 productos<sup>23</sup>.

Por tanto y sin duda alguna, la nanomedicina es una realidad y el avance en el conocimiento tanto en el diseño, la caracterización y la interacción dará lugar a sistemas más sofisticados y efectivos.

Especialmente hay que resaltar el avance de la nanomedicina en algunas enfermedades como cardiovasculares, cáncer, diabetes o neurodegenerativas. Por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, los objetivos actuales se centran en restaurar el flujo sanguíneo normal al corazón, así como la prevención de lesiones cardiovasculares recurrentes<sup>24</sup>.

La terapia antitrombótica es la primera línea de tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, pero también aumentan significativamente el riesgo de hemorragia. Por ello sigue siendo un gran desafío equilibrar efectivamente los riesgos de isquemia frente a los de sangrado<sup>25</sup>, desarrollando situaciones como estas que requieren la necesidad de establecer nuevas terapias que puedan direccionar la liberación de fármacos, minimizando los efectos secundarios. A modo de ejemplo, podemos citar los trabajos de Takahama y cols<sup>26</sup> describiendo el desarrollo de liposomas para el tratamiento de la angina de pecho. En ellos se describe la encapsulación de amiodarona, un fármaco antiarrítmico, en liposomas convencionales para tratar modelos animales de ratas sometidas a un procedimiento de isquemia/reperfusión cardíaca. Los resultados mostraron una tasa de mortalidad reducida en el grupo tratado con esta nueva formulación que no mostró los efectos secundarios comunes de amiodarona<sup>26</sup>.

## 2. NANOMEDICINA Y TROMBOSIS: POSIBLES ESTRATEGIAS

Según la ETPN (Plataforma Tecnología Europea de Nanomedicina), y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, enfermedades no transmisibles como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la obstrucción crónica pulmonar suponen el 80 % de muertes en Europa, siendo actualmente las enfermedades del sistema circulatorio (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, etc.) las causas más importantes de muerte prematura (antes de los 65 años) en la UE, representando casi un 50 % del total.

Tras un minucioso y extenso estudio llevado a cabo por la ETPN, el grupo de enfermedades cardiovasculares fue identificado como grupo de enfermedades con necesidades no cubiertas donde la nanomedicina podría aportar soluciones reales tanto en términos de diagnóstico como de tratamiento, incluso terapéutico.

La interrupción del flujo sanguíneo hacia el corazón, pulmón o cerebro es una de las principales causas de muerte y discapacidad en adultos en occidente. La terapia actual para el tratamiento del embolismo pulmonar hemodinámicamente inestable, el infarto de miocardio o la isquemia consiste en la infusión de fármacos trombolíticos, generalmente en unidades de cuidados

intensivos. La embola pulmonar (EP) se origina por el enclavamiento en las arterias pulmonares de un trombo desprendido desde alguna localización del sistema venoso profundo, generalmente de miembros inferiores.

Se estima una incidencia aproximada de EP de un caso por cada 1.000 habitantes al año, aunque es probable que la incidencia real sea mayor. Según datos del Ministerio de Sanidad, en España durante el año 2010 se diagnosticaron 22.250 casos de EP, con una mortalidad durante el ingreso del 8,9%<sup>27</sup>. El factor de riesgo más determinante es la hipotensión o shock en el momento del diagnóstico. Son las llamadas EP de alto riesgo que se tratan generalmente con fibrinolíticos. La estratificación de riesgo de los pacientes normotensos permite distinguir dos subgrupos, los de riesgo bajo y los de intermedio. Estos últimos con un planteamiento de tratamiento más agresivo, monitorización estrecha o incluso fibrinólisis<sup>28</sup>. En este sentido y en este subgrupo, el tratamiento fibrinolítico parece reducir el número de pacientes que se deterioran hemodinámicamente ( $p = 0,002$ ) aunque con un mayor coste de hemorragias (11,5% de sangrados mayores vs 2,4% en el grupo control y un 2% de hemorragias cerebrales vs 0,2% entre los pacientes en relación a los controles) que no fueron tratados con fibrinólisis.

La ventaja sobre el deterioro hemodinámico y muerte por todas las causas es más relevante en los pacientes menores de 75 años, con un perfil de seguridad mejor, traducido en menor porcentaje de hemorragias cerebrales<sup>29</sup>. El balance de eficacia y seguridad de los fibrinolíticos preocupa, sobre todo en los pacientes mayores a 75 años, para poder ser recomendados en el grupo de riesgo intermedio y ha fundamentado la investigación de otras modalidades de tratamiento. Algunos autores han pensado que una reducción de la dosis de los fibrinolíticos, que se aplicarían localmente mediante catéter, junto a fragmentación mecánica utilizando ultrasonidos no restaría eficacia y minimizaría las complicaciones hemorrágicas. Cincuenta y nueve pacientes de riesgo intermedio de hospitales suizos y alemanes fueron randomizados en dos grupos para ensayar esta nueva modalidad de tratamiento frente al uso de heparina no fraccionada intravenosa, demostrando superioridad en reversibilidad de afectación cardíaca y sin incremento de complicaciones hemorrágicas<sup>29</sup>.

Otro trabajo en el que se incluyeron a 119 pacientes con EP de riesgo intermedio demostró mejoría hemodinámica y disminución de la carga trombotica sin complicaciones hemorrágicas mayores<sup>30</sup>. Además de no haber sido valorados efectos más rotundos clínicamente como la mortalidad, recurrencias o deterioro hemodinámico, esta modalidad de tratamiento requiere

de cierta habilidad y aprendizaje, lo que la convierte en inaccesible para pacientes que no puedan acceder a centros más especializados. Por ello, la respuesta a la pregunta clínica de cuál es el mejor tratamiento para los pacientes con EP de riesgo intermedio permanece en el aire. La nanomedicina es un campo de interés en el tratamiento tanto de la trombosis coronaria como en el tromboembolismo venoso<sup>31-33</sup>.

Para el tratamiento de episodios tromboticos, una de las opciones es la administración de activadores de plasminógeno vía intravenosa, concretamente el activador del plasminógeno tisular recombinante (rtPA). Sin embargo, esta estrategia presenta limitaciones, como la destrucción por parte de la propia molécula (autólisis) y el efecto de inhibidores (como el PAI-1), enzimas y anticuerpos de la sangre sobre la misma, lo que da lugar a una vida media corta (4 - 8 min) reduciendo su ventana de actuación<sup>36</sup>. Además, el activo puede tener acción farmacológica fuera de la diana, lo que se traduce en episodios hemorrágicos indeseables<sup>37</sup>. En este sentido, la nanomedicina puede jugar un papel determinante para contrarrestar los inconvenientes del tratamiento con los activadores de plasminógeno, que ofrecen la posibilidad de dirigir el nanosistema directamente al trombo (*targeting*), ejerciendo su acción de manera específica en la diana trombotica.

En el presente trabajo nos centramos en realizar una revisión sobre los avances más recientes en cuanto a tratamiento de la trombosis<sup>38</sup>, revisando aquellos nanosistemas que han demostrado una clara mejora en la terapia trombolítica.

Para la vehiculización de fármacos trombolíticos pueden emplearse diferentes tipos de materiales como polímeros, lípidos o metales que deben ofrecer nula o baja toxicidad, que sean biodegradables y/o biocompatibles y que tengan gran versatilidad para su "biofuncionalización". Esta funcionalización es importante para direccionar el nanosistema a una diana concreta, en este caso el trombo, evitando su eliminación y reconocimiento por opsoninas. Una de las estrategias más comunes en este sentido para eludirlo y aumentar el tiempo de circulación (circunstancias especialmente relevantes en el caso que nos ocupa) es el revestimiento con polietilenglicol (PEG) que, además brinda la posibilidad de ser modificado superficialmente<sup>39</sup>.

Ya en 2008, un estudio publicado usando t-PA encapsulado en nanopartículas de PLGA funcionalizadas con quitosano y el tripéptido ácido arginilglicaspártico (Arg-Gly-Asp o RGD, tripéptido reconocido por numerosas proteínas del plasma como fibronectina y colágeno) estudiaba la capacidad trombolítica de los nanosistemas elaborados comparándose con el t-PA libre. Para ello,

emplearon un modelo *in vitro* de tubo ocluido por un coágulo. Las nanopartículas recubiertas únicamente con quitosano fueron las que mostraron el menor tiempo de lisis del coágulo mientras que las recubiertas además con el péptido mostraban una mayor capacidad de digestión del coágulo con respecto al t-PA libre, atribuyendo esta capacidad no solo a la capacidad de interacción de las partículas con el coágulo sino también a la protección del activo encapsulado frente a inhibidores presentes en plasma<sup>40</sup>.

En 2017, investigadores de la Universidad de Case (Cleveland) publicaron un trabajo en el que desarrollaron nanosistemas lipídicos basados en micropartículas de plaquetas que se anclan al trombo a través de un mecanismo de unión mediada por ligando (específicamente a integrina GPIIb-IIIa y selectina P) y liberan el activo gracias a la actividad enzimática de fosfolipasas. Para ello, formularon nanopartículas lipídicas pegiladas cargadas con estreptoquinasa y funcionalizadas con dos péptidos específicos de integrina y selectina P. Los autores en estudios *in vitro* observaron que, en presencia de una fosfolipasa para la degradación lipídica de los nanosistemas y a través de la creación de trombos ricos en plaquetas (visibles en microscopio gracias al marcaje del fibrinógeno con un fluoróforo), aquellos sistemas no dirigidos no conseguían unirse al trombo, mientras que los dirigidos con los dos péptidos al trombo lograban unirse al mismo, liberar el activo y, por lo tanto, lograr su reducción.

Estudios *in vitro* se afianzaron con estudios *in vivo* a través de un modelo de trombosis en la arteria carótida inducida por cloruro férrico. Para ello, partículas lipídicas marcadas con rodamina B (modificadas y no modificadas) se inyectaron por vía intravenosa, observándose que las partículas modificadas se unían y acumulaban de manera efectiva en el trombo comparadas con las no modificadas. Los hallazgos fueron confirmados con las imágenes de fluorescencia de la arteria trombosada tras su extracción<sup>41</sup>.

Por otro lado, en un estudio muy reciente publicado en abril de 2020, investigadores taiwaneses desarrollaron nanopartículas magnéticas de PLGA cargadas con rtPA y funcionalizadas con un péptido con afinidad por la fibrina (secuencia Gly-Pro-Arg-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Gly-Cys).

En los ensayos *in vitro*, los investigadores observaron que en un modelo de coágulo preformado tanto el rtPA libre como encapsulado en las partículas magnéticas tenía capacidad para disolver el coágulo comparado con PBS o partículas sin fármaco, pero se diferenció el efecto magnético de las partículas con respecto al rtPA libre, exhibiendo éstas un efecto más rápido y pronunciado cuando se ejercía la fuerza magnética con un imán. Estos

resultados se vieron apoyados por el ensayo de lisis en placas de agar, evaluando el halo de fibrinólisis formado en gel de agar de fibrina producido tras el contacto del gel con los nanosistemas cargados o el fármaco libre.

Para la confirmación de los resultados *in vitro* se estudió la capacidad trombolítica dirigida inducida por magnetismo de los sistemas elaborados en un modelo embólico de rata. La inyección de las partículas modificada con el péptido dio como resultado el aumento del flujo sanguíneo tras el coágulo después de 35 minutos comparado con el grupo de rtPA libre en el que no se observó mejora en la circulación hasta pasados los 60 minutos. En el grupo de animales tratados con partículas sin fármaco no se observaron mejoras en el flujo sanguíneo, lo que significa que el trombo se mantenía similar al existente inicialmente<sup>42</sup>. En trabajos anteriores, estos investigadores también desarrollaron liposomas magnéticos sensibles a la temperatura cargados con tPA como terapia contra la trombosis<sup>43,44</sup>.

En otro estudio publicado en *Biomaterials* (2018)<sup>45</sup>, los autores desarrollaron partículas de tamaño nanométrico de un polisacárido cargadas con rtPA y funcionalizadas superficialmente con fucoidan un producto proveniente de algas marinas con gran afinidad por la selectina-P, expresadas en las plaquetas activadas del trombo. La actividad fibrinolítica del activo encapsulado (estudiada midiendo el halo de lisis de la fibrina en placas de agar) fue similar para los dos tipos de nanopartículas (modificadas y sin modificar con fucoidan). Sin embargo, en el estudio de afinidad por los agregados de plaquetas presentes en el coágulo, aquellas partículas modificadas con fucoidan mostraron una acumulación significativa con respecto a las no modificadas. Por último, se estudió el efecto trombolítico observándose que la mayor disminución de densidad del trombo se producía en aquellos ratones tratados con las partículas funcionalizadas con fucoidan después de 30 minutos a una dosis similar a la administrada en los ratones tratados con rtPA libre, provocando una reducción del trombo en torno al 70% en la mitad de los ratones del grupo<sup>45</sup>. Uno de los péptidos usados para dirigir los nanosistemas hacia el trombo es el CREKA, un péptido de cinco aminoácidos con la secuencia (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala), que suele emplearse como ligando específico para tumores ya que se dirige selectivamente a vasos sanguíneos tumorales<sup>46</sup>. Este péptido además reconoce los complejos de fibrina-fibronectina, y puede usarse para un "targeting" activo hacia el coágulo.

*Wen y cols.*, desarrollaron dos tipos de nanosistemas basadas en virus vegetales, uno de formas icosaédrica y otro alargado, cargados con agentes de contraste para resonancia magnética y se funcionalizaron con dos péptidos específicos, GPRPP (Gly-Pro-Arg-Pro-Pro)

y CREKA, para estudiar la influencia de la forma y la especificidad de ambos ligandos<sup>47</sup>.

Se realizaron estudios *in vitro* empleando coágulos de fibrina preformados en placas y ensayos *in vivo* en modelo de rata, en los que, tras la inducción del trombo, los nanosistemas se inyectaron en la vena de la cola, monitorizando el flujo sanguíneo. Tras la oclusión del vaso, la arteria obstruida fue extraída, analizándose la cantidad de partículas acumuladas. Los estudios *in vivo* demostraron que la forma de las partículas era determinante para su acumulación en el coágulo sin diferencias significativas entre las funcionalizadas con los dos ligandos diferentes. Los nanosistemas con forma alargada (funcionalizados o no) exhibieron una mayor acumulación en el trombo que aquellos de forma icosaédrica. Sin embargo, los estudios *in vitro* mostraron la especificidad de los péptidos a la hora de unirse a la fibrina.

La mayor tasa de unión la mostraron aquellas partículas funcionalizadas con el péptido GPRPP (9,5 veces más que sus homólogas no funcionalizadas) comparadas con las conjugadas con CREKA (5,5 veces más que las no funcionalizadas).

Un artículo publicado en 2017 también muestra la funcionalidad de un nanosistema con "estructura de jaula" en la que se unió un péptido (CLT) que reconoce los complejos de fibrina-fibronectina pero no la fibrina sola y microplasma que disuelve los coágulos<sup>48</sup>.

En cuanto a los ensayos *in vitro*, se estudió la capacidad de unión al coágulo y su disolución y en los estudios *in vivo* se estudió la actuación de los sistemas en modelos de trombosis arterial y venosa con la inducción previa de un trombo.

Los estudios *in vitro* de afinidad por el coágulo mostraron una mayor capacidad de la nanojaula de los complejos de ferritina-microplasma funcionalizadas con el péptido CNAGESKNC (CLT) frente al complejo fibrina-fibronectina, aunque no se observaron diferencias en cuanto a la capacidad de disolución del trombo.

Con respecto a los ensayos *in vivo* en un modelo de trombosis arterial, tras la formación del coágulo y la administración intravenosa de cada formulación a testar, las estructuras de nanojaulas funcionalizadas mostraron espacios en la luz de la arteria extraída, lo que significa la restauración del flujo sanguíneo mientras que el resto de formulaciones no consiguieron la disolución del trombo.

El efecto de las formulaciones también se evaluó en un modelo de trombosis venosa profunda, un tipo de coágulo formado en venas principales de extremidades inferiores y que puede desprenderse provocando una embolia pulmonar. Los animales tratados con la formulación de nanojaula desarrollaron trombos con menor peso y

menor tamaño que el resto de las formulaciones (suero fisiológico y microplasma libre).

McCarthy y cols.<sup>49</sup> (2012) sintetizaron un sistema de teragnosis basado en nanopartículas magnéticas de dextrano fluorescente para el tratamiento y diagnóstico de EP. Para la liberación selectiva de rtPA sobre el trombo utilizaron un péptido capaz de reconocer al factor FXIIIa. La actividad enzimática se comprobó midiendo la actividad amidolítica utilizando el sustrato S-2288 y la actividad fibrinolítica *in vivo* se evaluó midiendo niveles de dímero-D. Los nanosistemas se evaluaron en un modelo animal de ratón murino de trombosis pulmonar. Los resultados mostraron una capacidad similar del rtPA libre frente al encapsulado, las partículas se acumularon en los márgenes del trombo intravascular, visualizándose mediante microscopía fluorescente intravital permitiendo al mismo tiempo su lisis y visualización.

Otra estrategia de *targeting*, antes mencionada, sería utilizar los cambios de cizallamiento en la zona afectada. Así, microagregados de nanopartículas preformados pueden escindirse en sus componentes nanométricos nativos cuando se someten a altos valores de fuerzas de cizalla como ocurre en torno al coágulo. Korin y cols.<sup>35</sup> desarrollaron una formulación de microagregados formados a partir de pequeñas nanopartículas que son sometidas a cambios de fuerza de cizalla *in vitro* empleando un microchip que simula la estenosis del vaso sanguíneo observando que, con respecto a los canales sin obstrucción, la rotura de los microagregados fue 16 veces mayor. Los ensayos *in vivo*, se realizaron en un modelo de embolia pulmonar. Inmediatamente después de provocar la embolia o 30 minutos después, se administró a los ratones la formulación de microagregados recubiertos con rtPa, observándose que el área total del coágulo disminuía en un 60% cuando se trataba de manera inmediata y un 30% cuando se administraba 30 minutos después.

Finalmente, para corroborar la importancia clínica de esta nueva estrategia, se llevaron a cabo infusiones de coágulos de fibrina de un tamaño mayor, que tienden a acumularse en los vasos sanguíneos pulmonares mayores (tal y como ocurre en humanos) y que tienen consecuencias fatales. Los resultados mostraron que todos los ratones control murieron mientras que aquellos tratados inmediatamente con la formulación tuvieron una supervivencia por encima de 80%<sup>34</sup>.

En la **tabla 1** se resume los nanosistemas desarrollados hasta la fecha incluidos en esta revisión.

**Tabla 1.** Desarrollo de nanosistemas para el tratamiento fibrinolítico en modelos de tromboembolismo arterial y venoso.

| NANOSISTEMA                        | Direccionamiento                      | Targeting                                   | Fármaco         | Modelo trombosis   | REF.  |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|-----------------|--|-------|
| NPs PLGA/chitosan                  | RGD                                   | Von Willebrand factor, fibronectin collagen | rtPA            | in vitro   | 40    |
| NPs lipídicas pegiladas            | pasivo (enzimas) péptidos específicos | integrina y selectina P                     | estreptoquinasa | mouse carotid artery thrombus  | 41    |
| NPs PLGA magnéticas                | GPRPPGGSKGC                           | fibrina                                     | rtPA            | in vitro   | 42    |
| NPs liposomas magnéticos           | Pasivo hipertermia-campo magnético    | -   | rtPA            | in vitro   | 43    |
| NPs liposomas magnéticos           | Pasivo hipertermia-campo magnético    | -   | rtPA            | rat embolic model-right iliac artery   | 44    |
| NPs dextrano                       | fucoidan                              | selectina-P                                 | rtPA            | FeCl <sub>3</sub> -induced thrombosis model on mouse                                     | 45    |
| Virus del mosaico del tabaco (TMV) | GPRPP o CREKA                         | fibrina-fibronectina                        | -               | Arterial thrombosis-carotida   | 47    |
| Nanojaula                          | peptido CNAQESSKNC (CLT)              | fibrina-fibronectina                        | Microplasma     | Arterial thrombosis model-carotida The deep vein thrombosis (DVT) model                  | 48    |
| NPs dextrano magnéticas            | Activo peptido - GNQEQVSLTLKLC-       | FXIIIa                                      | rtPA            | ferric chloride (topical 7.5% FeCl <sub>3</sub> ) injury to the femoral artery and vein. | 49    |
| Microagregados de NPs PLGA         | pasivo (cizalla)                      | cambios fuerza cizalla                      | rtPA            | mouse pulmonary embolism model   | 34,47 |

### 3. CONCLUSIONES

Actualmente, la nanomedicina ofrece herramientas terapéuticas reales para algunas patologías como ciertos tipos de cáncer. En otras, como las enfermedades cardiovasculares y tromboembólicas está aún en un estadio más temprano, pero tremendamente productivo a nivel científico. Son numerosas las estrategias que se están desarrollando para la vehiculización y direccionamiento de activos con capacidad trombolítica (rtPA, microplasma, estreptoquinasa). Entre ellos caben destacar nanopartículas compuestas de materiales biodegradables y biocompatibles funcionalizadas en su superficie con biomoléculas selectivas para el trombo como pueden ser los péptidos RGD, CREKA o polímeros bioadhesivos, como quitosano. También, utilizando los cambios fisiológicos en cuanto a cambio de flujo y fuerzas en cizalla la zona afectada, se están investigando agregados sensibles a los cambios de cizalla, de forma que este estímulo permita la liberación controlada y selectiva en la zona del trombo.

### 4. FUTURO Y PERSPECTIVA

La nanomedicina ofrece una oportunidad y un desafío en muchas enfermedades, entre ellas en el manejo de la terapia tromboembólica dirigida.

A pesar del avance en este campo, es fundamental conocer el nivel de especificidad de estos nanosistemas hacia el trombo y así poder seleccionar la estrategia de targeting más efectiva. Además, como en el escaso de otros nanomedicamentos, resulta fundamental conocer el perfil de seguridad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Neumour el apoyo que nos han brindado en la línea de investigación del desarrollo de nanosistemas para la fibrinólisis dirigida del tromboembolismo venoso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2007; 3(1): 20-31. doi:10.1016/j.nano.2006.11.008.
- Duhan JS, Kumar R, Kumar N et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*. 2017; 15(March): 11-23. doi:10.1016/j.btre.2017.03.002.
- Su S, Kang PM. Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine. *Nanomaterials*. 2020;10(4). doi:10.3390/nano10040656.
- Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*. 2017;11(3):2313-2381. doi:10.1021/acsnano.6b06040.
- Mehta D, Guvva S, Patil M. Future impact of nanotechnology on medicine and dentistry. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2008; 12(2): 34. doi:10.4103/0972-124x.44088.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75(1): 1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- Runowski M, ScM. Nanotechnology-Nanomaterials, Nanoparticles and Multifunctional Core/Shell Type Nanostructures.
- Dowling A, Clift R, Grobert N et al. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. London The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report. 2004; 46(July): 618-618. doi:10.1007/s00234-004-1255-6.
- Isaacoff BP, Brown KA. Progress in Top-Down Control of Bottom-Up Assembly. *Nano Letters*. 2017; 17(11): 6508-6510. doi:10.1021/acs.nanolett.7b04479.
- Lechuga LM. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Bioteconología Aplicada a la Salud Humana*. 2010.
- Betty N, Kim YS, Rutka JT et al. *Engineering B. (No Title)*. Vol 363.; 2010.
- Press D. Application of nanodiagnostics in point-of-care tests for infectious diseases. 2017:4789-4803.
- Baptista PV. Nanodiagnostics : leaving the research lab to enter the clinics ? *Molecular nanodiagnostics*. 2014; 1(4): 305-309. doi:10.1515/dx-2014-0055.
- Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Frontiers in Chemistry*. 2014; 2(August): 1-13. doi:10.3389/fchem.2014.00069.
- Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*. 2011; 12(7): 620-636. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.001.
- Torchilin VP. Drug targeting. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2000; 11 Suppl 2: S81-S91. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00166-4.
- Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*. 2013; 12(11): 991-1003. doi: 10.1038/nmat3776.
- Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014; 13(11): 813-827. doi:10.1038/nrd4333.
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016; 235: 34-47. doi: 10.1016/J.JCONREL.2016.05.044.
- Cetin M, Atila A, Sahin S et al. Preparation and characterization of metformin hydrochloride loaded-Eudragit®RSPO and Eudragit®RSPO/PLGA nanoparticles. *Pharmaceutical development and technology*. 2013; 18(3): 570-576. doi:10.3109/10837450.2011.604783.
- Mahajan SD, Law W-C, Aalinkeel R et al. Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Antiretrovirals to the Brain. *Methods in Enzymology*. 2012; 509: 41-60. doi:10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4.
- Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD et al. Shear-Activated Nanotherapeutics for Drug Targeting to Obstructed Blood Vessels. *Science*. 2012; 337(6.095): 738-742.
- Choi YH, Han H-K. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2018; 48: 43-60. doi:10.1007/s40005-017-0370-4.
- Calhoun MA, Duong AD, Souva MS et al. Nanoparticles for Hydrophobic Drug Delivery. 2018: 351-366.
- Onwordi ENC, Gamal A, Zaman A. Anticoagulant therapy for acute coronary syndromes. *Interventional Cardiology Review*. 2018; 13(2): 87-92. doi:10.15420/icr.2017:26:1.
- Takahama H, Shigematsu H, Asai T et al. Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/ Reperfusion Rat Model. doi:10.1007/s10557-012-6437-6.
- Uresandi F, Jiménez D. National consensus on the diagnosis, risk stratification and treatment of patients with pulmonary embolism: An update. *Archivos de Bronconeumología*. 2016; 52(2): 61-62. doi:10.1016/j.arbr.2015.12.014.
- Jiménez D, Aujesky D, Yusen RD. Risk stratification of normotensive patients with acute symptomatic pulmonary embolism. *British Journal of Haematology*. 2010; 151(5): 415-424. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08406.x
- Meyer G, Vicaut E, Danays T, et al. Fibrinolysis for Patients with Intermediate-Risk Pulmonary Embolism A BS TR AC T. N Engl J

- Med. 2014; 370: 1.402-1.413. doi:10.1056/NEJMoa1302097.
30. Piazza G, Hohlfelder B, Jaff MR et al. A Prospective, Single-Arm, Multicenter Trial of Ultrasound-Facilitated, Catheter-Directed, Low-Dose Fibrinolysis for Acute Massive and Submassive Pulmonary Embolism: The SEATTLE II Study. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2015; 8(10): 1.382-1.392. doi:10.1016/j.jcin.2015.04.020.
  31. Jin H-J, Zhang H, Sun M-L et al. Urokinase-coated chitosan nanoparticles for thrombolytic therapy: preparation and pharmacodynamics in vivo. doi:10.1007/s11239-013-0951-7.
  32. Rhee J-W, Wu JC. Advances in Nanotechnology for the Management of Coronary Artery Disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2013; 23(2): 39-45. doi:10.1016/j.tcm.2012.08.009.
  33. Sathler PC, Lourenço AL, Rodrigues CR et al. 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(2): 376-383. doi:10.1016/j.thromres.2014.05.009.
  34. Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD et al. Shear-Activated Nanotherapeutics for Drug Targeting to Obstructed Blood Vessels.
  35. Korin N, Gounis MJ, Wakhloo AK et al. Targeted drug delivery to flow-obstructed blood vessels using mechanically activated nanotherapeutics. *JAMA Neurology*. 2015; 72(1): 119-122. doi:10.1001/jamaneurol.2014.2886.
  36. Gurman P, Miranda OR, Nathan A et al. Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): A review. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2015; 97(3): 274-285. doi:10.1002/cpt.33.
  37. N M. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008; 451(7181): 914-918. doi:10.1038/nature06797.Triggers.
  38. Bonnard T, Gauberti M, Martinez de Lizarrondo S et al. Recent Advances in Nanomedicine for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Stroke*. 2019; 50(5): 1.318-1.324. doi:10.1161/STROKEAHA.118.022744.
  39. Varna M, Juenet M, Bayles R et al. Nanomedicine as a strategy to fight thrombotic diseases. *Future Science OA*. 2015;1(4). doi:10.4155/fso.15.46.
  40. Chung TW, Wang SS, Tsai WJ. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Biomaterials*. 2008; 29(2): 228-237. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.027.
  41. Pawlowski CL, Li W, Sun M et al. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis. *Biomaterials*. 2017; 128: 94-108. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.012.
  42. Chen H, Ma Y, Hsu T et al. Preparation of Peptide and Recombinant Tissue Plasminogen Activator Conjugated Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Magnetic Nanoparticles for Dual Targeted Thrombolytic Therapy.
  43. Hsu HL, Chen JP. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017; 427(June 2016): 188-194. doi:10.1016/j.jmmm.2016.10.122.
  44. Liu CH, Hsu HL, Chen JP et al. Thrombolysis induced by intravenous administration of plasminogen activator in magnetoliposomes: dual targeting by magnetic and thermal manipulation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2019; 20: 101992. doi:10.1016/j.nano.2019.03.014.
  45. Juenet M, Aid-Launais R, Li B et al. Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin. *Biomaterials*. 2018; 156: 204-216. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.11.047.
  46. Okur AC, Erkoç P, Kizilel S. Targeting cancer cells via tumor-homing peptide CREKA functional PEG nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016; 147: 191-200. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.08.005.
  47. Wen AM, Wang Y, Jiang K et al. Shaping bio-inspired nanotechnologies to target thrombosis for dual optical-magnetic resonance imaging. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2015; 3(29): 6.037-6.045. doi:10.1039/C5TB00879D.
  48. Seo J, Al-Hilal TA, Jee JG et al. A targeted ferritin-microplasma based thrombolytic nanocage selectively dissolves blood clots. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2018; 14(3): 633-642. doi:10.1016/j.nano.2017.12.022.
  49. McCarthy JR, Sazonova IY, Erdem SS et al. Multifunctional nanoagent for thrombus-targeted fibrinolytic therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2012; 7(7): 1.017-1.028. doi:10.2217/nnm.11.179.