



Universidad Nacional Andrés Bello

Facultad de Medicina

Tecnología Médica

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS LÍPIDO–POLÍMERO CARGADAS CON CILOSTAZOL, UN INHIBIDOR DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico

Autores:

**Daniela Alejandra Bahamonde Norambuena, Álvaro Rodrigo Molina
Pereira**

Profesor Guía: Cristian Vilos Ortiz

Santiago Chile, 2015

Dedicatoria

Dedicamos esta unidad de investigación a todos aquellos que nos apoyaron en este proceso, además de los docentes y alumnos que apoyan y desarrollan la investigación en esta, nuestra profesión.

Agradecimientos

Esta unidad de investigación no se podría haber realizado sin el apoyo incondicional de nuestro profesor guía, el Doctor Cristian Vilos Ortiz, nuestros docentes y por supuesto, nuestras familias, quienes nos guiaron y motivaron minuto a minuto.

Tabla de contenidos

Dedicatoria	2
Agradecimientos.....	3
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
2. Marco Teórico.....	8
3. Hipótesis.....	20
4. Objetivo General.....	20
5. Objetivos Específicos	20
6. Materiales y Métodos	21
7. Resultados.....	25
8. Discusión.....	31
9. Conclusiones.....	35
10. Referencias Bibliográficas	36
11. Anexos	40

Índice de Figuras.

Figura 1: Comparación de tamaño de nanopartículas.....	27
Figura 2: Determinación estabilidad nanopartículas.....	28
Figura 3: Tamaño promedio de nanopartículas cargadas y vacías.....	29
Figura 4: Efecto de nanopartículas sobre membrana eritrocitaria.....	30
Figura 5: Porcentaje de hemólisis en nanopartículas cargadas y vacías.....	31

Índice Anexos.

Apéndice A

Figura A1: Estructura plaquetaria e ingreso de nanopartículas.....	40
Figura A2: Método de nanoprecipitación o auto-ensamblaje.....	41
Figura A3: Ejemplificación de gráfica de tamaño promedio.....	42
Figura A4: Ejemplificación de gráfica y valores obtenidos según <i>peak</i>	43

Apéndice B

Tabla B1: Tamaño promedio de nanopartículas según días.....	44
Tabla B2: Tamaño (<i>peak</i>) de nanopartículas según días.....	44
Tabla B3: Potencial Z (mV) de nanopartículas.....	44
Tabla B4: Porcentaje de hemólisis promedio	44
Tabla B5: PDI nanopartículas.....	44

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo y su fisiopatología en gran parte está íntimamente ligada con la formación de placas de ateroma y su consecuente efecto en la activación plaquetaria. A pesar de contar con fármacos altamente efectivos que inhiben la función plaquetaria, se ha descrito que inducen numerosos efectos secundarios adversos. Avances en nanotecnología y nanomedicina, han permitido crear nanopartículas capaces de transportar y liberar exitosamente fármacos, mostrando considerables ventajas con respecto a los fármacos convencionales, tales como, mejorar sus propiedades farmacológicas, disminuir los efectos secundarios y mejorar su efectividad. En este contexto, las nanopartículas representan un excelente candidato para desarrollar nuevas formulaciones. El objetivo de este trabajo fue desarrollar nanopartículas cargadas con el fármaco antiplaquetario cilostazol, optimizar su proceso de síntesis, analizar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas como potencial agente terapéutico y protector frente a ECV.

Se utilizó el método de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas cargadas con cilostazol, un inhibidor de la actividad plaquetaria. Los tamaños promedio obtenidos para las formulaciones PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol fueron de 118,9nm y 130,1nm, con un potencial zeta promedio de -3,55mV y -3,58mV respectivamente. Se concluyó que PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol fueron estables, con un tamaño y potencial zeta sin variaciones significativas y con valores adecuados para ser utilizadas *in vivo*, por tanto, el fármaco cargado no afectó las propiedades de las nanopartículas. Los objetivos no fueron cumplidos a cabalidad, dejando esta tarea abierta a los próximos alumnos que participarán en este proyecto.

Palabras Clave: Enfermedad cardiovascular, nanopartículas, agregación plaquetaria, cilostazol.

1. Introducción

Las ECV constituyen la mayor causa de muerte en el mundo, las terapias farmacológicas existentes conllevan numerosos efectos secundarios y requieren de dosis diarias, la nanomedicina ofrece numerosas alternativas farmacológicas, en esta unidad de investigación se indagó sobre un fármaco que inhibe la activación plaquetaria, que será cargado en nanopartículas.

El objetivo de esta unidad de investigación es **sintetizar y caracterizar nanopartículas híbridas lípido-polímero cargadas con cilostazol, un inhibidor de la activación plaquetaria, como potencial tratamiento en patologías trombogénicas**. Las nanopartículas fueron desarrolladas mediante el método de nanoprecipitación, y mediante dispersión de luz dinámica se analizó el tamaño y su carga superficial (potencial Z). La eficacia de encapsulamiento y cinética de liberación *in vitro* se estudiará mediante cromatografía líquida de ultra presión (UPLC). Por otra parte, el efecto antiplaquetario se evaluará en muestras obtenidas de individuos sanos (investigadores).

El desarrollo experimental se llevó a cabo durante el segundo semestre académico que comprende los meses de agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre en el centro de investigación CIMIS, perteneciente a la Facultad de Medicina–UNAB en el grupo de investigación de *Nanomedicine and Targeted Delivery* dirigido por el Dr. Cristian Vilos.

2. Marco Teórico

Enfermedades Cardiovasculares

Las ECV son un conjunto de patologías que afectan principalmente al corazón y los vasos sanguíneos, siendo la cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas, hipertensión y aterosclerosis las patologías más frecuentes. ECV son la principal causa de muerte en el mundo, reportándose en 2012 un promedio de 17,5 millones de personas, lo cual representa al 31% de todas las muertes registradas durante ese año en el mundo.¹ De igual manera en Chile las ECV representan la primera causa de muerte, con una tasa de mortalidad que rodea el 28%. A pesar de que en los últimos años no se ha visto un incremento en la frecuencia de esta enfermedad, preocupantemente se percibe que los factores de riesgo se están presentado a una edad cada vez más temprana en la población chilena.²

La etiología de las ECV es variada, sin embargo, la hipertensión y la aterosclerosis representan las causas más frecuentes. La fisiopatología de la ECV ocasionada por aterosclerosis se presenta como una enfermedad inflamatoria de las paredes de arterias de grueso y mediano calibre, cuya aparición es impulsada por la presencia de niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) en la sangre, ya que este colesterol lleva a la formación de la placa de ateroma, que está formada por centros necróticos, regiones calcificadas, acúmulos de lípidos modificados, células de músculo liso inflamadas, células endoteliales, leucocitos y células espumosas. Típicamente se presenta una ruptura de las placas de ateroma producida por una interacción celular compleja, donde se destaca la acción de células espumosas y macrófagos.³

Los macrófagos son elementos figurados sanguíneos que se generan en la médula ósea, derivados de la línea mieloide, las células comprometidas de este linaje reciben estímulos químicos por medio de citoquinas, promoviendo la diferenciación de las células mieloides hacia monocitos, estos monocitos al actuar en tejidos se denominan macrófagos; tendrán como función la síntesis de citoquinas proinflamatorias, y la fagocitosis de patógenos. Las células espumosas pueden generarse de los macrófagos o de las células musculares lisas, su rol es introducir colesterol LDL. En el caso de los macrófagos, al ingresar colesterol LDL modificado son inducidos a transformarse en células espumosas, por su parte, el mecanismo de inducción de células musculares lisas aún no está del todo establecido, pero se observa una relación entre concentraciones de ácido oleico y la formación de células espumosas. ⁴

Los macrófagos fueron las primeras células que fueron asociadas con la aterosclerosis, identificándose como el componente principal de la placa de ateroma en especímenes porcinos. Se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias producidas por macrófagos participan en la retención lipídica y en el remodelamiento celular. Asimismo, los macrófagos expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), entre los cuales destacan los receptores *scavenger* y receptores *toil-like* que conectan la respuesta inmune innata y adaptativa durante el proceso aterosclerótico. Los PRR son utilizados por los macrófagos para fagocitar diferentes microbios y sus componentes, también se utilizan estos receptores para captar LDL modificado, generando las células espumosas a partir de macrófagos,³ el colesterol y los triglicéridos son el componente principal de la placa aterosclerótica. Los ésteres de colesterol y los ácidos grasos contienen ácidos grasos libres, se asocian con la mortalidad cardiovascular en sujetos con patologías coronarias.⁴ Células espumosas secretan mediadores proinflamatorios tales como citocinas y quimiocinas desde la matriz celular llevando indirectamente el desarrollo de la placa de ateroma a través de un aumento en el reclutamiento de leucocitos y la remodelación tisular, esto trae consigo un aumento de la respuesta inflamatoria local promoviendo el aumento

de la entrada de monocitos de sangre y desarrollo de lesiones tempranas.^{5, 6} causando un daño en la musculatura lisa al generar una exposición de la matriz extracelular durante la aterosclerosis.³ La interacción de las plaquetas con la matriz, conduce a una activación plaquetaria.⁷

Plaquetas

Las plaquetas, se forman por medio de un proceso llamado megacariopoyesis que se lleva a cabo en la médula ósea, en él ocurre la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos, dando origen a este elemento figurado que tienen un volumen promedio de 10 fL y un tamaño que fluctúa entre 2 a 3 μm .⁸ Las plaquetas presentan un rol importante en hemostasia, trombosis, cicatrización de heridas, la aterosclerosis, inflamación e inmunidad. De estas, la principal función fisiológica es formar trombos hemostáticos que evitan la pérdida de sangre y mantener la integridad vascular. Esta función debe ser estrechamente regulada, manteniendo un equilibrio entre trombogénesis y fibrinólisis, ya que la formación de trombos desregulada (trombosis) provoca la obstrucción de los vasos sanguíneos llevando a una isquemia tisular.⁹ Las plaquetas en la circulación normal se encuentran en reposo, en un estado no adherente y se activan en los sitios de lesión vascular tras la unión a proteínas adhesivas o agonistas de plaquetas solubles.¹⁰

La estructura plaquetaria consta de una membrana externa compuesta por bicapa lipídica, membrana plaquetaria, zona sub-membrana y citoplasma (Anexo A.1).

Bicapa lipídica, formada por fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, proteínas de adhesión que se unen a factores de la coagulación como IbV-IX que se une al factor von Willebrand (FvW) y IIb/IIIa que une fibrinógeno y FvW, además de adhesinas como la P-selectina.

Membrana plaquetaria compuesta por una bicapa lipídica, que contiene proteínas integrales y periféricas.

Zona sub-membrana, compuesta por microtúbulos formados por tubulina, que proporcionan el soporte estructural para mantener la forma discoide de la plaqueta, esta zona también contiene microfilamentos contráctiles de actina y miosina, importantes en la contracción plaquetaria que desencadena la secreción de gránulos específicos, compuestos de moléculas pro-hemostáticas, pro-cicatrizantes y activadoras. Contenido en esta zona sub-membrana, también se encuentra el sistema canalicular abierto, que comunica esta zona con el medio extracelular, además del sistema tubular denso que deriva del retículo endoplasmático liso este sistema tiene como función la metabolización del ácido araquidónico y el almacenamiento de calcio.

Citoplasma, se encuentra bajo la sub-membrana, contiene mitocondrias, lisosomas, gránulos de glicógeno, que aportan energía a la plaqueta y gránulos α que contienen fibrinógeno, trombospondina, factor V (FV), FvW, B-TG y factor plaquetario 4, además de gránulos densos donde se encuentra adenosíntrifosfato (ATP), adenosíndifosfato (ADP), serotonina y calcio.¹⁰

El proceso hemostático consta de cuatro etapas consecutivas, en primer lugar, ocurre la fase vascular, donde se produce una vasoconstricción refleja causada por la endotelina, secretada por las células endoteliales como respuesta al estímulo nocivo, también ocurre la exposición del colágeno que se encuentra bajo la membrana endotelial, luego sigue la fase plaquetaria, que se compone de tres etapas: adhesión plaquetaria, degranulación y agregación plaquetaria.⁷

El proceso de señalización que se produce durante la activación de plaquetas puede ser clasificada en tres tipos: (1) interacción de los agonistas con sus respectivos receptores plaquetarios y principios de la activación plaquetaria, mediada por el receptor de señalización, (2) eventos de señalización común intermedios y (3) activación de las integrinas (señalización *inside-out*) y de señalización afuera hacia adentro (*outside-in*).⁹ La señalización *inside-out*, se refiere al mecanismo de señalización intracelular, mediado por

integrinas, que induce cambios en el extracelular. Las plaquetas expresan integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, también llamada GPIIb/IIIa (receptor del fibrinógeno), el receptor $\alpha_v\beta_3$, (receptor de vitronectina), $\alpha_2\beta_1$ (receptores de colágeno), $\alpha_5\beta_1$ (receptores de fibronectina) y $\alpha_6\beta_1$ (receptor de laminina), estas integrinas poseen un mecanismo de transducción de señal similar, siendo GPIIb/IIIa la más importante, esta, al estar la plaqueta inactiva, mantiene una afinidad baja hacia su ligandos (fibrinógeno, FvW y proteínas de la matriz), pero al exponerse estos tras la injuria, la GPIIb/IIIa aumenta su afinidad, uniéndose el receptor con los ligandos y activando la plaqueta, además, esta interacción actúa como mediadora en los procesos adhesión plaquetaria, agregación plaquetaria y formación del trombo. Por su parte, la señalización *outside-in* ocurre como respuesta a la activación de las integrinas GPIIb/IIIa luego de la unión a su ligando, estimulando una serie de eventos de señalización intracelular (desde afuera-hacia adentro) que lleva a las plaquetas a la difusión, secreción de gránulos, adherencia (estable) y la retracción del coágulo.

La adhesión plaquetaria ocurre cuando se exponen las fibras de colágeno sub-endotelial. La plaqueta, mediante señalización común utiliza la glicoproteína-VI (GPVI), para generar una interacción colágeno-GPVI que favorece el proceso de *rolling* en la zona dañada. Por otro lado, FvW se une al colágeno y GPIb/IX/V se une al FvW. El endotelio libera óxido nítrico, prostaglandina E2 y otros mediadores agonistas que intensifican la actividad plaquetaria.^{7, 10} Una vez creada la interacción GPIb/IX/V-FvW se une la GPIIb/IIIa; esta última tiene la capacidad de unir fibrinógeno y FvW, esta unión resulta en el cambio de la forma plaquetaria, de discoide a redonda.^{10, 11, 12}

Dentro de la plaqueta ocurre una activación del sistema tubular denso y del sistema canalicular abierto, se fusionan los gránulos densos y alfa, liberándose su contenido. Además, la plaqueta comienza a sintetizar las prostaciclina y tromboxano A2 (TxA2) a partir de fosfolípidos de membrana. Las prostaciclina tienen actividad vasodilatadora, mientras que el TxA2 es un potente agregante plaquetario, cada plaqueta agregada, señala a más plaquetas.^{9, 11}

Unidas por una parte al colágeno y entre sí por el fibrinógeno o el FvW, las plaquetas se fusionan entre ellas mediante pseudópodos, formando un acúmulo. La P-selectina plaquetaria une a los monocitos mediante el receptor PSGL-1, formando la unión P-selectina-PSGL-1.^{7, 11}

A su vez, entran en acción los factores de coagulación, en la fase plasmática de la hemostasia, que comienza tras la injuria vascular, donde se expone el factor tisular y el kininógeno de alto peso molecular contenidos en los tejidos. Estos desencadenan una cascada de reacciones, donde participan los factores de la coagulación, factor plaquetario 3 y calcio. Los factores más relevantes son: la trombina, que actúa como amplificador de cascada ejerciendo un *feedback* positivo en varios puntos del proceso, por su parte, la fibrina es de gran importancia para la formación de una malla de fibrina soluble, ya que, mediado por el factor XIII, pasa de estado soluble a insoluble, estabilizando el coágulo y generando el trombo.¹³

Debido a la formación de la malla de fibrina insoluble, se vuelve necesario proceso antagonista, que se encargue de la retracción de este coágulo. La fibrinólisis es un proceso antitrombótico, encargado de reestablecer la fluidez de la sangre volviendo al estado fisiológico, mediante la destrucción de la malla de fibrina, este proceso es llevado a cabo por la plasmina, una enzima que actuará degradando el fibrinógeno o la fibrina, formando productos de degradación de la fibrina. Los fragmentos X e Y se producen en la etapa temprana del proceso, por esto, son de mayor tamaño, luego, la digestión de éstos últimos, originan los fragmentos D y E. Si ocurre la degradación de los enlaces cruzados del polímero de fibrina se forma un fragmento dimérico D, llamado dímero D.⁸

Fármacos antiplaquetarios

En los últimos años, la industria farmacéutica ha puesto énfasis en el desarrollo de fármacos que bloquean la activación y agregación plaquetaria. A pesar de que se han buscado antiagregantes plaquetarios más potentes,

todavía el inhibidor de la ciclooxigenasa, ácido acetil salicílico, Aspirina, es considerada el estándar para este tipo de tratamiento. Existen otras estrategias terapéuticas, basadas en la inhibición de la agregación plaquetaria estimulada por ADP (ticlopidina y clopidogrel), además de inhibidores de la fosfodiesterasa 3 (cilostazol), otros tratamientos se basan en la unión mediante anticuerpos a la integrina GPIIb/IIIa, actuando como antagonistas, impidiendo la unión de la proteína con sus ligandos (abciximab).¹⁴ Pese a que estas estrategias han servido en la reducción de la actividad trombótica,^{15, 16} los efectos secundarios que conlleva la ingesta de estos medicamentos, van desde fenómeno de resistencia y baja efectividad¹⁷ hasta úlceras gástricas, sangramiento y falla renal.¹⁸

El cilostazol es un fármaco derivado de la 2-oxoquinolona, presenta efectos como vasodilatador, antiplaquetario, además de efectos antiproliferativos, reduciendo la proliferación de células musculares lisas y la hiperplasia de la neointima luego de una injuria endotelial.¹⁹ El cilostazol fue aprobado por la *Food and Drug Administration* en el año 1999, para uso en pacientes con claudicación intermitente, en pacientes con enfermedad arterial periférica, siendo sus efectos demostrados, pero presentando respuestas individuales muy variadas entre los pacientes que reciben el tratamiento.²⁰

Se utiliza en el tratamiento de síntomas isquémicos, en pacientes con obstrucción arterial periférica crónica y para la prevención secundaria de infartos cerebrales,¹⁵ recientemente se ha reportado un efecto preventivo en aterogénesis, además de disminuir los niveles séricos de triglicéridos en roedores.²¹ Su mecanismo de acción no está del todo esclarecido, pero se presume que basa su acción en la inhibición selectiva de la enzima fosfodiesterasa 3, que cataliza la hidrólisis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y guanosín monofosfato cíclico (cGMP), formando 5'-AMP y 5'-GMP, al bloquear esta enzima, aumentan los niveles intracelulares de cAMP y cGMP, que son segundos mensajeros celulares inhibitorios, las elevadas concentraciones de estos nucleótidos cíclicos interfieren en las vías de activación plaquetaria, bloqueando la reorganización citoesquelética

plaquetaria, la activación del receptor de fibrinógeno, la degranulación y la expresión de mediadores proinflamatorios.²² La administración oral de este medicamento, sumado a la ingesta de alimentos, aumenta la velocidad y grado de absorción del fármaco. El cilostazol se une fuertemente a la albúmina, siendo metabolizado en el hígado por las enzimas del citocromo P450, los metabolitos resultantes se eliminan por orina. Su vida media es de 11 horas, valor que se incrementa en pacientes con daño renal. Entre los efectos secundarios se encuentra: dolor de cabeza, mareos, diarrea, palpitaciones y taquicardia.¹⁹

Nanomedicina

El término nanotecnología se refiere a la manufactura y utilización de materiales, dispositivos y sistemas en el rango de dimensión de 0,1-100 nm.²³ Si bien el tamaño de las nanoestructuras es de suma importancia, adquieren mayor relevancia las propiedades físicas y bioquímicas que poseen estas estructuras tales como conductividad eléctrica, elasticidad, resistencia, afinidad osmótica, entre otras.

La nanotecnología es una disciplina emergente,²⁴ que se presenta como un mercado de crecimiento rápido,²⁵ es una tecnología fundamental que promete revolucionar varias industrias, influyendo en la medicina y en los bienes de uso diario,²⁶ se le ha denominado la “Revolución industrial del siglo XXI”, debido a su amplio rango de aplicaciones. Ha mejorado, y en algunos casos ha revolucionado varios sectores industriales, con los que lidiamos día a día, entre ellos, la agricultura, comida segura, farmacéutica, cosmética y cuidado personal, utilizando tecnologías que se enfocan principalmente en nanopartículas,²⁵ el tamaño de las nanopartículas las convierte en material de gran interés para la generación de medicamentos, el hecho de mantener una masa invariable y disminuir el tamaño a una escala nanométrica, se traduce en un aumento en la superficie de las nanopartículas, otorgándoles capacidad de

cargar especies reactivas,^{27, 28} o fármacos insolubles en agua, además tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas y permitir liberación sitio-específica de fármacos.²⁸ Las nanopartículas pueden separarse en dos grandes grupos, por una parte, se encuentran las nanopartículas lábiles, que se desintegran en diferentes componentes celulares, ejemplos de ellas son micelas, liposomas, polímeros y nanoemulsiones; por otro lado, están las nanopartículas insolubles, entre ellas se encuentran fullerenos, dióxido de titanio y dióxido de silicio.²⁷

La nanomedicina surge cuando se aplica la nanotecnología a las ciencias de la salud, siendo un nicho emergente para la investigación.²⁹ Durante los últimos años, se ha observado un crecimiento exponencial de estudios relacionados con la nanomedicina, esto, se explica debido al alto impacto que la salud tiene en la vida cotidiana, desarrollando importantes aplicaciones de la nanotecnología, especialmente en el campo diagnóstico y terapéutico.³⁰ Entre los argumentos que ponen a la nanomedicina en una primera línea de innovación, en cuanto a tratamientos de diferentes patologías, se destaca su uso en la farmacología por la obtención de resultados más eficaces y menos riesgosos.³¹ Con este fin, es necesario el desarrollo de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos de todo tipo, entre los que se encuentran quimioterapéuticos, antibióticos y antiagregantes plaquetarios.

Nanopartículas multifuncionales cargadas con fármacos, ofrecen una mejora en las propiedades farmacológicas convencionales (solubilidad, vida media, biodistribución, biocompatibilidad), además de la oportunidad de cruzar barreras biológicas, alcanzar tejidos de difícil acceso, liberación sitio-específica e intracelular de fármacos. Dado esto, es de suma importancia una correcta elección de la nanopartícula, debido a la existencia de una amplia gama de estas, todas con propiedades distintas, por lo que es necesario conocer las características cada una de ellas.

Las nanopartículas pueden ser de distinta naturaleza, cada tipo posee un comportamiento distinto, lo que le otorga ventajas en dependiendo de la

utilidad que se le quiera dar, entre ellas encontramos nanopartículas metálicas, nanocristales, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, fullerenos, dendrímeros, nanopartículas de silicio y nanotubos de carbono. Entre los tipos de las partículas nanométricas más utilizadas en investigación, podemos encontrar: dendrímeros, fullerenos, nanopartículas de silicio, nanotubos de carbono y nanopartículas poliméricas, siendo estas últimas las más utilizadas, ya que han mostrado una mejor estabilidad biológica en comparación de otras nanopartículas.

Nanopartículas poliméricas y métodos de síntesis

Las nanopartículas poliméricas utilizan cadenas poliméricas para encapsular fármacos o componentes bioactivos, los polímeros pueden ser de origen natural (alginato, dextrano, albúmina) o sintéticos. Entre los polímeros más utilizados se encuentran los de la familia de poliésteres, donde podemos destacar la poli caprolactona, el ácido poli láctico, el ácido poli láctico– glicólico y sus derivados. La principal característica de estos es su alta biocompatibilidad y su eficacia en la encapsulación de fármacos de diferente naturaleza química,^{31, 32} a lo que también podemos agregar su gran estabilidad en ambiente fisiológico lo cual genera una mínima respuesta inmune.³³ Otra característica importante es que sus productos de degradación son eliminados por el metabolismo celular, evitando así su acumulación en el organismo junto con posibles efectos adversos a su utilización.²⁸ Farmacológicamente, son capaces de incorporar y liberar en forma sostenida una mayor cantidad del fármaco, mejorando las propiedades farmacocinéticas del agente terapéutico, lo cual desde un punto de vista investigativo abre un amplio espectro de nuevas estrategias terapéuticas.³⁴ En las últimas dos décadas, un gran número de productos terapéuticos basados en nanopartículas han entrado en desarrollo clínico o ha sido aprobado para uso clínico. Nanopartículas

poliméricas y liposomas representan dos clases dominantes de nano vehículos con capacidad de encapsular eficientemente variadas clases de fármacos.³⁵

La síntesis de nanopartículas poliméricas comprende dos métodos, microemulsión, donde se obtienen resultados reproducibles y estructuras predecibles, esta microemulsión puede ser de tipo doble o simple. Esto dependerá si se realiza una emulsión agua/aceite o agua/aceite/agua respectivamente. Las nanopartículas poliméricas también pueden ser sintetizadas por método de autoensamblaje o nanoprecipitación de copolímeros biodegradables que consisten en dos o más bloques de polímero con diferentes hidrofobicidades.³⁵ El uso de polímeros anfifílicos resulta de la formación de nanopartículas poliméricas con un núcleo hidrofóbico y una envoltura hidrofílica. La estructura de núcleo-corteza de nanopartículas poliméricas les permite: encapsular y transportar medicamentos poco solubles en agua; disminuir la bio-contaminación de las nanopartículas; liberar fármacos a un ritmo sostenido y funcionar adicionalmente con ligandos para la entrega diferencial.³⁶

La nanoprecipitación corresponde a una mejora del método de autoensamblaje, que implica el uso de un disolvente orgánico que es miscible con una fase acuosa. En esta técnica, el polímero y el fármaco se disuelven en el disolvente orgánico y se añade luego esta solución gota a gota a una solución acuosa (no disolvente) bajo agitación. Una vez en contacto con el agua, los polímeros hidrofóbicos y precipitado de fármacos se auto-ensamblan en *Shell-core* formando estructuras esféricas con el fin de reducir la energía libre del sistema. Después de auto-ensamblaje, el disolvente orgánico se evapora ya sea por evaporación a presión reducida, o simplemente por mezcla continua a la presión atmosférica si el disolvente es relativamente volátil. La formación instantánea de partículas se rige por los principios de efecto Marangoni y se ha atribuido a las interacciones entre fases líquidas. El uso de polímeros de dos bloques hidrófobo-*PEGilados* en nanoprecipitation conduce a nanopartículas poliméricas que consisten en un núcleo hidrofóbico, con

fármacos hidrofóbicos atrapados, rodeados por una envoltura hidrofílica para la estabilización estérica. La nanoprecipitación es un método simple, que solo requiere agitación suave bajo un mínimo estrés. Por lo general, a través de este método se obtienen nanopartículas poliméricas más pequeñas en comparación con otros métodos en condiciones similares.³⁷ En contraste, entre algunos inconvenientes de este método, se incluye el pobre atrapamiento de fármacos hidrofílicos (estos fármacos pueden permanecer en la fase acuosa) en comparación con otros métodos, además de la dificultad en la eliminación completa del disolvente orgánico después del auto-ensamblaje.³⁸

Este método se encuentra estandarizado para la formación de partículas poliméricas con tamaños por debajo los 100 nm, dirigido principalmente a nanopartículas híbridas lípido-polímero a través de una combinación de nanoprecipitación y auto-ensamblaje. Combinan las características deseables para nanopartículas poliméricas y liposomas, excluyendo algunas de sus limitaciones intrínsecas. Las nanopartículas poliméricas se componen de tres componentes funcionales distintos: i) un núcleo polimérico hidrofóbico biodegradable que puede transportar fármacos bioactivos poco solubles en agua y liberarlos a un ritmo sostenido; ii) un material *stealth* formando una envoltura hidrofílica, que puede permitir a las nanopartículas evitar el reconocimiento por componentes del sistema inmune y aumentar la circulación sistémica de partícula (vida media); iii) una monocapa de lípido en la interfase del núcleo hidrofóbico y en la envoltura hidrofílica, que puede evitar que los agentes difundan libremente fuera de las nanopartículas y reducir la tasa de penetración del agua en las nanopartículas, mejorando el rendimiento de encapsulación de fármacos y la desaceleración de liberación del fármaco desde nanopartículas.³⁹

3. Hipótesis

Cilostazol cargado en nanopartículas híbridas lípido-polímero presenta mayor actividad antiplaquetaria que al ser administrado en forma libre.

4. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas híbridas lípido-polímero cargadas con cilostazol y evaluar su actividad antiplaquetaria *in vitro*.

5. Objetivos Específicos

- 5.1. Determinar el tamaño y carga superficial de las nanopartículas.
- 5.2. Determinar estabilidad de las nanopartículas en condiciones fisiológicas (pH 7; 37°C).
- 5.3. Evaluación del efecto de las nanopartículas sobre la membrana eritrocitaria.
- 5.4. Determinar eficacia de encapsulamiento, capacidad de carga y liberación *in vitro* del cilostazol cargado en las nanopartículas.
- 5.5. Estudiar el efecto de las nanopartículas en la activación plaquetaria inducida por los agonistas ADP y colágeno.
- 5.6. Estudiar activación plaquetaria en presencia de las nanopartículas cargadas con cilostazol.

6. Materiales y Métodos

6.1. Tipo de estudio: Se utilizó un modelo analítico experimental.

6.2. Lugar de realización: La investigación se llevó a cabo en el centro de investigación CIMIS (*Center for Integrative Medicine and Innovate Science*), perteneciente a la Facultad de Medicina–UNAB en el grupo de *Nanomedicine and Targeted Delivery* dirigido por el Dr. Cristian Vilos.

6.3. Muestras: Para la realización de la investigación se utilizaron nanopartículas formuladas durante el desarrollo de esta unidad de investigación. Se realizaron dos tipos de formulaciones, (1) Nanopartículas vacías, PLA-PEG- \emptyset , y (2) nanopartículas cargadas con cilostazol, PLA-PEG-Cilostazol, además, para la evaluación del efecto de las nanopartículas se utilizaron componentes sanguíneos extraídos de un sujeto sano (investigador), de donde se obtuvo sangre total, la que fue centrifugada. De los componentes obtenidos se utilizaron (1) glóbulos rojos para evaluar el efecto de las nanopartículas sobre la membrana eritrocitaria y (2) plaquetas, donde se evaluó el efecto de las nanopartículas sobre la agregación plaquetaria.

6.4. Variables

- Las variables de tipo dependientes presentes en la investigación corresponderán a la (1) actividad plaquetaria, además de (2) las condiciones de formulación de nanopartículas.
- Por su parte, la variable independiente de la investigación corresponderá a la presencia de nanomedicamento.

6.5. Recolección de la información: la información se recolectó mediante dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS) en un equipo

Zeta Sizer Nano Zs3000 (Malvern, Reino Unido. Además de la utilización del método de espectrofotometría, para la evaluación de hemólisis, en un equipo BioTek (BiotechSynergy H1, Winooski, VT, USA)

6.6. Método estadístico de análisis de la información: En esta investigación se utilizó n muestral bajo, es decir, inferior a 30 muestras por grupo. Por lo tanto, no podemos asumir una distribución normal de los datos y en estos casos se sugiere la utilización de métodos estadísticos no paramétricos. En aquellos casos en que se estudien 3 o más grupos se utilizó Kruskal-Wallis, y al analizar 2 grupos o realizar un post-test se usó Mann-Whitney. Los resultados fueron presentados como el promedio y desviación estándar, y el grado de significancia fue con un valor $p \leq 0,05$.

Formulación de nanopartículas PLA-PEG

Nanopartículas híbridas de PLA-PEG fueron formuladas mediante una modificación del método de nanoprecipitación auto-ensamblaje, resultando nanopartículas compuestas de un centro hidrofóbico formado por el polímero biodegradable/biocompatible ácido poliláctico (PLA), que permite el encapsulamiento del cilostazol. Las nanopartículas poseen un recubrimiento lipídico, el cual permite retener el fármaco encapsulado y aumenta la estabilidad de las nanopartículas. En la superficie más externa de las nanopartículas se encuentra una capa de polietilenglicol (PEG), que le confiere mayor biocompatibilidad a nuestro sistema y estabilidad en un ambiente acuoso.

Para la síntesis de nanopartículas vacías (PLA-PEG-Ø) se utilizó PLA-COOH al 0,5 % en acetonitrilo. La solución polimérica fue adicionada gota a gota a un vial en agitación magnética a 800 rpm a 40°C y 15 mL de una solución que contiene disuelto DHPE-PEG en metanol en concentración 0,1%.

Una vez que adicionada toda la solución polimérica, la preparación se mantuvo en agitación durante 2 horas. Posteriormente, las nanopartículas se lavaron tres veces con agua miliQ en tubos Amicon Ultra-15 *CentrifugalFilter* (EMD Millipore, MA, USA) y se re suspendieron en 1 mL para su utilización. En el caso de las nanopartículas cargadas con cilostazol se repite el proceso anterior, añadiendo 0,5 mg de cilostazol (PLA-PEG-Cilostazol) en 1 mL de PLA-COOH, previo a la adición gota a gota en el vial (Anexo A.2)

Medición del tamaño y potencial zeta

El tamaño (diámetro, nm) de las nanopartículas se determinó mediante DLS en un equipo *Zeta Sizer Nano Zs3000*. La medición se realizó en una suspensión de 1 mL en solución salina pH 7,4. El DLS atraviesa con un láser monocromático a la cubeta que contiene la suspensión, así captando la intensidad de dispersión de partículas mediante un detector de fotones, el cual integra y la expresa el diámetro promedio de las nanopartículas (nm) y su dispersión de tamaño como índice de poli-dispersidad (*poly dispersity index*, PDI). El potencial zeta (mV) se midió mediante dispersión de luz electroforética con un rango de medición de 3,8 (nm) a 100 (μ m) de diámetro y una sensibilidad de 1 (mg/mL) en un equipo *Zeta Sizer Nano Zs3000*. La estabilidad se evaluó en nanopartículas incubadas a 37°C en agitación constante, a través de mediciones realizadas a los días 0, 1, 3, 5, 6 y 7, a tres preparaciones independientes de cada grupo experimental, mediante el método DLS.

Evaluación del efecto de nanopartículas en la membrana eritrocitaria

Se tomaron muestras de sangre venosa de uno de los investigadores en tubos de EDTA 15% por flebotomía, con sistema de tubos al vacío (*Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA*) se obtuvieron 15 mL

de sangre. Los tubos fueron centrifugados (DCS-16 *Centrifugal Presvac RV*) a 3.600 rpm por 10 minutos para la separación de glóbulos rojos del plasma. Los glóbulos rojos fueron lavados con una solución fosfato salina pH 7,4 se añadió a cada tubo las formulaciones de nanopartículas (cargadas y vacías), una formulación por cada tubo con glóbulos rojos, y se incubaron por 4 días en agitación a 37° C, posterior a la incubación, se centrifugaron los tubos a 3.600 rpm por 10 minutos y se extrajo el sobrenadante para su posterior medición por espectrofotometría (*Biotech Synergy H1, Winooski, VT, USA*) a 540 nm.

7. Resultados

Los resultados obtenidos del tamaño de las formulaciones de nanopartículas vacías (PLA-PEG-Ø) y cargadas con cilostazol (PLA-PEG-Cilostazol) no mostraron diferencias significativas. La Figura 1A presenta los resultados obtenidos de tres formulaciones vacías preparadas de manera independiente. Los valores obtenidos fueron de 122, 115 y 119 nm respectivamente. De igual manera las preparaciones con cilostazol fueron bastante homogéneas con tamaños de 123, 138 y 123 nm respectivamente, (Figura 1B). Por otra parte, la Figura 1C muestra un análisis comparativo de todas las preparaciones, en donde el solapamiento de las curvas corrobora que presentan un tamaño similar. El promedio de ambos grupos se presenta en la Figura 1D, en donde PLA-PEG-Ø mostró un promedio de 118 nm y PLA-PEG-Cilostazol de 130 nm.

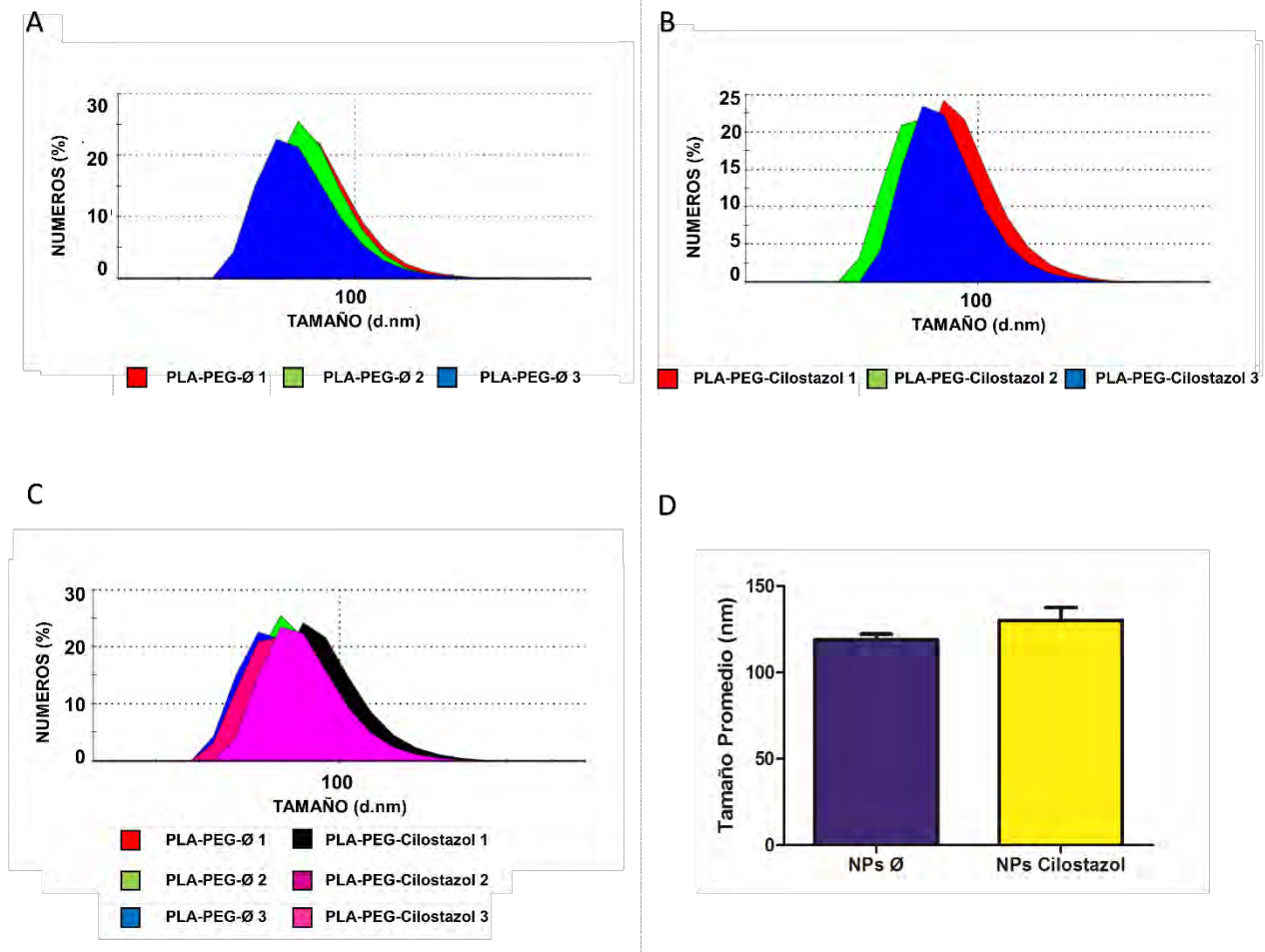
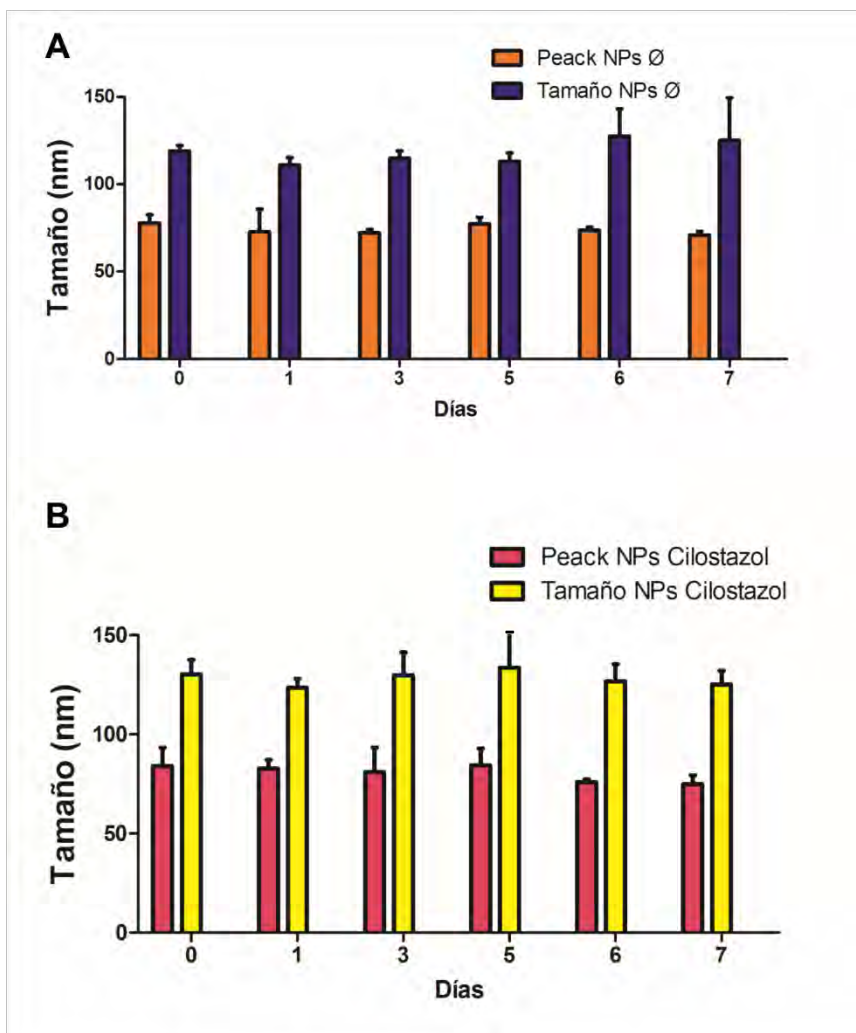


Figura 1: Suspensión de nanopartículas (NPs) en tampónfosfato salino pH 7,4 y 37°C. Las mediciones se realizaron en formulaciones preparadas de manera independiente (n=3) mediante DLS. (A) Distribución de tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Ø. (B) Distribución de tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Cilostazol. (C) Distribución de tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol. (D) Representación gráfica del tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol. Comparación de tamaños entre vacías y cargadas fue no significativa $p > 0,05$ Mann-Whitney.

Si bien en la Figura 1 se mostró el tamaño promedio de las nanopartículas, el equipo también nos indica el tamaño que presentó el mayor porcentaje de las nanopartículas (*peak*). En la Figura 2A, se observa una comparación de los *peaks* obtenidos en PLA-PEG-Ø, mientras que en 2B se presentan los *peaks* para PLA-PEG-Cilostazol (el *peak* en ambos casos corresponde aproximadamente al 25% de la muestra), en ambos grupos las



nanopartículas no superaron los 100 nm con valores promedio para PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol 74 y 80nm respectivamente.

Figura 2: Determinación del tamaño (estabilidad) de Nps suspendidas en tampón fosfato salino pH 7,4 y 37°C durante siete días. Las mediciones se realizaron a los días 0, 1, 3, 5, 6 y 7 en tres preparaciones independientes de cada grupo experimental (n=3) mediante DLS. (A) Representación gráfica del tamaño promedio y *peak* para nanopartículas de PLA-PEG-Ø. (B) Representación gráfica del tamaño promedio y *peak* para nanopartículas de PLA-PEG-Cilostazol.

Luego de transcurrir 7 días, se compararon los tamaños de las nanopartículas, como se observa en la Figura 3A; las curvas de distribución correspondientes a las formulaciones independientes de PLA-PEG-Ø son similares entre ellas, lo mismo ocurre con PLA-PEG-Cilostazol, Figura 3B. Por otra parte, en la Figura 3C, se representa gráficamente la comparación de tamaños de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, mientras que en la Figura 3D se comparan los

tamaños de estas formulaciones con líneas de tendencia para observar el comportamiento del tamaño a medida que transcurren los días.

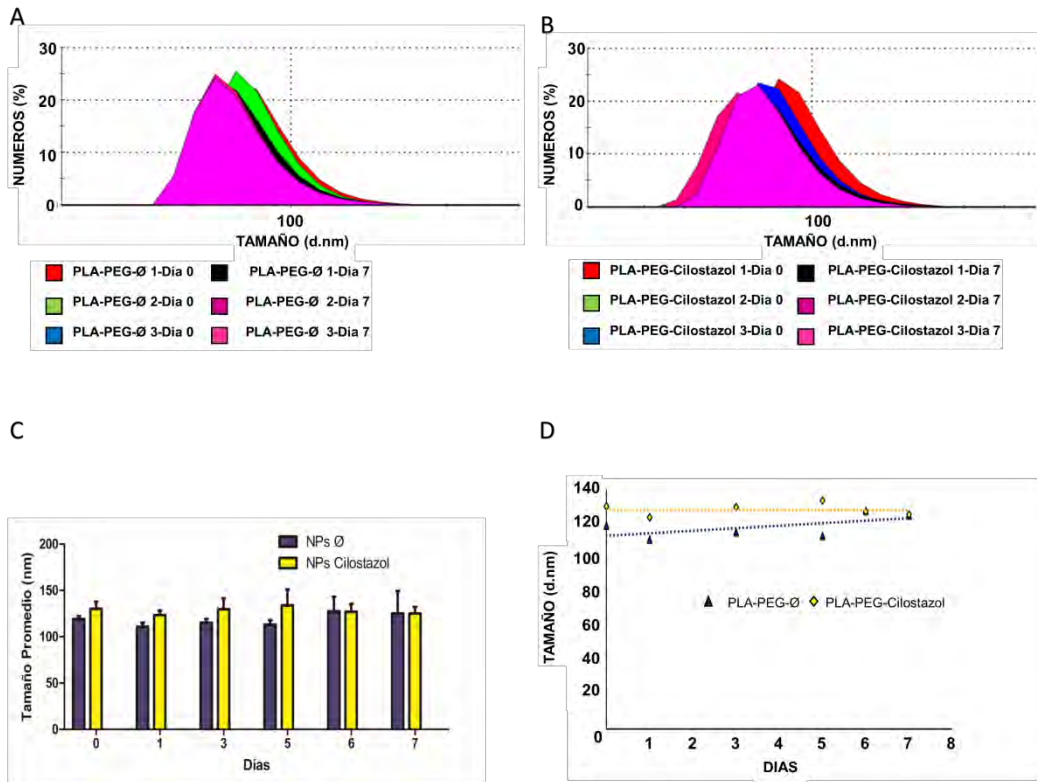


Figura 3: Suspensión de Nps en solución fosfato salino pH 7,4 y 37°C. Las mediciones se realizaron a los días 0, 1, 3, 5, 6 y 7, a tres preparaciones independientes de cada grupo experimental (n=3) mediante DLS. (A) Distribución de tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Ø a 0, 1, 3, 5, 6 y 7 días. (B) Distribución de tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Cilostazol a 0, 1, 3, 5, 6 y 7 días. (C) Representación gráfica del tamaño promedio nanopartículas de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol a 0, 1, 3, 5, 6 y 7 días. Significancia $p < 0,005$, Mann Whitney *post test*. (D) Representación gráfica de tamaño promedio, con línea de tendencia de nanopartículas de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol a 0, 1, 3, 5, 6 y 7 días.

Para continuar con la caracterización de las nanopartículas, se midió el potencial zeta a las formulaciones independientes de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, obteniendo valores promedio de -3,55mV y -3,58mV respectivamente, los que se muestran en la Figura 4. Valores de cada formulación detallados en la Anexo B.3

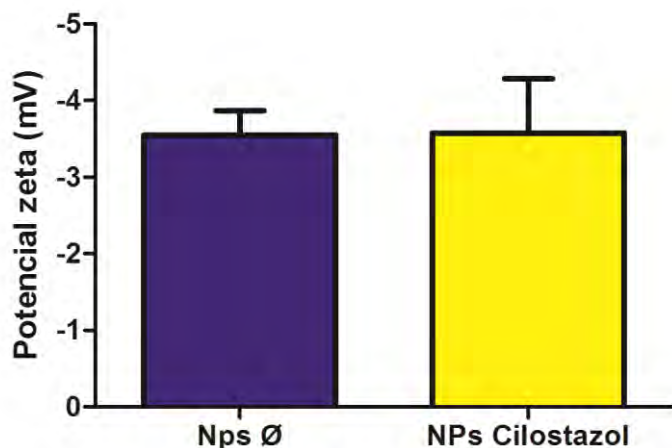


Figura 4: Suspensión de Nps en fosfato salino pH 7,4 y 37°C. Las mediciones se realizaron el día cero, a tres preparaciones independientes de cada grupo experimental (n=3) mediante DLS. No se observó diferencias significativas $p > 0,05$ Mann Whitney.

Se evaluó el efecto que ejercían las nanopartículas sobre la membrana eritrocitaria, en la Figura 5A se observa la hemólisis promedio de las formulaciones independientes de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, mostrando porcentajes promedio de 11,2% y 14,2% respectivamente, mientras que el control negativo mostró una hemólisis de 4,0%, por su parte, la Figura 5.B muestra el detalle de cada grupo independiente, estos valores se detallan en la Anexo B.4.

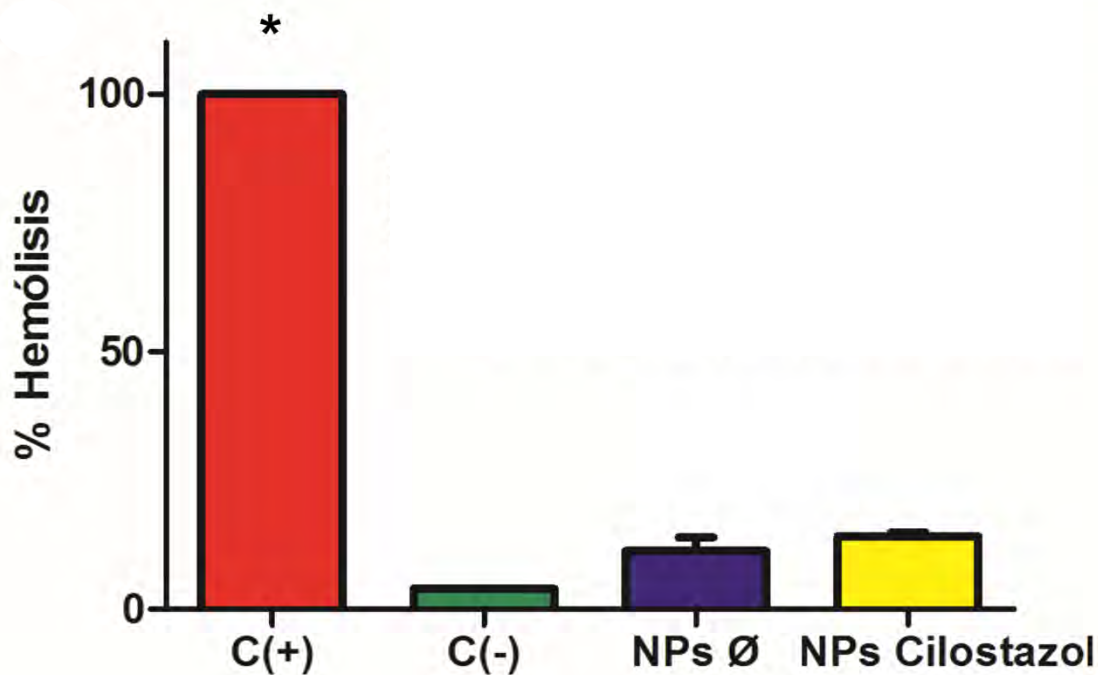


Figura 5: Suspensión de nanopartículas en solución fosfato salino pH 7,4 y 37°C. Las mediciones se realizaron luego de 12 horas de incubación, a tres preparaciones independientes de cada grupo experimental (n=3), más control positivo y negativo. La medición de hemoglobina liberada se realizó al sobrenadante de las muestras, obtenido por centrifugación, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm, control positivo realizado con etanol al 100%, control negativo en PBS pH 7,4; muestras realizadas en PBS pH 7,4 con las nanopartículas en solución. El análisis entre los grupos mostró diferencias significativas $p < 0,05$ Kruskal-Wallis. El análisis comparativo entre los grupos no mostró diferencias significativas con el control negativo $p > 0,05$ *Mann-Whitney post test*. Porcentaje de hemólisis promedio de nanopartículas de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol medido a las 12 horas de incubación.

8. Discusión

En el estudio de antiagregantes plaquetarios se observa una tendencia a investigar fármacos de uso oral para el tratamiento de ECV, por el contrario, en esta investigación se analizó un fármaco con un mecanismo de acción distinto a los descritos en la literatura, sin registro de haber sido cargado anteriormente en formulaciones de nanopartículas. Se describen numerosos estudios sobre nanopartículas aplicados a componentes del sistema de coagulación, estas nanopartículas utilizadas en dichos estudios son mayormente dendrímeros, donde se ha observado dendrímeros catiónicos resultan ser citotóxicos, causando daño en las membranas celulares, además de inducir la agregación plaquetaria,⁴⁰ mientras que dendrímeros neutros y aniónicos resultaron no ser citotóxicos. Por otra parte, se estudiaron nanopartículas poliméricas, como poliestireno catiónico, que se agregaron en presencia de suero, también, poliestireno de látex, que indujo activación plaquetaria mediante variadas vías, por otra parte, poliestireno de látex catiónico, además de inducir activación plaquetaria, produjo agregación plaquetaria, otras partículas poliméricas activaron la vía intrínseca de coagulación, esta activación se produjo en presencia de nanopartículas de gran tamaño.⁴¹ Según la naturaleza y las características fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas, no deberían presentarse los efectos mencionados anteriormente, debido que el potencial zeta y la dimensión de las nanopartículas son compatibles con los componentes sanguíneos,⁴² Las nanopartículas ingresarán a la plaqueta por medio del sistema canalicular abierto (Anexo A.1),^{43,44} donde el fármaco se liberará de manera lenta y prolongada, lo que conlleva a un aumento de la biodisponibilidad y la disminución de las dosis administradas, lo mencionado anteriormente nos pone a la vanguardia, con respecto a las plataformas terapéuticas convencionales.

Evaluación de tamaño de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol

Según los resultados obtenidos, el tamaño promedio de las nanopartículas, tanto vacías como cargadas con cilostazol, demostraron estar

dentro del rango para ser consideradas nanopartículas. Como se observa en las Figuras 1A y 1B, las curvas de frecuencia mostradas en los tres lotes de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, respectivamente, se comportan de manera similar, mostrando leves variaciones que pueden deberse a que cada lote se realizó de manera independiente, esto refleja que el método de síntesis utilizado se encuentra estandarizado de manera correcta. Con la información entregada en la Figura 1C, se observa que tanto las nanopartículas PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol tienen un comportamiento similar en cuanto a tamaño, esto se apoya con la Figura 1D donde se muestra una leve diferencia de tamaño entre PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, esta diferencia no es significativa, por lo que se infiere que el cilostazol cargado no afecta el tamaño de las nanopartículas. Las variaciones pueden deberse a que cada grupo de nanopartículas fue sintetizado por un operador independiente y, a su vez, cada lote fue sintetizado de manera independiente por cada operador. Al evaluar tamaño, según los parámetros de tamaño promedio y *peak* (intensidad) se puede notar una diferencia entre ambos valores (Figuras 2.A, 2.B), esto se debe a que el parámetro de tamaño promedio incluye todos los valores obtenidos en la curva de distribución, mientras que la intensidad muestra en que tamaño se obtuvo el *peak* de la curva, que corresponde aproximadamente al 25% del total de las nanopartículas (Anexo A.3 y A.4). El PDI es un valor que debe oscilar entre 0 y 1, mide la homogeneidad de las nanopartículas, para que una muestra sea homogénea, su PDI no debe superar 0,3; los PDI promedio obtenidos para PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol fueron de 0,161 y 0,190; respectivamente (Detallado en Anexo B.6). En la bibliografía se expone que nanopartículas poliméricas de tamaño intermedio, que abarcan un rango entre 20 y 100 nm tienen alto potencial de utilización *in vivo*, esto, por su habilidad de mantenerse por mayor tiempo en circulación sanguínea, cuando son diseñadas adecuadamente. Este rango de dimensión de las nanopartículas es lo suficientemente grande para evadir el *clearance* renal y linfático, además de ser lo suficientemente pequeño para evadir la opsonización. Por otra parte, nanopartículas que se encuentran en este rango de tamaño se cree que son

internalizadas con mayor facilidad por las células en comparación con nanopartículas de mayor o menor tamaño.⁴² Por esto, mediante los *peaks* de tamaños obtenidos por las nanopartículas formuladas, se puede considerar que son aptas para el su uso en plaquetas, ya que se encuentran dentro del rango anteriormente mencionado (Anexo B.2), por esto, tienen un alto potencial de utilización *in vivo*.

Evaluación de estabilidad de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol

Se evaluó la estabilidad de las formulaciones PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol en el tiempo, en la Figuras 3A y 3B se contrastan las curvas obtenidas de cada lote al día cero y siete de ambas formulaciones, respectivamente (valores detallados en Anexo B.1). Se observan curvas muy similares en ambos casos, lo que demuestra que PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol son estables, ya que no formaron agregados que se habrían visto reflejados en un aumento de tamaño. En la Figura 3C se muestra de manera gráfica y detallada la fluctuación del tamaño promedio de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, se observa el mismo comportamiento estable, sin presentar fluctuaciones significativas entre un día y otro, esto apoyado por la Figura 3D, donde se observa una línea de tendencia para cada formulación.

Evaluación de potencial zeta de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol

El potencial zeta, o carga superficial de las nanopartículas, se puede considerar como un factor de estabilidad, ya que al aumentar el valor absoluto del potencial, la nube iónica alrededor de la nanopartícula es mayor, por tanto la repulsión entre las nanopartículas también aumenta y esto evita que se formen agregados de nanopartículas. Los resultados obtenidos concuerdan con los esperados teóricamente, ya que si bien el polímero PEG presenta un grupo funcional CH₃ con carga neutra, se utilizó un polímero PLA-COOH que aporta la carga negativa a la superficie de la nanopartícula. Como se muestra

en la Figura 4 los valores fueron bastante similares en ambas formulaciones, por lo que se concluye que el fármaco al ser cargado en la nanopartícula no afecta significativamente la carga superficial, además, el valor obtenido es apto para la síntesis de nanopartículas que serán inyectadas al torrente sanguíneo. Las nanopartículas al tener potencial zeta negativo presentan menor citotoxicidad, por el contrario, las nanopartículas con potencial zeta positivo inducen la muerte celular y la liberación de mediadores, además de interactuar con la membrana celular y gatillar la liberación de Ca^{+2} , esto provoca el aumento del Ca^{+2} intracelular, lo que induce a la degranulación y estrés oxidativo, todo este proceso da como resultado citotoxicidad y muerte celular.⁴⁵

Evaluación del efecto de PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol sobre la membrana eritrocitaria

Los porcentajes de hemólisis fueron calculados en base al control positivo, se presentaron gráficamente en la Figura 5 se muestra el efecto que ejercen las nanopartículas PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol sobre la membrana eritrocitaria, donde no se observa variación significativa, con respecto al control negativo. Comparando el porcentaje de hemólisis obtenido para PLA-PEG-Ø y PLA-PEG-Cilostazol, con respecto al control negativo, se deduce que estas nanopartículas no ejercen un efecto significativo sobre la integridad de la membrana de los glóbulos rojos.

Desafortunadamente no fue posible completar todos los objetivos específicos planteados al inicio de esta investigación debido a problemas técnicos entre los cuales la encargada del equipo UPLC comenzó su periodo prenatal y el operador reemplazante se encuentra aún en capacitación. Por otra parte, los experimentos que prueban el efecto de las nanopartículas en la activación se encuentran en desarrollo en el grupo de colaboradores de la Universidad de Talca.

9. Conclusiones

Mediante los resultados obtenidos, se concluye que las nanopartículas sintetizadas muestran un comportamiento estable, lo que permite prever que no formarán acúmulos en condiciones fisiológicas, manteniendo su tamaño en un período de siete días en agitación constante, incubadas a 37 °C en solución fosfato salino pH 7,4. Además, los tamaños y potencial zeta de ambas formulaciones no variaron significativamente, lo que muestra que el cilostazol cargado en las nanopartículas no altera las propiedades físicas de la nanopartícula. Los valores obtenidos para tamaño y potencial zeta son compatibles con nanopartículas que serán inyectadas en el torrente sanguíneo.

A pesar de no haber completado todos los objetivos específicos propuestos en esta investigación que nos conducirían a comprobar nuestra hipótesis, los resultados a la fecha son bastante promisorios, debido a que el proceso de síntesis y obtención de nanopartículas de tamaño homogéneo y estable es un proceso crítico en el desarrollo de nanopartículas poliméricas para aplicaciones terapéuticas.

10. Referencias Bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades cardiovasculares. (2015). at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>>
2. P Bustos, H Amigo, A. A. L. & Acosta, A. Factores de riesgo de enfermedad Cardiovascular en adultos jóvenes. *Rev Med Chil* 131, 973–980 (2003).
3. Elena Galkina, K. L. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis*. *Annu Rev Immunol* 27, 165–197 (2009).
4. Ma, S., Yang, D., Li, D., Tang, B. & Yang, Y. Oleic acid induces smooth muscle foam cell formation and enhances atherosclerotic lesion development via CD36. *Lipids Heal Dis* 10, 53 (2011).
5. Westhorpe C, Dufour E, Maisa A, Jaworowski A, Crowe S, M. W. Endothelial cell activation promotes foam cell formation by monocytes following transendothelial migration in an in vitro model. *Exp Mol Pathol* 93, 220–226 (2012).
6. Keyel P, Tkacheva O, Larregina A, S. R. Coordinate Stimulation of Macrophages by Microparticles and TLR Ligands Induces Foam Cell Formation. *J Immunol* 189, 4621–4629 (2012).
7. M.T. Rondina, A.S. Weyrich, G. A. Z. Platelets as Cellular Effectors of Inflammation in Vascular Diseases. 112, 1506–1519 (2013).
8. B. Rodak. *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. (2004).
9. Z. Li, M.K. Delaney, K.A, O. X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arter Thromb Vasc Biol* 30, 2341–2349 (2010).
10. Horstman L, Jy W, Ahn Y, Zivadinov R, Maghzi A, Etemadifar M, Alexander J, M. A. Role of platelets in neuroinflammation: a wide angle perspective. *J Neuroinflammation* 7:10, 1–22 (2010).
11. Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A. & Zimmerman, G. A. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum Adriana. *Semin Immunopathol* 34, 5–30 (2012).
12. Ruggeri, Z. M. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation* 16, 58–83 (2009).
13. Cazzaniga, P., Nobile, M. S., Besozzi, D., Bellini, M. & Mauri, G. Massive exploration of perturbed conditions of the blood coagulation cascade through GPU parallelization. *BioMed Res Int* 2014, 1–20 (2014).
14. Bennett, J. S. Novel Platelet Inhibitors. *Annu Rev Med* 52, 161–184 (2001).
15. Ito, H., Hashimoto, A., Matsumoto, Y., Yao, H. & Miyakoda, G. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in hypertensive rats. *J Cereb Blood flow Metab* 30, 343–351 (2010).
16. Kaber G, Kaiser B, Baumgärtel-Allekotte D, Rauch B, Nossmann S, Heim K, Weber A, Nagy N, Fischer J, S. K. Antagonism of the antithrombotic and

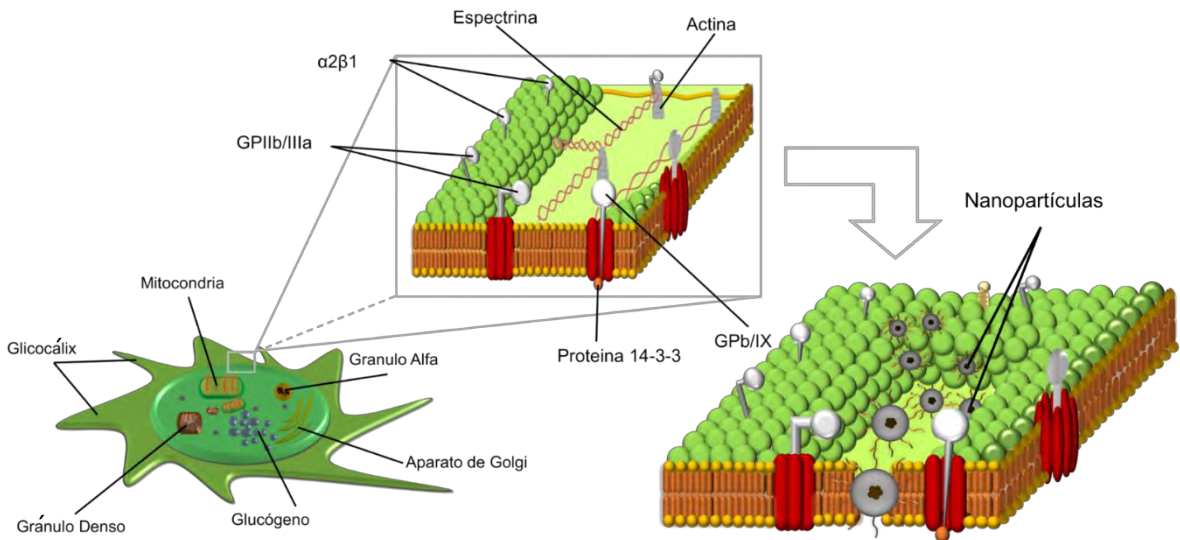
- anti-atherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit. *Br J Pharmacol* **164**, 561–569 (2011).
17. Alderson, P. Aspirin Resistance. *BJM* **328**, 477–479 (2004).
 18. Barrett N, Holbrook L, Jones S, Kaiser W, Moraes L, Rana R, Sage T, Stanley R, Tucker K, Wright B, G. J. Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* **154**, 918–939 (2008).
 19. Eikelboom, J. W., Hirsh, J., Spencer, F. A., Baglin, T. P. & Weitz, J. I. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* **141**, e89S–119S (2012).
 20. Pande R, Hiatt W, Zhang P, Hittel N, Creager M, M. M. A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication. *Vasc Med* **15**, 181–188 (2010).
 21. Ito H, Uehara K, Matsumoto Y, Hashimoto A, Nagano C, Niimi M, Miyakoda G, N. K. Cilostazol inhibits accumulation of triglyceride in aorta and platelet aggregation in cholesterol-fed rabbits. *PLoS One* **7**, e39374 (2012).
 22. Gresele, P., Momi, S. & Falcinelli, E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* **72**, 634–646 (2011).
 23. Zhang Y, Leu Y, Aitken R, R. M. Inventory of Engineered Nanoparticle-Containing Consumer Products Available in the Singapore Retail Market and Likelihood of Release into the Aquatic Environment. *Int J Env Res Publ Heal* **12**, 8717–8743 (2015).
 24. Morganti, P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **3**, 5–13 (2010).
 25. Contado, C. Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem. *Front Chem* **3**, 1–20 (2015).
 26. Liu Xuan, Zhang Pengzhu, Li Xin, Chen Hsinchun, Dang Yan, Larson Catherine, Roco Mihail C., W. X. Trends for nanotechnology development in China, Russia, and India. *J Nanoparticle Res* **11**, 1845–1866 (2009).
 27. Xing-Jie Liang, Chunying Chen, Yuliang Zhao, Lee Jia, and P. C. W. Biopharmaceutics and Therapeutic Potential of Engineered Nanomaterials. *Curr Drug Metab* **9**, 697–709 (2008).
 28. Vilos C, Morales F, Solar P, Herrera N, Gonzalez-nilo F, Aguayo D, Mendoza H, Comer J, Bravo M, Gonzalez P, Kato S, Cuello M, Alonso C, Bravo E, Bustamante E, Owen G, V. L. Paclitaxel-PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells. *Biomaterials* **34**, 4098–4108 (2013).
 29. Choi W, Kamaly N, Riol-blanco L, Lee I , Wu J, Swami A, Vilos C, Yameen B, Yu M, Shi J, Tabas I, Andrian U, Jon S, F. O. A Solvent-Free Thermosponge Nanoparticle Platform for Efficient Delivery of Labile Proteins. *Nano Lett* **14**, 6449–6465 (2014).

30. Vilos C, Gutierrez M, Escobar R, Morales F, Denardin J, Velazquez L, A. D. Superparamagnetic Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 (PHBV) nanoparticles for biomedical applications hydroxyvalerate). *E J Biotechnol* **16**, 2–11 (2013).
31. Hyeon, T. & Rotello, V. Nanomedicine themed issue. (2012).
32. Solar P, González G, Vilos C, Herrera N, Juica N, Moreno M, Simon F, V. L. Multifunctional polymeric nanoparticles doubly loaded with SPION and ceftiofur retain their physical and biological properties. *J Nanobiotechnology* **13:14**, 1–12 (2015).
33. F. Rancan, U. Blume-Peytavi, A. V. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **7**, 23–34 (2014).
34. Yameen, B. & Cristian Vilos, Won Il Choi, Andrew Whyte, Jining Huang, Lori Pollit, O. C. F. Drug Delivery Nanocarriers from Fully Degradable PEG-Conjugated Polyester with Reduction-Responsive Backbone. *Chem Eur J* **21**, 11325–11329 (2015).
35. Zhang L, Chan J, Gu F, Rhee J, Wang A, Radovic-Moreno A, Alexis F, Langer R, F. O. Self-assembled lipid–polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS Nano* **2**, 1696–702 (2008).
36. Shi, J., Xiao, Z., Votruba, A. R., Vilos, C. & Farokhzad, O. C. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid-Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Angew Chemie Int Ed* **50**, 7027–7031 (2011).
37. Yadav, K. S. & Sawant, K. K. Modified Nanoprecipitation Method for Preparation of Cytarabine-Loaded PLGA Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **11**, 1456–1465 (2010).
38. Chidambaram, M. & Krishnasamy, K. Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: An approach to fabricate narrow sized polymeric Nanoparticles. *Adv Phar Bull* **4**, 205–208 (2014).
39. Wang Q, Wu P, Ren W, Xin K, Yang Y, Xie C, Yang C, Liu Q, Yu L, Jiang X, Liu B, Li R, W. L. Comparative studies of salinomycin-loaded nanoparticles prepared by nanoprecipitation and single emulsion method. *Nanoscale res let* **9**, 351 (2014).
40. Dobrovolskaia M, Patri A, Simak J, Hall J, Semberova J, De Paoli, Lacerda S, M. S. Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets in vitro. *Mol Pharm* **9**, 382–393 (2013).
41. Ilinskaya A, D. M. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomedicine (Lond)* **8**, 969–981 (2014).
42. Elsbahy, M. & Wooley, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2545 (2012).
43. D Jones C , Campbell R, Franks Z, Gibson C, Thiagarajan G, Vieira-De-Abreu A, Sukavaneshvar S, Mohammad S, Li D, Ghandehari H, Weyrich A,

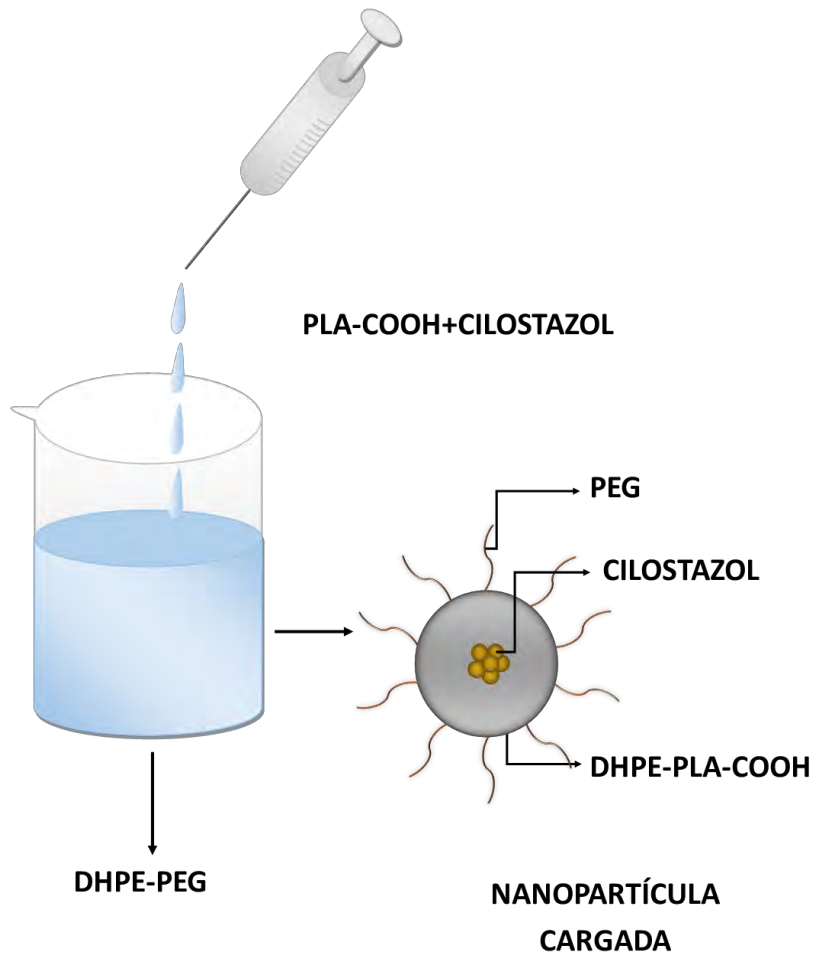
- Brooks B, G. D. Cationic PAMAM dendrimers disrupt key platelet functions. *Mol Pharm* **18**, 1199–1216 (2013).
44. Davies A, Lewis D, Watson S, Thomas S, P. Z. pH-controlled delivery of luminescent europium coated nanoparticles into platelets. *PNAS* **109**, 1862–1867 (2012).
45. Hwang, T., I, A., Lin, C., Y, C. & Fang, J. Cationic additives in nanosystems activate cytotoxicity and inflammatory response of human neutrophils : lipid nanoparticles versus polymeric nanoparticles. *Int J Nanomed* **10**, 371–385 (2015).

11. Anexos

Apéndice A: Figuras



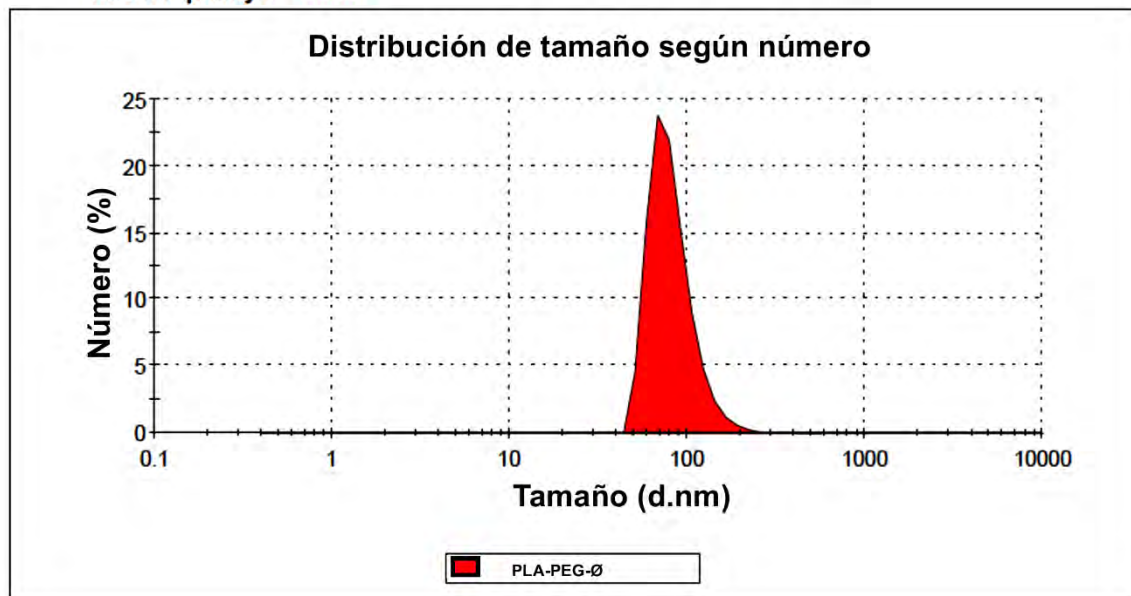
A.1 Estructura plaquetaria, se observa el citoplasma, que se encuentra bajo la sub-membrana, contiene mitocondrias, lisosomas, gránulos de glucógeno, que aportan energía a la plaqueta y gránulos α que contienen fibrinógeno, trombospondina, FV, FvW, B-TG y factor plaquetario 4, además de gránulos densos donde se encuentra ATP, ADP, serotonina y calcio, además se muestra en detalle los componentes principales de membrana plaquetaria, los receptores mostrados participan en la adhesión plaquetaria, se unen a los factores de la coagulación tales como fibrinógeno, FvW, además funcionan como receptores de colágeno, fibronectina y laminina. La internalización de las nanopartículas a través de la membrana plaquetaria, se realiza por medio de la apertura del sistema canalicular abierto.



A.2: Método de nanoprecipitación o auto-ensamblaje, se observa donde se encuentra cada componente previo al auto-ensamblaje, además, se ilustra el resultado del proceso, mostrando la nanopartícula sintetizada cargada con fármaco. El polímero y el fármaco se disuelven en el disolvente orgánico y se añade luego esta solución gota a gota a una solución acuosa bajo agitación. Una vez en contacto con el agua, los polímeros hidrofóbicos y precipitado de fármacos se auto-ensamblan en *Shell-core*, formando estructuras esféricas. Luego del auto-ensamblaje, el disolvente orgánico se evapora. A través de este método se obtienen nanopartículas poliméricas más pequeñas en comparación con otros métodos en condiciones similares.

	Size (d.nm):	% Number
Z-Average (d.nm): 122,0	Peak 1: 82,09	100,0
Pdl: 0,139	Peak 2: 0,000	0,0
	Peak 3: 0,000	0,0

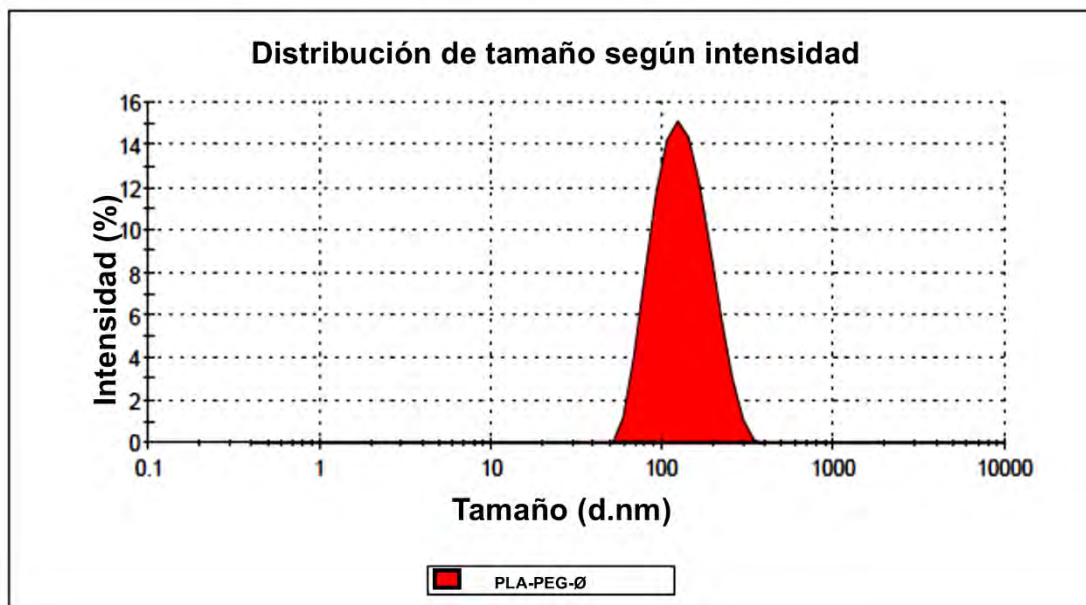
Result quality : **Good**



A.3: Ejemplificación de gráfica y valores obtenidos según tamaño promedio, estos valores incluyen toda el área bajo la curva de distribución.

	Size (d.nm):	% Intensity:
Z-Average (d.nm): 122,0	Peak 1: 136,0	100,0
Pdl: 0,139	Peak 2: 0,000	0,0
	Peak 3: 0,000	0,0

Result quality: Good



A.4: Ejemplificación de gráfica y valores obtenidos según *peak* (intensidad), estos valores representan el *peak* de tamaño obtenido, que representa aproximadamente al 25% del total de las nanopartículas medidas.

Apéndice B: Tablas

Días	Nps Ø-1	Nps Ø-2	Nps Ø-3	Nps Cilostazol-1	Nps Cilostazol-2	Nps Cilostazol-3
0	122	115	119	138	128	123
1	111	106	114	128	122	119
3	119	110	114	143	124	121
5	117	107	114	153	123	124
6	119	117	145	120	124	136
7	115	106	152	133	122	119

B.1: Tamaño promedio (nm) de nanopartículas según días

Días	Nps Ø-1	Nps Ø-2	Nps Ø-3	Nps Cilostazol-1	Nps Cilostazol-2	Nps Cilostazol-3
0	82	78	72	93	75	83
1	72	60	85	87	81	80
3	72	70	73	94	76	71
5	79	72	79	93	82	77
6	71	75	74	74	76	77
7	73	68	70	79	70	76

B.2: Tamaño (*peak*) (nm) de nanopartículas según días

	Nps Ø		Nps Cilostazol		
3,64	-3,2	-3,81	-2,76	-3,93	-4,03

B.3: Potencial Z (mV) de nanopartículas

(+)	C(-)	Nps Ø	Nps Cilostazol
00	4	11,2	14,2

B.4: Porcentaje de hemólisis promedio

as	PLA-PEG-Ø 1	PLA-PEG-Ø 2	PLA-PEG-Ø 3	PLA-PEG-Cil 1	PLA-PEG-Cil 2	PLA-PEG-Cil 3
0	0,139	0,178	0,130	0,207	0,148	0,182
1	0,116	0,139	0,133	0,133	0,145	0,171
3	0,132	0,169	0,147	0,197	0,187	0,257
5	0,147	0,174	0,146	0,263	0,148	0,165
6	0,178	0,156	0,235	0,218	0,198	0,318
7	0,137	0,180	0,265	0,125	0,148	0,201

B.5: PDI de nanopartículas