ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Osvaldo
Beltran Osuna

Tesis doctoral

NANOSISTEMAS BIOMIMÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Ciencia de Materiales

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

NANOSISTEMAS BIOMIMÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

Autor

Osvaldo Beltrán Osuna

Directores: Dr. Pablo Taboada Antelo

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mi padre, madre y Laura, por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser mi mayor fuente de inspiración. Esta tesis es tanto mía como de ustedes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

"Si quieres ir rápido camina solo, si quieres llegar lejos ve acompañado"

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin el apoyo y la guía de muchas personas, a quienes quiero expresar mi más sincera gratitud.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, mi padre Tomás Andrés Beltrán Vallejo, mi madre Laura Elena Osuna Portugal y mi hermana Laura Elena Beltrán Osuna, les agradezco su amor, paciencia y comprensión durante todos estos años. Sin su apoyo incondicional y sus sacrificios, este logro no habría sido posible. Todos mis logros también son suyos, los amo.

Agradezco a mis directores de tesis Dr. Pablo Taboada y Dr. Josué Juárez por su guía, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Sus consejos y conocimientos han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A los integrantes del grupo de física de coloides y polímeros, Dra. Silvia Barbosa, Dra. Adriana Cambón, Dr. Antonio Topete, Dra. Lilia Arellano, Dra. Victoria Marcos, Dr. Vicente Domínguez, Clara Ramírez, Oscar Abelenda, Mariangel Luna, Benito Antonio Martínez Ocasio, con una mención especial a Alba Costa, Alejandro Ogando y Xaniar Esmaeilzadeh, que más allá de ser mis compañeros de laboratorio, los considero mis amigos.

Al Medical Devices Group del International Iberian Nanotechnology Laboratory en Braga, Portugal dirigido por la Dra. Lorena Diéguez y Dra. Sara Abalde, gracias por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitirme realizar mi estancia de investigación, con una mención especial a mis compañeros de área de trabajo Hugo Benito, Patricia Cabanas, Arantxa Ibáñez y Beatriz Martín, gracias por haber hecho esta experiencia tan especial.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Quiero expresar mi gratitud a las instituciones que me brindaron el apoyo necesario para llevar a cabo esta investigación. Agradezco a la Universidad de Santiago de Compostela y la Universidad de Sonora por haber sido ambas mis casas de estudio a lo largo de todo este proceso. Gracias proporcionarme los recursos y el entorno para desarrollar mi trabajo. También agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías y al programa Iacobus por el financiamiento que hizo posible este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis. Sus palabras de aliento, críticas constructivas y apoyo en general han sido esenciales para completar este proyecto.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PRÓLOGO

"Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo".

-Niels Bohr, Premio Nóbel de Física

La presente Tesis Doctoral consta de un total de seis capítulos. En el primer capítulo, se realiza una introducción sobre diferentes conceptos relacionados con el biomimetismo, especialmente centrados en cómo el ser humano al observar y analizar los fenómenos que ocurren en la naturaleza ha tomado inspiración de ella para poder resolver diferentes tipos de problemáticas, desde cuestiones y problemas relacionados con la ingeniería al ámbito de las ciencias de la salud. A continuación, se realiza un análisis del desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos mediante el empleo de la nanotecnología, desde su clasificación en función de su naturaleza, propiedades, ventajas, desventajas, comportamiento dentro del organismo. Finalmente, el capítulo se concluye con un análisis del desarrollo de nanosistemas biomiméticos obtenidos a partir de la extracción de membranas citoplasmáticas celulares y un extenso análisis de la aterosclerosis y de los diversos sistemas desarrollados para su tratamiento y diagnóstico.

En el capítulo dos, se presentan los materiales y métodos empleados para el desarrollo experimental del trabajo, con una descripción detallada de los reactivos y metodologías utilizados.

El capítulo tres expone en detalle la síntesis, caracterización y posibles aplicaciones de un sistema biomimético nanoestructurado obtenido a partir de membranas celulares de macrófagos RAW 264.7 que permite la encapsulación de un fármaco en su interior, en concreto, de una estatina para el tratamiento de la aterosclerosis. Se desarrolla toda su caracterización desde un punto de vista físico-químico, se comprueba y evalúa la encapsulación del compuesto bioactivo, así como su

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estabilidad coloidal en distintos medios de relevancia fisiológica, y se realiza su evaluación biológica, en particular su biocompatibilidad y capacidad de internalización en distintas líneas celulares. Por último, se comprueba la efectividad terapéutica del nanosistema mediante ensayos de inhibición de especies reactivas de oxígeno y supresión de citocinas pro-inflamatorias.

En el cuarto capítulo, basado en los resultados obtenidos en el capítulo segundo se opta por desarrollar y caracterizar dos nanosistemas más complejos, que permiten la combinación simultánea de terapia y diagnóstico en una misma plataforma para la teragnóstica de la aterosclerosis. La base del nanosistema consta de una matriz polimérica en la que se encapsula un agente de diagnóstico, nanopartículas superparamagnéticas, y una estatina de naturaleza hidrofílica o una de naturaleza hidrofóbica; y todo el nanonúcleo recubierto por una coraza formada a partir de los fragmentos de membrana celular de macrófagos. Al igual que el primer nanosistema desarrollado, se analizan sus características físico-químicas efectuándose un proceso de optimización de su composición y propiedades. A continuación, se comprueba que el efecto terapéutico del fármaco no se ve afectado al estar incorporado en el interior del nanosistema.

Posteriormente, en el capítulo cinco se evalúan los dos tipos de nanosistemas y su comportamiento en modelos biológicos in vitro estáticos. Por último, la capacidad terapéutica de ambos tipos de nanosistemas se evalúa y compara en modelos celulares dinámicos, o sea, en cultivos celulares en dispositivos de microfluídica, lo que permite simular de manera más precisa las condiciones fisiológicas a las que se encuentran sometidas las células endoteliales arteriales en los vasos sanguíneos.

Finalmente, en el capítulo seis se presentan las conclusiones principales de este trabajo doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN/ ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death worldwide, accounting for about 30% of these deaths (Mc Namara, Alzubaidi, & Jackson, 2019). Atherosclerosis (AEs) is the primary underlying cause of CVD morbidity and mortality. AEs is a chronic-degenerative disease initiated by the dysfunction of the endothelial layer, leading to the accumulation and retention of low-density lipoproteins containing cholesterol in the subendothelial space due to a complex interaction between activated leukocytes (monocytes, macrophages, and T cells) and the inflamed endothelium (Bergheanu, Bodde, & Jukema, 2017). This phenomenon progresses through the formation of atheroma plaques in the arterial intima, often significantly compromising the lumen of the blood vessel, leading to ischemic events and even total artery occlusion or plaque rupture, resulting in arterial diseases such as myocardial infarction or ischemic stroke. Current treatments are based on the systemic administration of statins to lower blood cholesterol levels; however, these compounds have severe off-target effects and low efficacy at tolerated doses. Additionally, there is no specific diagnostic method for the disease (Almeida & Budoff, 2019).

This doctoral thesis develops the design, production, and physicochemical and biological evaluation of two types of biomimetic nanosystems (Soprano, Alvarez, Pelaz, del Pino, & Polo, 2020) based on extracts of murine macrophage cell membranes (Figure 1), which play a key role in the development of AEs. The first nanosystem consists of a nanovesicle structure in which the drug pravastatin is encapsulated, taking advantage of the protection provided by the biomimetic nanocarrier and exploiting the targeting capability provided by the cell membrane receptors expressed by the cells, which maintain their orientation and functionality after the vesicle formation process. The other nanosystems developed, being more complex by adding a contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI) diagnostics, consist of nanocores formed by PLGA polymer nanoparticles (NPs) loaded with superparamagnetic magnetite NPs and a statin family

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

drug (pravastatin/atorvastatin), and this nanocore is coated with a cell membrane corona also extracted from murine macrophages (RAW 264.7) with the aim of generating a biomimetic theragnostic platform for the simultaneous diagnosis and therapy of AEs.

In this work, it was demonstrated that both types of proposed nanosystems exhibit promising properties as nanovehicle drug carriers, showing i) active targeting to vascular endothelial cells, ii) diagnostic capabilities, and iii) therapeutic capabilities to reduce endothelial inflammation levels related to the initiation and progression of atherosclerotic plaque formation.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS I

PRÓLOGO IV

RESUMEN/ ABSTRACT VII

CONTENIDO X

LISTA DE FIGURAS XVI

LISTA DE TABLAS XXII

LISTA DE ABREVIACIONES XXIV

ANTECEDENTES 2

1.1. Biomimetismo 2

1.1.1. Niveles de Organización del Biomimetismo 2

1.1.2. Aplicaciones del Biomimetismo 3

1.2. Biomimetismo y Nanotecnología 4

1.2.1. Aplicaciones del Biomimetismo en la Nanotecnología 5

1.2.1.1. Nanosensores 5

1.2.1.2. Generación de Energía 6

1.2.1.3. Industria Textil 7

1.2.1.4. Biomedicina 8

1.3. Nanotecnología y Biomedicina 9

1.4. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos 11

1.4.1. Tipos de Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos Basados en Nanotecnología 12

1.4.2. Clasificación de las Nanopartículas 12

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2.1. Nanopartículas Inorgánicas 13
1.4.2.1.a. Nanopartículas de Oro 13
1.4.2.1.b Nanopartículas de Óxidos de Hierro 14
1.4.2.1.c. Nanopartículas de Sílice 15
1.4.2.1.d. Nanotubos de Carbono 16
1.4.2.2. Nanopartículas Orgánicas 17
1.4.2.2.a. Micelas 17
1.4.2.2.b Liposomas 18
1.4.2.2.c. Nanopartículas Poliméricas 19
1.4.3. Propiedades y Limitaciones de los Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos 20
1.4.4. Estabilidad y Funcionalización 22
1.4.4.1. Modificación de la Morfología de las Nanopartículas 22
1.4.4.2. Modificación de las Propiedades Superficiales de las Nanopartículas 23
1.4.4.3. Recubrimiento de las Nanopartículas 23
1.4.5. Direccionamiento Pasivo y Activo 24
1.4.6. Barreras Biológicas 25
1.4.6.1 Interacciones con el Sistema Inmune 25
1.4.6.2. Interacciones con Células y Tráfico Intracelular 26
1.5. Nanosistemas Biomiméticos Derivados de Membrana Celular 27
1.5.1. Nanovesículas de Membrana Celular 28
1.5.2. Nanopartículas Recubiertas con Membrana Celular 29
1.5.2.1. Nanopartículas Recubiertas con Membrana Eritrocitaria 29
1.5.2.2. Células Tumorales 30
1.5.2.3. Plaquetas 32

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.2.4. Células Inmunitarias 33

1.6. Obtención de Nanovesículas y Nanopartículas Recubiertas a Partir de Membrana Celular 34

1.6.1. Extrusión 35

1.6.2. Sonicación 35

1.7. Aplicaciones de las Nanopartículas Cubiertas con Membrana Celular 36

1.7.1. Alzheimer 36

1.7.2. Cáncer 37

1.8. Aterosclerosis 39

1.8.1. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos Para el Tratamiento de la Aterosclerosis 42

1.8.2. Nanopartículas Para el Diagnóstico de la Aterosclerosis 44

1.8.3. Nanopartículas para el Tratamiento de la Aterosclerosis 45

1.8.4. Nanopartículas para la Teragnóstica de la Aterosclerosis 46

1.8.5. Nanopartículas Biomiméticas para el Tratamiento de la Aterosclerosis 47

1.9. Retos de las Nanopartículas Cubiertas con Membrana Celular 49

OBJETIVOS 51

MATERIALES Y MÉTODOS 57

2.1 Materiales 57

2.2. Métodos 59

2.2.1. Cultivo de Macrófagos RAW 264.7 59

2.2.2. Síntesis y Caracterización de Nanovesículas de Macrófagos RAW 264.7 59

2.2.2.1. Síntesis de Nanovesículas 59

2.2.2.2. Caracterización Físico-Química de las Nanovesículas Biomiméticas 60

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.2.2.a. Dispersión de Luz Dinámica 60
2.2.2.2.b. Potencial ζ 61
2.2.2.2.c. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas 61
2.2.2.2.d. Microscopía Electrónica de Transmisión 62
2.2.2.2.e. Cuantificación de Proteínas 62
2.2.2.2.f. Determinación del Receptor CD 49d 62
2.2.3. Nanovesículas Biomiméticas Cargadas con Pravastatina 63
2.2.3.1. Síntesis de Nanovesículas Biomiméticas Cargadas con Pravastatina 63
2.2.3.2. Cuantificación de Pravastatina Encapsulada en las Nanovesículas Biomiméticas 63
2.2.3.3. Análisis de Liberación de Pravastatina 64
2.2.3.4. Ensayos de Estabilidad Coloidal 65
2.2.3.5. Caracterización Biológica 65
2.2.3.5.a. Viabilidad Celular 65
2.2.3.5.b. Internalización Celular 66
2.2.3.5.c. Generación de Especies Reactivas de -Oxígeno 67
2.2.3.5.d. Liberación de Colesterol 68
2.2.3.5.e. Cuantificación de IL-1β en Macrófagos RAW 264.7 69
2.2.4. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita 69
2.2.4.1. Síntesis de las Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita 69
2.2.4.2. Caracterización de Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita 70
2.2.4.2.a. Microscopía Electrónica de Transmisión 70
2.2.4.2.b. Difracción de Rayos X 70

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.4.2.c. Susceptibilidad Magnética 73

2.2.4.2.d. Medidas de Relajación Magnética 73

2.2.5. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de PLGA Cargadas con PARA/ATOR y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular de Macrófagos RAW 264.7 74

2.2.5.1. Síntesis de Nanopartículas de PLGA Cargadas con Pravastatina y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular 74

2.2.5.2. Síntesis Nanopartículas de PLGA Cargadas con Atorvastatina y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular 75

2.2.5.3. Caracterización de NPs PLGA + PRA/ATOR + SPIONS + NVs 76

2.2.5.3.a. Susceptibilidad Magnética 76

2.2.5.3.b. Cuantificación de Fe_3O_4 en NPs PLGA + PRA/ATOR + NVs .. 76

2.2.5.3.c. Microscopía Electrónica de Barrido 76

2.2.5.3.d. Microscopía Electrónica de Transmisión 77

2.2.5.3.e. Cuantificación de Pravastatina/Atorvastatina en las Nanopartículas Biomiméticas 77

2.2.5.3.f. Análisis de la Liberación de Pravastatina 77

2.2.5.3.g. Viabilidad Celular 78

2.2.5.3.h. Liberación de Colesterol de Nanopartículas Biomiméticas 78

2.2.6. Ensayos en Cultivos Celulares Dinámicos: Dispositivos de Microfluídica 79

2.2.6.1. Determinación de las Condiciones Hemodinámicas 79

2.2.6.2. Determinación de la Concentración Celular Inicial 80

2.2.6.3. Evaluación de la Expresión de VCAM-1 81

CAPÍTULO 3 84

3.1. Nanovesículas de Macrófagos como Sistema de Encapsulación de Fármacos 84

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.1. Diseño y Caracterización de Nanovesículas 87

3.1.2. Citocompatibilidad de las NVs 92

3.2.1. Obtención y Caracterización de NVs Cargadas con la Pravastatina ... 94

3.2.2. Evaluación de la estabilidad coloidal de NVs cargadas con Pravastatina 100

3.2.3. Evaluación in vitro de la biocompatibilidad de las Nanovesículas cargadas 102

3.2.4. Internalización Celular de las Nanovesículas 103

CAPÍTULO 4 117

4.1. Nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7 117

4.1.1. Síntesis y Caracterización de SPIONS por Descomposición Térmica 121

4.1.2. Optimización del Recubrimiento de las Nanopartículas de PLGA con Membrana Celular 126

4.1.3. Síntesis y Caracterización de las Nanoplataformas Biomiméticas Formadas por Núcleos de PLGA Cargados con Estatina y SPIONS y Recubiertos con Membrana Celular de Macrófagos 128

CAPÍTULO 5 145

5.1. Plataformas *In-Vitro* Para la Validación de la Acción Terapéutica de Nanoplataformas 145

5.1.1. Determinación de las Condiciones de Esfuerzos de Cizalla 146

5.1.2. Optimización de la Concentración Inicial Celular 148

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS 159

REFERENCIAS 162

PERMISOS DE REPRODUCCIÓN DE FIGURAS 195

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del velcro imagen obtenida de la referencia (Hapsari et al., 2022). 4

Figura 2. Sensores electrónicos basados en piel humana (Park et al., 2014). 6

Figura 3. Nanohojas biomiméticas para la obtención de energía (B. Chen et al., 2019). 7

Figura 4. Imágenes de la superficie de la hoja de la flor de loto (J. Zhang et al., 2009). 8

Figura 5. Hidrogeles inyectables para la regeneración de tejido (M. Liu et al., 2017). 9

Figura 6. Nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos (R. Liu et al., 2023). 12

Figura 7. Obtención de nanopartículas biomiméticas (L. Chen et al., 2021). 28

Figura 8. Preparación y aplicación de nanopartículas cubiertas con membrana celular de eritrocito (Hao et al., 2022). 30

Figura 9. Nanopartículas cubiertas con membrana celular de células cancerosas (Raza et al., 2021)..... 31

Figura 10. Preparación de nanopartículas cubiertas con membrana de plaquetas (Kunde & Wairkar, 2021). 33

Figura 11. Aplicaciones de nanopartículas cubiertas con membrana celular de células inmunitarias (D. Wang et al., 2022). 34

Figura 12. Mecanismo de acción de las estatinas (Sultan et al., 2019) 41

Figura 13. Nanomateriales para el tratamiento y diagnóstico de la aterosclerosis (J. Chen et al., 2021)..... 42

Figura 14. Proceso de síntesis de las nanovesículas de macrófagos RAW 264.7. 60

Figura 15. Esquema Representativo del Chip de Microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. 79

Figura 16. Esquema representativo de las NVs cargadas con PRA..... 86

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 17. Optimización del número de extrusiones. A) Evolución del diámetro hidrodinámico de las NVs con el número de extrusiones aplicado. B) Distribución de tamaños de las NVs antes y después de las diez extrusiones. C) Distribución de tamaño obtenidas por NTA de las NVs obtenidas a partir de $20x10^6$ células iniciales. D) Micrografía TEM de las NVs obtenidas (escala 100 nm). 88

Figura 18. A) Imagen TEM de NV obtenida a partir de macrófagos RAW 264.7 (Bicapa lipídica indicada con una flecha), B) Cuantificación de proteínas de células RAW 264.7 completas y NVs obtenidas a partir de 20x106 células. 90

Figura 19. Citometría de flujo de A) Macrófagos RAW 264.7marcados con anticuerpo CD 49d. B) NVs solas. C) NVs marcadas con anticuerpo anti CD49d. Diagramas de densidad de dispersión lateral (SSC) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a nm (canal FITC-A). 91

Figura 20. Ensayos de viabilidad celular de NVs tras A) 24 h y B) 48 h de incubación, C) Generación de ROS tras la administración de diferentes concentraciones de NVs en líneas celulares RAW 264.7, Balb/c 3t3 y endoteliales de aorta de rata. 93

Figura 21. Distribución de tamaños de NVs y NVs + PRA antes y después del proceso de dialisis. 96

Figura 22. Micrografías TEM de NVs solas A) y NVs + PRA B). 98

Figura 23. A) Cinética de liberación de NVs + PRA. B) Ajuste matemático con el modelo de Weibull. 99

Figura 24. Estabilidad de NVs + PRA en agua, tampón PBS 7.4 y DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS. A) Diámetro hidrodinámico. B) Índice de polidispersidad. C) Distribución de tamaños de las NVs cargadas en los distintos medios a varios instantes de tiempos de incubación. 102

Figura 25. Ensayos de viabilidad celular de NVs cargadas con PRA tras A) 24 h y B) 48h de incubación. 103

Figura 26. Intensidad de fluorescencia media derivadas de las imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA y marcadas fluorescentemente con DOPE-ATTO 488 tras 3 y 6 h de exposición, respectivamente, en células A) Balb/c 3T3, B) HeLa, C) RAW 264.7, y D) adMSC. 105

Figura 27. Imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA en fibroblastos murinos Balb/c 3T3 y células de cáncer cérvico uterino HeLa tras 3 y 6 h de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incubación. El canal azul muestra el núcleo celular teñido con DAPI (λ_{ex}: 355 nm); en rojo se muestran los filamentos de actina (λ_{ex}: 650 nm), en el canal verde se muestran las NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488 (λ_{ex}: 502 nm), y en la columna final la imagen con todos los canales superpuestos. 106

Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA en macrófagos RAW 264.7 y células mesenquimales adiposas tras 3 y 6 h de incubación. El canal azul muestra el núcleo celular teñido con DAPI (λ_{ex}: 355 nm); en rojo se muestran los filamentos de actina (λ_{ex}: 650 nm), en el canal verde se muestran las NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488 (λ_{ex}: 502 nm), y en la columna final la imagen con todos los canales superpuestos. 107

Figura 29. Análisis de citometría de flujo de células tratadas con NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488. Las células en ausencia de la nanoplataforma se emplearon como control negativo. Diagramas de densidad de dispersión lateral (SSC) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm (canal FITC-A). Balb/c 3T3 3 h (A) 6 h (B), HeLa 3 h (D) 6 h (E), RAW 264.7 3 h (G) 6 h (H), MSC 3 h (J) 6 h (K). Valores de MFI de Balb/c 3T3 (C), HeLa (F), RAW 264.7 (I) y adMSCs (L)..... 109

Figura 30. Generación de ROS de NVs cargadas con PRA tras 24 h de exposición en las líneas celulares: A) Fibroblastos Balb/c 3t3, B) cáncer cérvico-uterino humano, HeLa, C) macrófagos murinos RAW 264.7, D) células madre mesenquimales de tejido adiposo. 111

Figura 31. A) Eflujo de colesterol de células espumosas tras 24 h de exposición de NVs + PRA. B) Cuantificación de IL-1β en macrófagos RAW 264.7. 112

Figura 32. Representación esquemática de nanosistemas biomiméticos desarrollados basados en NPs de PLGA cargadas con SPIONS y la estatina (PRA o ATOR) como nanonúcleos funcionalizados con un recubrimiento de membrana celular proveniente de macrófagos RAW 264.7. 119

Figura 33. Caracterización de SPIONS. A) Patrón de difracción de rayos X. B) Ajuste matemático de Williamson-Hall. C) Histéresis magnética. D) Micrografías de TEM (Escala 50 nm). 122

Figura 34. Ajuste lineal de las tasas de relajación transversal frente a concentración de SPIONS. 126

USC
DE COMPOSTELA

Figura 35. Optimización del recubrimiento de los nanonúcleos de PLGA con la membrana celular de macrófagos RAW 264.7 a distintas razones PLGA: NVs. A) Diámetros hidrodinámicos, B) Distribución de tamaños. 127

Figura 37. Distribución de tamaños de NPs de PLGA cargadas con SPIONs y la estatina, y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. 132

Figura 38. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de: nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escalas de A) 300 nm, B) 200 nm, C) y 100 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de D) 300 nm, E) 200 nm, y F) 100 nm)..... 133

Figura 38. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas. Escala de (A) 50 nm y B) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de (E) 100 nm y (F) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas. Escala de (C) 50 nm y (D) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de (G) 100 nm y (H) 200 nm. 134

Figura 39. Ciclos de histéresis magnética a 300 K. A) SPIONS. B) Nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. C) Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular 135

Figura 40. Imagen por resonancia magnética (MRI) de phantoms de agarosa con SPIONS libres A) 0.5 mg/mL, B) 0.25 mg/mL, C) 0.125 mg/mL; NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs D) 0.5 mg/mL, E) 0.25 mg/mL, F) 0.125 mg/mL; NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs G) 0.5 mg/mL, H) 0.25 mg/mL, I) 0.125 mg/mL; Control J)..... 137

Figura 41. Cinética de liberación de la estatina PRA desde el interior de NVs y NPs corazón@coraza de PLGA + SPIONS recubiertas con membrana celular. A) Perfiles de liberación. B) Ajuste de Weibull del perfil de liberación de NVs + PRA. C) Ajuste de Weibull del perfil de liberación de NPs corazón@coraza de PLGA + SPIONS recubiertas con membrana celular. 139

Figura 42. Ensayos de viabilidad celular a 24 h de Exposición. A) NPs PLGA + PRA + SPIONS + NVs. B) NPs PLGA + ATOR + SPIONS + NVs. 140

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 43. Liberación de colesterol tras 24 h de exposición. 141
Figura 44. Esquema Representativo del Chip de Microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. 147
Figura 45. Representación de la presión aplicada (mbar) frente al flujo (mL/ min) en el chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. 148
Figura 46. Imágenes de microscopía óptica de células endoteliales de aorta de rata ($4x10^5$ células/mL) sembradas en el seno del chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. Células recién sembradas, A) 10X y F) 20X; después de 1 h, B) 10X y G) 20X; después de 24 h, C) 10X y H) 20X; después de 48 h D) 10X y I) 20X; y después de 72 h E) 10X y J) 20X de incubación. 150
Figura 47. Imágenes de células endoteliales (8x105 células/mL) sembradas en el chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. Células recién sembradas, A) 10X y B) 20X; y tras 24 h de incubación, C) 10X y D) 20X. 151
Figura 48. Imágenes de microscopía confocal de: Células endoteliales sanas, A) 20X, B) 93X; células inflamadas con LPS en ausencia de NVs, C) 20X, D) 93X; en presencia de NVs vacías, E) 20X, F) 93X; células con PRA libre (100 nM), G) 20X, H) 93X; células con ATOR libre (100 nM), I) 20X, J) 93X; células con NVs + PRA (100 nM), K) 20X, L) 93X; células con NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs, M) 20X, N) 93X; células con NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs, O) 20x, P)93X. 155
Figura 49. Intensidad de fluorescencia media de las Imágenes de confocal. A) 20X, B) 93X. 156

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, PDI, potencial ζ y. concentración de las NVs obtenidas. 89

Tabla 2. % de Eficiencia de encapsulación, % de carga, y masa de fármaco encapsulada a partir de los diferentes masas de PRA añadidas inicialmente durante el proceso sintético de las NVs. 95

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ de NVs y NVs + PRA antes y después del proceso de diálisis. 97

Tabla 4. Valores de los inversos de los tiempos de relajación transversal de las SPIONs. 125

Tabla 5. Optimización de la carga de PRA y ATOR en NPs de PLGA. 129

Tabla 6. Optimización de la carga de SPIONS en NPs de PLGA 130

Tabla 7. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial □ de NPs de PLGA recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. 132

Tabla 8. Valores de campo coercitivo (HC), magnetización de saturación (MS) y magnetización remanente (MR) a una temperatura de 300 K. 136

Tabla 9. Coeficientes de relajación (r2) de SPIONS y NPs Biomiméticas. 137

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIACIONES

adMSC	Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo
AEs	Aterosclerosis
ATOR	Atorvastatina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenillindol
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DOPE	1, 2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
ECs	Enfermedades Cardiovasculares
FITC	Isotiocianato Fluorescente
HDL	High Density Lipoprotein
HeLa	Henrrieta Lacks
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
MFI	Intensidad de Fluorescencia Media
MR	Magnetización Remanente
MRI	Imagenología por Resonancia Magnética
MS	Magnetización de Saturación
MSC	Célula Mesenquimal
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
NTA	Ensayo de Seguimiento de Nanopartículas
NVs	Nanovesículas
oxLDL	Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidadas
PBS	Solución Salina de Buffer Fosfato
PDI	Índice de Polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido Poliláctico-co-glicólico
PRA	Pravastatina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SMC	Células de Músculo Liso
SPIONS	Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Hierro
SSC	Dispersión Lateral
TCR	Transporte de Colesterol Reverso
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular- 1
XRD	Difracción de Rayos X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANTECEDENTES

1.1. Biomimetismo

La palabra biomimetismo proviene de las palabras griegas “bios” (vida) y “mimesis” (imitar). Este concepto se basa en la idea de que muchos de los problemas que tenemos en la actualidad, la naturaleza ha sido capaz de solucionarlos a lo largo de millones de años de evolución, de los cuales se puede aprender en gran medida mediante la observación, compresión y emulación de los mecanismos que la naturaleza ha desarrollado (Ahamed, Wang, & Hazell, 2022).

1.1.1. Niveles de Organización del Biomimetismo

El biomimetismo se puede organizar en tres niveles distintos para facilitar su compresión y su aplicación. El primer nivel hace referencia a la forma, en el que se trata de replicar la apariencia o el comportamiento de los organismos vivos para abordar desafíos o diseñar nuevas soluciones (Kennedy, 2017).

El segundo nivel hace referencia al comportamiento de un organismo. En este punto, la inspiración va más allá de la mera imitación superficial de la naturaleza, sino también de comprender y aplicar los principios de diseño y funcionamiento encontrados en ella. Así, se busca entender por qué y cómo ciertos organismos han evolucionado de determinadas maneras para, posteriormente, aplicar esos principios en la ingeniería y el diseño. Un ejemplo de esto es el mecanismo de refrigeración utilizado por las termitas en sus nidos, ya que aun estando en el desierto, estos insectos son capaces de mantener temperaturas bajas dentro de su nido mediante un sistema de bolsas de aire distribuidas a lo largo de aquel que permite el flujo de aire. El análisis de este diseño natural inspiró la construcción del Eastgate Centre en Zimbawe, una plaza comercial y oficinas que se enfría

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

utilizando el aire exterior. Este edificio solo emplea un 10% de la energía consumida en sistemas de enfriamiento en comparación a otros edificios de dimensiones similares (Jamei & Vrcelj, 2021).

El tercer nivel de biomimetismo hace referencia al ecosistema: La inspiración proviene de la observación y compresión de sistemas y patrones en la naturaleza a nivel sistémico. Como consecuencia, se busca emular la resiliencia, sostenibilidad y la eficiencia presentes en un ecosistema natural. Un ejemplo de este nivel es, por ejemplo, el techo verde del museo de la Academia de Ciencias en California, que fue diseñado por el arquitecto Renzo Piano y consiste en un techo verde ondulado que imita las líneas inclinadas del paisaje de los alrededores. Así mismo, el edificio es un logro de construcción ecológica debido a que utiliza estrategias de eficiencia energética, iluminación natural, biocombustibles y recuperación de agua (Othmani et al., 2022).

1.1.2. Aplicaciones del Biomimetismo

Otro ejemplo de biomimetismo es el desarrollo de los trenes bala en Japón. Estos trenes capaces de alcanzar velocidades de hasta 270 km/h, se enfrentaron a la problemática de que, al cruzar un túnel, se generaba una onda de choque que producía un ruido que se podía escuchar hasta 400 m de distancia, causando incomodidad y molestias a los residentes cercanos. Con este problema y con una pasión por las aves, el ingeniero Eiji Nakatsu se puso a observar al martín pescador y se percató que estas aves mínimamente salpicaban el agua al introducirse en ella. Esto es debido a la forma aerodinámica del pico, que consta de un cono largo y angosto; el pico se abre y permite que el agua pase sin crear una onda de compresión debajo de la superficie. De igual forma, la punta fina del pico cónico del ave presenta una reducida área superficial al entrar en el agua mientras que la sección transversal se amplía uniformemente permitiendo el flujo del agua de manera más suave. Basándose en este comportamiento, el ingeniero japonés logró rediseñar los trenes para eliminar el ruido generado al atravesar los túneles, además de que los trenes se volvieron más eficientes requiriendo un 15% menos de energía, inclusive a velocidades mayores que a las mencionadas (Sreeramagiri, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Otro ejemplo de la aplicación del biomimetismo es el velcro, que fue inventado por el ingeniero suizo George de Mestral en la década de 1940. Su inspiración provino tras un paseo por el campo ya que al regresar notó que su ropa y en el pelaje de su perro estaban cubiertos de pequeños brotes de bardana, una planta con semillas espinosas. Intrigado por esto, decidió examinarlas en el microscopio descubriendo, así, que las semillas tenían unos pequeños ganchos que les permitían adherirse fácilmente a cualquier superficie lo suficientemente áspera, como la de la tela o el pelaje del animal (Figura 1). De esta forma fue como surgió el velcro, cuyo nombre es una combinación de palabras "velvet" (terciopelo) y "crochet" (gancho en francés), y que consiste en dos tiras de tela con pequeños ganchos y otra con pequeños bucles que se adhieren entre sí cuando se presionan entre ellas. Gracias a su practicidad y aplicabilidad, el velcro se volvió una solución en el cierre de ropa, zapatos y una variedad de productos (Hapsari, Purwaningsih, Azzahra, & Sari, 2022).



Figura 1. Esquema del velcro imagen obtenida de la referencia (Hapsari et al., 2022).

1.2. Biomimetismo y Nanotecnología

Los principios del biomimetismo también han sido extrapolados a la nanotecnología ya que aquel nos permite aprovechar soluciones a problemas presentes en la naturaleza, y la nanotecnología nos permite manipular la materia a una escala nanométrica (10^{-9} m). Existe una relación estrecha entre la nanotecnología y el biomimetismo gracias a que todos los sistemas biológicos están compuestos por unidades que son observables a escala nanométrica, y la biología inspira la creación de nuevos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dispositivos y sistemas para mejorar las capacidades de la tecnología existente. Por este motivo, la integración de nanotecnología y biomimetismo resulta esencial para la mejora de la ciencia y la tecnología (Himel, Sikder, Ahmed, & Choudhury, 2022).

1.2.1. Aplicaciones del Biomimetismo en la Nanotecnología

El biomimetismo en la nanotecnología representa un enfoque innovador que busca inspiración en la naturaleza para desarrollar tecnologías a escala nanométrica. Este campo emergente se nutre de los patrones, procesos y estructuras presentes en organismos vivos, aprovechando la eficiencia y perfección que la evolución ha logrado a lo largo de millones de años. Al imitar la arquitectura molecular y las funciones biológicas a nivel nanométrico, los científicos buscan crear materiales y dispositivos con propiedades excepcionales. El biomimetismo en la nanotecnología no solo persigue la mejora de la funcionalidad de productos y materiales, sino que también busca contribuir a la sostenibilidad ambiental al tomar prestados principios y estrategias de la naturaleza (Himel et al., 2022).

1.2.1.1. Nanosensores

Un primer ejemplo de biomimetismo aplicado en la nanotecnología es el desarrollo de nanosensores. Estos tienen aplicación en distintas áreas de la industria y la ciencia, y su funcionamiento se puede resumir en los siguientes pasos/procesos: 1) unión, 2) generación de señal y 3) procesamiento de esta. La principal ventaja que presentan los sensores a escala nanométrica en comparación a su contraparte macroscópica es el incremento de su sensibilidad y especificidad, menor coste, y mejores tiempos de respuesta gracias a la reducción del tamaño. Un ejemplo son los sensores táctiles portátiles que pueden recibir información mediante contacto físico, con aplicaciones en robótica, medicina y electrónica (Figura 2) (Park et al., 2014). Estos dispositivos han sido desarrollados tomando la inspiración en los sistemas táctiles biológicos. Actualmente, su principal desafío es el de poder imitar los receptores de la piel humana: Recibir y procesar

estímulos físicos y convertirlos en señales eléctricas (Munawar et al., 2019; Rasson, Poncelet, Mouchet, Deparis, & Francis, 2017).

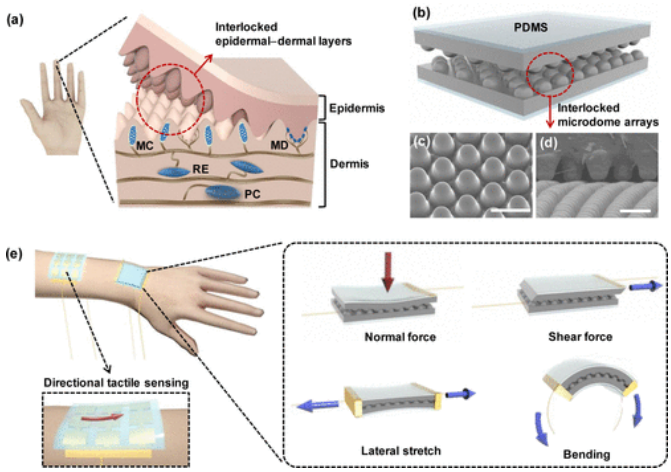


Figura 2. Sensores electrónicos basados en piel humana (Park et al., 2014).

1.2.1.2. Generación de Energía

La energía es algo indispensable para la humanidad, y se estima que para el año 2050 la demanda energética alcance los 40.8 TW (Lewis & Nocera, 2006). La principal fuente de obtención de energía es a través de combustibles fósiles (alrededor del 80% de la producción mundial). Sin embargo, debido a los problemas ambientales y de salud que se pueden generar como consecuencia de los niveles de producción y consumo energético a partir de los combustibles fósiles en las últimas dos décadas se ha fortalecido el desarrollo de otras fuentes de energía alternativas, de carácter renovable como energía solar, la eólica o la undimotriz. En este sentido, la naturaleza ofrece diversos ejemplos de cómo aprovechar eficientemente la energía procedente de estas fuentes renovables.

Las plantas pueden convertir la energía solar en azúcares simples mediante el proceso de la fotosíntesis. Por ejemplo, las células de las plantas pueden ser una fuente de inspiración para la generación de energía gracias a que sus hojas cuentan con la capacidad de mover el agua desde las raíces hasta las hojas mediante un proceso denominado transpiración. Este flujo de agua permite eliminar el calor del agua y generar

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

energía eléctrica en el proceso. (Kumar, Ajay, & Reddy, 2014). Un ejemplo de esto es el desarrollo de las nanohojas, que están formadas por dos caras: una de ellas convierte la energía de la luz del sol en energía, mientras que en la otra cara están presentes membranas delgadas termo-voltaicas que transforman el calor de la energía solar en electricidad. De esta forma, se puede obtener energía cuando la luz del sol irradia las nanohojas (Figura 3) (B. Chen et al., 2019)

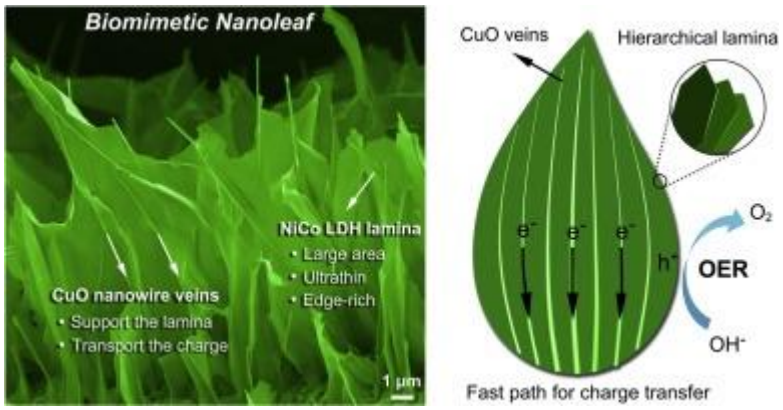


Figura 3. Nanohojas biomiméticas para la obtención de energía (B. Chen et al., 2019).

1.2.1.3. Industria Textil

La industria textil también ha sido también objeto de diversos desarrollos nanotecnológicos, ofreciendo nuevas posibilidades en términos de rendimiento, funcionalidad y diseño de tejidos. Así, en la naturaleza existen elementos que presentan hidrofobicidad, propiedades de autolimpieza, color estructural, y/o mejor calidad de tejidos. Todo esto ha permitido el desarrollo de textiles más sofisticados con rendimientos y funcionalidades mejoradas. Uno de los ejemplos más comunes en relación con la hidrofobicidad es la flor de loto (Figura 4). Gracias a su ángulo de contacto mayor a los 150° es prácticamente imposible que sus hojas se mojen, permitiendo que las gotas formadas rueden fuera de la flor arrastrando polvo y suciedad en su camino manteniendo, así, a las flores secas y libre de patógenos. Este proceso natural sirvió de inspiración en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

desarrollo de prendas con un recubrimiento nanoestructurado que imitase los patrones de la superficie de las hojas de la planta para lograr imitar su superhidrofobicidad (J. Zhang, Sheng, & Jiang, 2009).

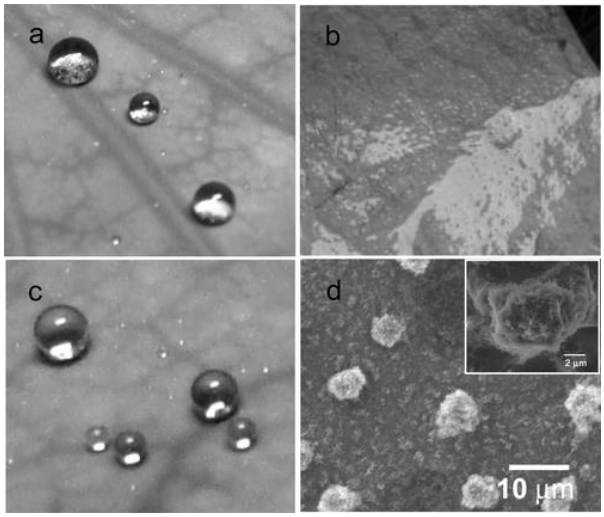


Figura 4. Imágenes de la superficie de la hoja de la flor de loto (J. Zhang et al., 2009).

1.2.1.4. Biomedicina

Otra de las ramas de la industria y la ciencia que han sabido aprovechar tanto la conjunción de biomimetismo y la nanotecnología ha sido la biomedicina, por ejemplo, mediante el empleo de NPs como agentes de liberación controlada de fármacos, sistemas de diagnóstico, ingeniería de tejidos, etc. También, la ingeniería de tejidos es una rama de la biomedicina que se ha inspirado en la naturaleza para desarrollar sistemas para crear nuevos tejidos o ayudar a la regeneración de los existentes. Un ejemplo es el desarrollo de tejido óseo, el cual se inspira en el uso de andamios poliméricos o híbridos que permitan el crecimiento celular reproduciendo la estructura porosa de los huesos. Estos andamios deben de tener poros de tamaño adecuado con interconexiones entre ellos para permitir la infiltración y migración celular, la vascularización, el flujo de nutrientes y oxígeno, y la eliminación de desechos, además de tolerar el estrés mecánico del propio

UCC UNIVERSIDADE

tejido. Una de las propuestas actuales es el uso de hidrogeles a base de colágeno como andamiaje para el desarrollo de este tejido óseo, ya que el colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano además de presentar un inmunogenicidad prácticamente nula. Así, se han desarrollado hidrogeles variando, por ejemplo, la relación de distintos tipos de colágeno con el objeto de modular la cantidad y tamaño de los poros presentes en su estructura de cara a favorecer el crecimiento y diferenciación celular a osteoblastos (Figura 5) (M. Liu et al., 2017).

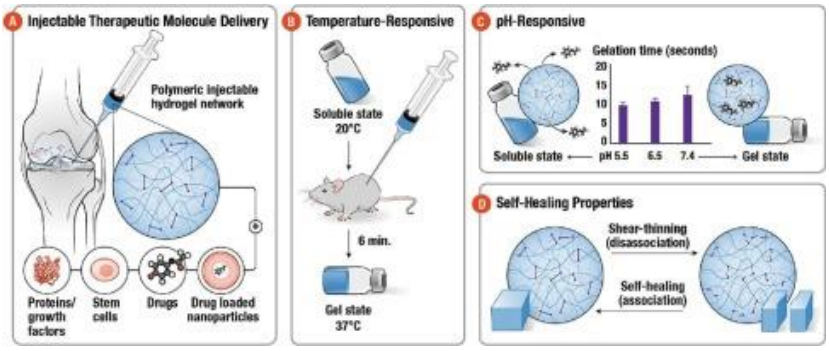


Figura 5. Hidrogeles inyectables para la regeneración de tejido (M. Liu et al., 2017).

1.3. Nanotecnología y Biomedicina

Una nanopartícula se puede definir como una partícula con dimensiones en el rango de 1 a 100 nm. Esta reducción de tamaño les confiere propiedades únicas en comparación con sus contrapartes a mayor escala (Pearce, Wilks, Arno, & O'Reilly, 2021). El material de origen de las NPs puede ser de distintas naturalezas, pudiendo ser estos de origen orgánico (polímeros, carbono), inorgánico (metales, óxidos, cerámicas, etc) o biológico (material génico, proteínas, cápsides víricas, vesículas extracelulares, etc). La capacidad que tienen las NPs de ser manipuladas y de exhibir propiedades específicas las ha convertido en sistemas versátiles y de gran interés en distintas ramas de la ciencia y de la industria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Así, esta parte de la nanotecnología ha transformado a la biomedicina contribuyendo a importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Algunas de las aplicaciones más relevantes son, por ejemplo, la detección temprana de enfermedades mediante sensores basados en NPs, permitiendo la identificación precisa de biomarcadores (Nikzamir, Akbarzadeh, & Panahi, 2021). También, se han desarrollado agentes de contraste en forma de NPs que mejoran la visualización de tejidos y órganos a través de técnicas de bioimagen como resonancias magnéticas, tomografías, rayos X, entre otras, permitiendo tener una mayor resolución y sensibilidad. Esto facilita la detección temprana de patologías y la monitorización precisa de la respuesta a tratamientos. En el ámbito de la regeneración de tejidos, la nanotecnología contribuye con el desarrollo de andamios tridimensionales que facilitan la reparación de lesiones y heridas, esto gracias a su capacidad de modular la respuesta celular y la liberación controlada de factores de crecimiento permitiendo así promover la regeneración tisular (Khan, Khan, Cho, & Khan, 2020). La nanorobótica médica es otra frontera prometedora, implicando el diseño y construcción de nanodispositivos nano y miroparticulados para tareas moleculares específicas, como, por ejemplo, nanocatalizadores o para la eliminación selectiva de células cancerosas. Así mismo, otros dispositivos nanotecnológicos permiten el monitoreo continuo de parámetros biológicos, ofreciendo información en tiempo real para un mejor control de las condiciones fisiológicas. Todas estas aplicaciones muestran el potencial transformador de la nanotecnología en la biomedicina, proporcionando enfoques más precisos y personalizados (Jin, Wang, Oppong-Gyebi, & Hu, 2020).

En particular, las NPs han surgido como un prometedor método de administración controlada y específica de fármacos gracias a su capacidad para atravesar barreras biológicas, así como de evadir el sistema inmunológico, evitando una degradación prematura de los agentes terapéuticos, facilitando la entrega de agentes terapéuticos de manera específica y minimizando, así, los efectos secundarios adversos en comparación con las aplicaciones farmacológicas sistémicas. Este enfoque direccionado se traduce en una optimización de la eficacia terapéutica y una reducción de la toxicidad asociada (Jian, Hui, & Lau, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos

"El principal objetivo de un sistema de liberación controlada de fármaco es liberar un fármaco en el momento adecuado, en la cantidad óptima de concentración para realizar su actividad terapéutica y en un sitio específico" (Shanti Bheemidi, 2011). Con esto en mente, un sistema de liberación controlada de fármacos se puede definir como un sistema de administración diseñado para liberar un fármaco de manera controlada en términos de tiempo, lugar y concentración con el objetivo de maximizar su eficacia terapéutica y minimizar los potenciales efectos secundarios adversos. Estos sistemas están formulados para mantener niveles óptimos del fármaco en el cuerpo durante un período prolongado a través de una dosificación más precisa y mejorando la comodidad del paciente. Además, buscan mantener la integridad del fármaco al evitar su degradación prematura, ajustar su farmacocinética y la biodistribución, y optimizar su entrega en tejidos/células específicos. Al mismo tiempo, intentan evitar su acumulación fuera de los sitios objetivo, como se comentó con anterioridad. Para brindar perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos individualizados, un sistema de administración de fármacos eficaz debe tener las siguientes características adicionales: 1) una alta eficiencia de carga con biodisponibilidad aceptable, que permita la administración de dosis suficientes del fármaco para lograr los efectos terapéuticos deseados; 2) sistema con tiempos de circulación adecuados, con baja inmunogenicidad, y que protege a los medicamentos de una eliminación rápida proporcionando el tiempo suficiente para que lleguen a los tejidos diana; y 3) deben de apuntar con precisión a los sitios de la enfermedad, lo que conlleva una mejora de las actividades terapéuticas y reduce los efectos secundarios (Laffleur & Keckeis, 2020).

En los últimos años se han producido significantes avances en el desarrollo de los sistemas de liberación de fármacos, lo que ha permitido asegurar que los medicamentos lleguen a la zona del organismo deseado (T. Sahu et al., 2021). Para lograr este objetivo, se emplean nanotransportadores principalmente en la forma de NPs, que son sustancias fundamentales para la entrega y efectividad de los compuestos bioactivos. Entre estos se encuentran una variedad de sistemas como liposomas, dendrímeros, exosomas, NPs, nanoesferas, nanofibras, micelas, nanotubos de carbono, emulsiones, hidrogeles (Figura 6) (Adepu, Ramakrishna, Costa-Pinto, & Oliveira, 2021ª).

USC DE COMPOSTELA

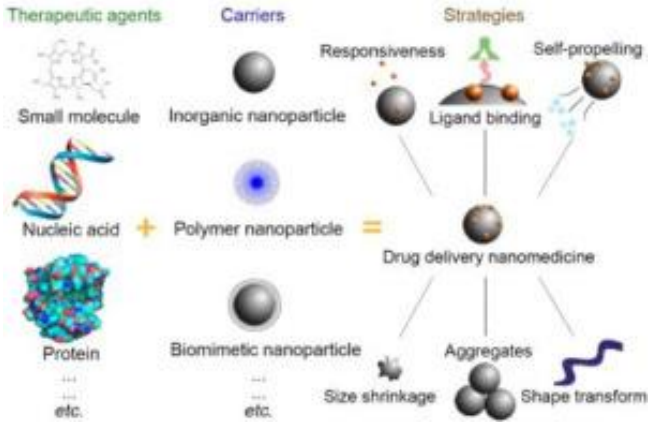


Figura 6. Nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos (R. Liu et al., 2023).

1.4.1. Tipos de Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos Basados en Nanotecnología

Como se ha comentado anteriormente, las NPs son partículas de tamaño submicrónico con una gran área superficial específica, lo que permite una mayor carga o dosificación del fármaco por unidad de volumen, ofrecen una mejor biodisponibilidad, circulan durante períodos mucho más largos a lo largo del cuerpo humano que si se administra el fármaco solo, y lo protegen de una degradación prematura. Dependiendo de las propiedades que se necesiten para cumplir con la actividad terapéutica deseada como se comentó con anterioridad se puede recurrir a distintos tipos de NPs como nanotransportadores (Jeong, Kwon, Choi, & Kim, 2021).

1.4.2. Clasificación de las Nanopartículas

De manera general, las NPs pueden clasificarse en tres grupos según su composición: orgánicas, inorgánicas y basadas en carbono (D. Huang, Cai, Li, & Zhao, 2023; Joudeh & Linke, 2022).

USC DE COMPOSTELA

1.4.2.1. Nanopartículas Inorgánicas

Las NPs inorgánicas carecen de átomos de carbono en su estructura, tales como NPs basadas en metales, óxidos de metales, cerámicas y basadas en semiconductores, por ejemplo (Joudeh & Linke, 2022). Gracias a sus propiedades físicas, químicas ópticas, eléctricas, acústicas y magnéticas, intrínsecas a la morfología y tamaño de estas, cuentan con un gran potencial para ser empleadas como sistemas de liberación controlada de fármacos. Aunque este tipo de NPs suelen ser estables en ambientes fisiológicos, es posible aumentar su estabilidad y especificidad mediante la funcionalización de su superficie con moléculas orgánicas, aumentado así su aplicación potencial en el área de la biomedicina (H. Huang, Feng, Chen, & Shi, 2020).

1.4.2.1.a. Nanopartículas de Oro

Las NPs basadas en metales pueden obtenerse tanto por métodos sintéticos de arriba-hacia-abajo (top-down) como por procesos de abajo-hacia-arriba (bottom-up) (D. Huang et al., 2023). El oro (Au), la plata (Ag), el cobre (Cu), el cobalto (Co), debido a su sus excepcionales propiedades ópticas, catalíticas, térmicas y antibactericidas, entre otras, son los metales más utilizados para la generación de este tipo de NPs. Sin embargo, las propiedades únicas que presentan las NPs de oro (AuNPs) han generado grandes expectativas en el campo terapéutico gracias a la (i) la posibilidad de ajustar su tamaño y forma (esféricas, varillas, núcleo-corazas, cúbicas, entre otras) de manera precisa a través de diversas metodologías sintéticas (P. Zhao, Li, & Astruc, 2013); (ii) la posibilidad de ajustar sus propiedades fisicoquímicas superficiales mediante la conjugación/funcionalización de su superficie con moléculas orgánicas como, por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos, polímeros, péptidos, etc. (Nicol, Dixon, & Coulter, 2015); iii) sus excepcionales propiedades ópticas, que las hace susceptibles de ser empleadas, por ejemplo, en terapia fototérmica, biosensor, bioimagen, etc. (Fan, Cheng, & Sun, 2020) En particular, las propiedades ópticas de las AuNPs se basan en la generación de un plasmón de resonancia superficial (SPR) que se manifiesta cuando la radiación electromagnética incidente presenta la misma frecuencia y energía que los

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

electrones de la banda de conducción del metal en la superficie de la NP, que comienza a oscilar en resonancia (Xiaohua Huang & El-Sayed, 2010). Es importante mencionar que el SPR de las AuNPs puede ser modulada cambiando el tamaño y forma de la NP, así como las propiedades dieléctricas del entorno. Gracias a esta característica principal, las AuNPs han adquirido una amplia gama de aplicaciones terapéuticas especializadas, particularmente la ablación fototérmica de tumores mediada por AuNPs, como se ha indicado con anterioridad. Las nanocorazas huecas, nanopartículas tipo núcleo-coraza, nanoprismas, nanocubos y nanovarillas destacan en este tipo de aplicaciones debido a que es posible modular las propiedades del plasmón de resonancia superficial hacia la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético, donde los componentes biológicos presentan un mínimo de adsorción (Mirkin, 2020).

1.4.2.1.b Nanopartículas de Óxidos de Hierro

Las NPs de óxidos metálicos están compuestas por cationes de iones metálicos y aniones de oxígeno. Algunos ejemplos de este tipo de NPs de óxidos de metales son, por ejemplo, óxido de hierro (F_3O_4, Fe_2O_3, principalmente), óxido de silicio (SiO_2), óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO) y óxido de aluminio (Al_2O_3) (Schneider et al., 2022).

En particular, las NPs basadas en óxido de hierro son de gran interés para la biomedicina debido a sus propiedades magnéticas inherentes a su tamaño y funcionalidad, baja toxicidad y elevada potencia magnética, ofreciendo novedosas alternativas en los campos del diagnóstico y terapia biomédica (Sangaiya & Jayaprakash, 2018). Por ejemplo, las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro, esto es, NPs de F_3O_4, Fe_2O_3 con un tamaño de cristalito inferior a ca. 15-20 nm en donde cada NP se comporta como un monodominio magnético, en ausencia de un campo magnético externo aplicado presentan una magnetización total igual a cero, manteniéndose estables en un medio acuoso, debido a los efectos de la fluctuaciones térmicas que hacen que los momentos individuales de las NPs fluctúen al azar. Sin embargo, cuando se aplica un campo magnético externo, el momento magnético de estas partículas magnéticas rápidamente se alinea en la dirección del campo externo aplicado, provocando una magnetización global/total no nula. Este fenómeno es de interés, pues si a este tipo de nanopartículas se aplica un campo magnético alternado, al no presentar estos

USC DE COMPOSTELA

nanosistemas superparamagnéticos áreas del ciclo de histéresis importantes, en sus proceso de relajación energética a través de los mecanismos de Néel y de Brown se producen pérdidas energéticas que ocasionan la generación de calor localizado hacia el medio, el cual puede ser utilizado para el desarrollo de terapias basadas en hipertermia megnética (Oltolina et al., 2020). Por otra parte, las propiedades superparamagnéticas de las NPs magnéticas también son utilizadas en el diagnóstico temprano de enfermedades como el cáncer, ateroesclerosis, entre otras (Farinha, Coelho, Reis, & Gaspar, 2021). En este sentido, comúnmente son utilizadas como agentes de contraste en el diagnóstico por imagen de resonancia magnética de imagen Las dos formas de NPs de óxido de hierro que más se utilizan en aplicaciones biomédicas son la maghemita (γ-Fe_2O_3) y la magnetita (F_3O_4), debido a su relativa estabilidad coloidal y a sus propiedades magnéticas y superparamagnéticas dependientes del tamaño (Elahi & Rizwan, 2021).

1.4.2.1.c. Nanopartículas de Sílice

Las NPs basadas en sílice (óxido de silicio) son otro tipo de NPs inorgánicas con aplicaciones prometedoras en diversos campos de la biomedicina como agentes de diagnóstico, biosensores y sistemas de liberación de fármacos. Las propiedades físicas y químicas de las NPs de sílice, tales como su biocompatibilidad, biodegradabilidad, gran área de superficie específica, tamaño y porosidad ajustable, las convierte en un material ideal para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico y liberación de fármacos (Janjua et al., 2023ª). Además, los métodos de síntesis que se utilizan para la obtención de estas NPs, a partir de sus precursores de silicato, son versátiles y fáciles de desarrollar permitiendo obtener, por ejemplo, NPs de sílice mesoporosas (MSNP) estables en diferentes medios (Janjua et al., 2023ª). Es importante mencionar, a este respecto, que las MSNPs poseen una extensa área de superficie (> 1000 m^2g^{-1}) gracias a los numerosos canales que poseen, donde pueden alojar grandes cantidades de moléculas pequeñas (Oh, Yang, Choi, & Ryu, 2022), y cuya superficie puede ser funcionalizada para permitir la liberación controlada de los compuesto bioactivos encapsulados desde el interior de las NPs bajo demanda ante la acción de determinados estímulos endógenos o exógenos (Manzano, Vallet-Regí, Manzano, & Vallet-Regí, 2020). Por ello, estas NPs han sido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

utilizadas como aditivos en alimentos, excipientes en productos farmacéuticos y cosméticos, así como nutracéuticos (Janjua et al., 2023b). Por otra parte, la estructura y estabilidad de las MSNPs facilitan el uso de estos nanomateriales en el desarrollo de sistemas de liberación de carga de fármaco debido a que conserva la estabilidad química del compuesto y libera de manera controlada el agente terapéutico (Bharti, Gulati, Nagaich, & Pal, 2015; Trzeciak, Chotera-ouda, Bak-sypien, & Potrzebowski, 2021).

1.4.2.1.d. Nanotubos de Carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) son estructuras cilíndricas que consisten en un arreglo hexagonal de láminas de grafeno (átomos de carbono sp^2). Los CNTs muestran propiedades eléctricas únicas debido a los electrones π deslocalizados a lo largo del eje z de su estructura. Los CNTs se clasifican en tres tipos según el número de paredes que contengan: nanotubos de pared simple (SWCNTs), nanotubos de pared doble (DWCNTs) y nanotubos de pared múltiple (MWCNTs). Los SWCNTs son cilindros hechos de una sola lámina de grafeno, mientras que los MWCNTs están formados por capas múltiples de láminas de grafeno enrolladas.

Actualmente, uno de los principales usos que se están investigando para los nanotubos de carbono en el ámbito biomédico es el de ser empleados como sistemas de entrega de fármacos anticancerígenos (Jha, Singh, Sharma, & Fuloria, 2020) como docetaxel, doxorrubicina, metotrexato, gentamicina, entre otros compuestos) debido a su alta área superficial, estructura en forma de fibra, excepcionales propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas, estabilidad y biocompatibilidad (Hamblin, 2021). Gracias a la estructura de los CNTs, los fármacos son adsorbidos bien en la superficie del nanotubo y/o confinados en el interior del CNT, lo cual permite una liberación controlada y sostenida. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes que presentan los CNTs respecto a sus aplicaciones en campos de la biomedicina es su nula solubilidad en medios acuosos debido a que son altamente hidrofóbicos intrínsicamente, tendiendo a agregarse. Sin embargo, este inconveniente puede superarse modificando la superficie de los CNTs de manera física (no covalente) o covalentemente (W. Zhang, Zhang, & Zhang, 2011). Los CNTs también suelen someterse a procesos de oxidación, obteniéndose

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

CNTs hidrofílicos debido a la presencia de grupos -OH y -COOH en su superficie. Sin embargo, estos procesos de oxidación deben estar bien controlados, puesto que se puede romper la estructura del nanotubo (W. Zhang et al., 2011).

1.4.2.2. Nanopartículas Orgánicas

Las NPs orgánicas son sistemas de liberación de fármacos que se basan en materiales orgánicos, de origen natural (lípidos, polisacáridos y proteínas, principalmente) o sintético (polímeros como el PEO, PCL, PLA, PLGA, entre otros) para encapsular y entregar agentes terapéuticos de manera controlada. Estas NPs a menudo se diseñan para abordar desafíos específicos en la administración de fármacos, como la mejora de la biodisponibilidad, la biodistribución, la reducción de la toxicidad y la liberación sostenida de las sustancias bioactivas. Algunos ejemplos comunes de materiales orgánicos utilizados en NPs para la liberación de fármacos incluyen polímeros biocompatibles y biodegradables, lípidos y dendrímeros. Estos materiales se seleccionan por su capacidad para formar estructuras en la nanoescala que pueden encapsular el fármaco y protegerlo de la degradación antes de llegar a su sitio de acción (Nikezić, Bondžić, & Vasić, 2020).

1.4.2.2.a. Micelas

Las micelas son sistemas nanoestructurados de liberación de fármacos formados por moléculas de surfactantes anfifílicos, que pueden ser de bajo o alto peso molecular, en disolución acuosa. No obstante, en el caso de los surfactantes de bajo peso molecular la estabilidad termodinámica y cinética de las micelas que forman suele ser baja debido a los altos valores de la concentración crítica micelar necesarios para su formación. Por otra parte, las moléculas de alto peso molecular (surfactantes de alto peso molecular, polímeros) con propiedades anfifílicas, como los copolímeros de bloque, pueden agregarse formando estructuras micelares, las cuales suelen ser más estables en medios acuosos además de presentar una mayor capacidad de carga del fármaco comparado con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las micelas preparadas con los surfactantes de bajo peso molecular (Ahmad, Shah, Siddiq, & Kraatz, 2014).

Las micelas presentan comúnmente estructuras esféricas o globulares con un núcleo hidrofóbico, capaz de alojar fármacos hidrofóbicos, rodeado por una capa hidrofílica que asegura su estabilidad en medio acuoso, además de poder incorporar, incluso, sustancias bioactivas hidrofílicas. Esta configuración permite que las micelas puedan transportar eficazmente principalmente fármacos insolubles en agua mejorando, así, su biodisponibilidad y protegiéndolos de la degradación antes de alcanzar su sitio de acción. La liberación del fármaco desde las micelas puede ser controlada mediante la difusión a través de la capa externa o la desintegración de la micela en respuesta a estímulos como cambios de pH o temperatura, lo que facilita una liberación sostenida y dirigida. Estas propiedades hacen de las micelas un sistema prometedor para aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento de enfermedades como el cáncer, donde pueden reducir la toxicidad sistémica al dirigir el fármaco específicamente a células o tejidos diana mediante la funcionalización de su superficie con moléculas específicas (Atanase, 2021).

1.4.2.2.b Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas huecas formados a partir del autoensamblaje de fosfolípidos (naturales o sintéticos) en agua. La capacidad de carga, estabilidad, biocompatibilidad y la fácil modificación de la superficie de los liposomas con ligandos de reconocimiento de determinadas células o tejidos permite que estos nanosistemas sean utilizados en un amplio número de aplicaciones biomédicas (Lombardo, Calandra, Barreca, Magazù, & Kiselev, 2016). Los fosfolípidos que componen estas estructuras vesiculares constan de una cabeza polar y una cola hidrofílica, por lo que dependiendo de la composición fosfolipídica, los liposomas pueden tener una superficie con carga positiva, negativa o neutra. Cuando los fosfolípidos son dispersados en agua, estos se autoasocian de manera espontánea en bicapas, semejantes a las estructuras observades en las membranas biológicas. Estos nanosistemas cuentan con un núcleo acuoso, delimitado por una bicapa lipídica, en el cual es posible encapsular un fármaco de carácter hidrofílico. Es importante mencionar que, en la estructura de la bicapa, la cabeza polar de los fosfolípidos está expuesta a la fase acuosa y las colas

USC DE COMPOSTELA

hidrofóbicas se orientan en el interior de la bicapa, formando un espacio hidrofóbico, donde es posible encapsular fármacos hidrofóbicos. Por otra parte, es posible controlar el tamaño, la forma, la carga, la composición lipídica y la funcionalización de los liposomas, mejorando su estabilidad tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Lombardo et al., 2016). La liberación del fármaco puede ser controlada mediante modificaciones en la composición lipídica o mediante agentes que regulen la ruptura de los liposomas en el sitio de acción. Además, los liposomas pueden ser funcionalizados con ligandos específicos para dirigirlos a tejidos o células objetivo mejorando, así, la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios. Protegen el fármaco encapsulado de la degradación prematura y pueden reducir la toxicidad sistémica al minimizar la liberación no específica del fármaco en el organismo. Por estos motivos, los liposomas representan una herramienta poderosa y versátil para la administración de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades, desde cánceres hasta enfermedades infecciosas y crónicas (Guimarães, Cavaco-Paulo, & Nogueira, 2021).

1.4.2.2.c. Nanopartículas Poliméricas

Las NPs poliméricas son sistemas coloidales obtenidos a partir del ensamblaje molecular de polímeros naturales y/o sintéticos. Dependiendo del tipo la composición de los polímeros es posible obtener diferentes nanoestructuras, tales como nanopartículas poliméricas sólidas, micelas poliméricas, conjugados poliméricos, dendrímeros, polimerosomas, poliplejos y nanopartículas formadas por lipopolímeors. En las últimas décadas, estas estructuras han generado grandes expectativas por sus aplicaciones prometedores como sistemas de liberación de fármacos (Elmowafy et al., 2023). Ofrecen ventajas significativas sobre otros tipos de NPs como los liposomas, micelas de surfactante y nanosistemas inorgánicos en términos de estabilidad, biocompatibilidad, estabilidad en medios fisiológicos, capacidad de carga y liberación de fármaco, etc. (El-Say & El-Sawy, 2017) Por ejemplo, las NPs poliméricas son notablemente estables en fluidos biológicos y la amplia disponibilidad de diversos tipos de polímeros permite diseñar NPs que sean capaces de atravesar diferentes barreras biológicas, haciendo posible que liberen el compuesto terapéutico en órganos y tejidos específicos (Beach et al., 2024). Además, gracias a la gran cantidad de grupos funcionales, es posible modificar

USC DE COMPOSTELA

químicamente la superficie de las NPs polimérica con el fin de modular su degradación, prolongar su tiempo en circulación y controlar la liberación del compuesto encapsulado modulada en función de estímulos específicos (pH, temperatura, exposición a luz, entre otras). Por otra parte, la funcionalización con ligandos de reconocimiento celular específicos facilita la entrega selectiva del fármaco a células o tejidos blancos reduciendo, así, los efectos secundarios y mejorando la eficacia terapéutica. En conjunto, las NPs poliméricas representan una tecnología versátil y prometedora para mejorar la administración de fármacos en diversas condiciones médicas (Gagliardi et al., 2021).

1.4.3. Propiedades y Limitaciones de los Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos

El uso de NPs como sistemas de liberación y carga de fármacos se fundamenta principalmente en su tamaño, que facilita su difusión a través de las barreras biológicas permitiendo, así, alcanzar dianas específicas como tejidos, tumores o células específicas (Sindhwani et al., 2020). Por lo tanto, la estructura de las NPs permite que los fármacos se encapsulen o conjuguen en su superficie a través de procesos de adsorción, de interacciones electroestáticas o de enlaces químicos, brindando también protección contra la degradación y eliminación prematura. Estos nanosistemas cuentan con una relación área de superficie/ volumen más grande que los materiales macroscópicos debido a sus dimensiones nanométricas. Esto mejora su capacidad para interactuar con moléculas y receptores superficiales, lo que les da funcionalidades particulares. Esta característica es particularmente beneficiosa al permitir la conjugación con ligandos específicos (anticuerpos, péptidos, monosacáridos, etc.), facilitando el direccionamiento a dianas biológicas. Además, el uso de NPs como portadores de fármacos favorece la acumulación del agente terapéutico en el sitio de interés, minimizando su dispersión en el organismo. Este enfoque no solo permite la reducción en la frecuencia de administración, sino que también contribuye a disminuir los efectos secundarios, haciendo así que las terapias sean más eficientes, inclusive llegando a disminuir los costos de las terapias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque el empleo de NPs como sistemas de liberación controlada de fármacos es prometedora, estos enfrentan algunos desafíos que deben ser superados para garantizar su eficacia y seguridad en el ámbito clínico. En primer lugar, su posible toxicidad a medio y largo plazo es una las principales preocupaciones. Aunque esos nanosistemas se diseñan con la intención de ser biocompatibles, algunos materiales en sus composiciones pueden tener efectos perjudiciales, al menos a largo plazo, en el cuerpo humano. Además, la capacidad del organismo para eliminar eficientemente estas nanopartículas es esencial para evitar acumulaciones o efectos no deseados. De igual forma, la farmacocinética plantea ciertos desafíos, ya que su comportamiento en el cuerpo puede variar significativamente respecto a la administración del principio activo de manera libre o empleando sistemas transportadores de tamaños más elevados (Yan et al., 2020).

Por otro lado, la estabilidad coloidal con el tiempo es otra potencial limitación importante de los SLCF basados en NPs. Estas pueden experimentar cambios en su forma o aglomerarse, durante su administración en el cuerpo humano o simplemente durante su propio almacenamiento/conservación antes de su uso terapéutico, lo que puede afectar negativamente su eficacia. La capacidad de superar barreras biológicas, como la barrera hematoencefálica, la intestinal, etc, es también crucial para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, algunas NPs pueden tener dificultades para atravesar estas barreras, limitando su utilidad en un significativo número de tratamientos. Además, la respuesta inmunológica del cuerpo puede representar un obstáculo adicional, ya que las NPs a veces son reconocidas como agentes extraños por el sistema de defensa del cuerpo, desencadenando respuestas inmunológicas que afectan su eficacia y seguridad (Figura 7). Por otro lado, los costes de producción también son un factor a importante, ya que la fabricación de NPs a menudo implica tecnologías avanzadas y costosas. Esto puede afectar su viabilidad económica para aplicaciones médicas a gran escala. Por último, las interacciones no específicas con moléculas en el entorno biológico plantean adicionalmente desafíos impredecibles. Estas interacciones pueden afectar el comportamiento de las NPs de maneras que aún no comprendemos completamente.

A pesar de estos desafíos, la investigación continua en este campo busca abordar estas limitaciones y desbloquear el potencial completo de las NPs en aplicaciones

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

biomédicas. La superación de estos obstáculos es esencial para aprovechar al máximo las prometedoras contribuciones de las NPs en la medicina del futuro.

1.4.4. Estabilidad y Funcionalización

Cuando las NPs se exponen a medio biológicos complejos como la sangre, el líquido cefalorraquídeo, lágrimas, humor vítreo o el líquido sinovial, sus características fisicoquímicas pueden cambiar drásticamente. El impacto del entorno biológico en los SLCF implica, en primer lugar, la adsorción superficial de la mayoría de las NPs por una compleja capa de proteínas, conocida como "biocorona proteica". Este proceso lleva aparejado un cambio notable en las características fisicoquímicas del nanotransportador, alterando sus propiedades superficiales, potencialmente desencadenando una respuesta inmune y modificando su destino biológico, toxicidad y capacidad de dirigirse específicamente (Breznica, Koliqi, & Daka, 2020).

Para evitar este fenómeno se emplean diversas estrategias que incluyen la funcionalización de la superficie de las NPs para minimizar la adsorción de proteínas no deseadas, la selección cuidadosa de materiales que puedan influir en la composición de la corona proteica, y/o la realización de estudios detallados para caracterizar cómo esta interacción puede afectar la biodistribución, la respuesta inmune y la eficacia terapéutica.

1.4.4.1. Modificación de la Morfología de las Nanopartículas

Las NPs varían notablemente sus propiedades según su tamaño o forma. Diversas investigaciones han evidenciado que la morfología de los nanomateriales impacta considerablemente en la formación de la corona proteica (Breznica et al., 2020). En particular, el tamaño de las NPs influye tanto en la cantidad de proteínas que se adsorben como en las clases de proteínas que se adhieren a ellas (H. Li et al., 2021). Un caso ilustrativo, por ejemplo, se produce con las NPs de oro. Por ejemplo, Ma et al. mostraron que las NPs de oro esférica de tamaño de 3 nm presentaron una adsorción superficial de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteínas muy inferior comparada con NPs de la misma simetría esférica pero con tamaños de 10 y 100 nm (Y. Ma, Hong, & Ding, 2020).

1.4.4.2. Modificación de las Propiedades Superficiales de las Nanopartículas

La formación de la corona proteica en las NPs está influenciada por las características de la superficie de las NPs, como su carga eléctrica y su hidrofobicidad. La carga superficial de las NPs es fundamental para la adsorción de proteínas. Por ejemplo, los liposomas con carga negativa atraen proteínas con carga positiva y viceversa. Existen estudios donde se ha reportado que los materiales lipídicos catiónicos, como el (2,3-dioleoyloxi-propil)-trimetilamonio (DOTAP) y los lípidos de DC-colesterol, tienden a adsorber proteínas plasmáticas con carga negativa, tales como la fibronectina, la protrombina y la proteína de unión al vítreo. Al utilizar materiales lipídicos neutros en lugar de DOTAP, la capacidad de adsorción de este tipo de proteínas se reduce de forma considerable (H. Li et al., 2021).

1.4.4.3. Recubrimiento de las Nanopartículas

El recubrimiento de NPs es esencial para prolongar su tiempo de circulación en sangre, evitando su reconocimiento y eliminación rápida por parte del sistema inmunológico. Una técnica común de funcionalización de la superficie de las NPs es la PEGilación, que recubre las NPs con el polímero polietilenglicol (PEG), creando una capa hidrofílica que reduce la opsonización y el reconocimiento por macrófagos aumentando, así, su estabilidad y vida media en circulación (P. Y. Li et al., 2021). Además, proteínas como la albúmina o péptidos específicos pueden recubrir las NPs para reducir su inmunogenicidad y mejorar la biocompatibilidad, algunos incluso permiten la entrega dirigida a células específicas. Por otra parte, polímeros como los poloxámeros, el ácido poliacrílico y la polivinilpirrolidona también crean barreras hidrofílicas alrededor de las NPs mejorando su estabilidad coloidal en medios fisiológicos. Los beneficios de todos estos recubrimientos incluyen un aumento del tiempo de circulación, reducción de la inmunogenicidad, mejora de la estabilidad y capacidad para la entrega dirigida, lo cual es especialmente útil en tratamientos contra el cáncer, enfermedades infecciosas y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

cardiovasculares (Mitchell et al., 2020). Por ejemplo, de manera general las NPs recubiertas con PEG mejoran la entrega de fármacos a los tumores, debido que este polímero evita que las NPs sean detectadas por el sistema inmune aumentando, por tanto, su tiempo de circulación en el torrente sanguíneo y permitiendo que se acumulen en mayor cantidad en el sitio de acción reduciendo, en consecuencia, los efectos secundarios sistémicos adversos (Shi et al., 2021).

1.4.5. Direccionamiento Pasivo y Activo

Las estrategias de administración de fármacos dirigidos se dividen comúnmente en dos tipos: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo.

El direccionamiento pasivo de NPs se basa en características fisiológicas y patológicas del cuerpo, permitiendo su acumulación en ciertas áreas sin modificaciones específicas. Un ejemplo es el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) en tumores sólidos, donde los vasos sanguíneos permeables permiten la filtración y acumulación de NPs debido al deficiente drenaje linfático. En sitios donde se genera inflamación, los vasos sanguíneos evolucionan para ser más permeables y facilitan, como consecuencia, la infiltración de las NPs, concentrando entonces los agentes terapéuticos. No obstante, el sistema reticuloendotelial (RES) capta y retiene NPs, especialmente en el hígado y bazo, reduciendo considerablemente el tiempo de circulación de las NPs, en consecuencia, disminuyendo su capacidad terapéutica, por lo que es necesario modificarlas superficialmente para hacerlas “invisibles” como se ha comentado con anterioridad.

Por otro lado, el direccionamiento activo mejora los efectos del direccionamiento pasivo al hacer que el sistema de entrega sea más específico hacia un tejido objetivo. Este método implica modificar generalmente la superficie de las NPs para que se unan específicamente a células o tejidos diana mediante ligandos que reconocen receptores específicos en aquellas. Por ejemplo, las NPs pueden ser funcionalizadas con anticuerpos que se unen a antígenos específicos en células tumorales, aumentando la precisión del tratamiento. Otro ejemplo es el uso de péptidos que reconocen y se unen a receptores en células endoteliales de vasos sanguíneos tumorales, mejorando la entrega del fármaco

USC

(Marques, Costa, Velho, & Amaral, 2020). Asimismo, las NPs pueden ser decoradas con ligandos específicos como, por ejemplo, ácido fólico para dirigirse a receptores de folato, que están sobreexpresados en ciertos tipos de cáncer (Tagde, Kulkarni, Mishra, & Kesharwani, 2020). Estos métodos de direccionamiento activo aumentan la eficacia terapéutica y reducen los efectos secundarios al concentrar las NPs en los sitios específicos deseados.

1.4.6. Barreras Biológicas

Las NPs, a pesar de su prometedor potencial en aplicaciones médicas y farmacéuticas, enfrentan varias barreras biológicas que limitan su eficacia. Una de las principales barreras es el sistema inmunológico, que puede identificar y eliminar estas NPs antes de que lleguen a su objetivo. Además, deben atravesar barreras físicas como la barrera hematoencefálica, que protege al cerebro de sustancias potencialmente dañinas, pero también dificulta la entrega de tratamientos terapéuticos. Otras barreras incluyen la degradación enzimática en el torrente sanguíneo y la eliminación renal y hepática, que pueden reducir significativamente la concentración de las NPs en el sitio de acción deseado. Estas barreras biológicas requieren el desarrollo de estrategias innovadoras en el diseño y funcionalización de NPs para mejorar su estabilidad, biodistribución y capacidad de penetración en los tejidos específicos.

1.4.6.1 Interacciones con el Sistema Inmune

Las NPs interactúan con el sistema inmunológico de diversas maneras, lo que puede influir tanto en su eficacia terapéutica como en su seguridad. Al ingresar al cuerpo, las NPs son rápidamente reconocidas por el sistema inmunológico innato, que incluye macrófagos y células dendríticas. Estas células pueden fagocitar las NPs, lo cual puede ser beneficioso para la entrega de fármacos a estas células en casos de enfermedades específicas, pero también puede resultar en la eliminación prematura de las NPs antes de que alcancen su objetivo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

El proceso de opsonización de las NPs es el punto de partida del secuestro realizado por el sistema de fagocitos mononucleares (MPS), que está compuesto principalmente por macrófagos residentes en el bazo, los ganglios linfáticos y el hígado. Esto provoca una alta acumulación de NPs en órganos como el bazo y el hígado, contribuyendo a una distribución no específica de las NPs en órganos sanos.

1.4.6.2. Interacciones con Células y Tráfico Intracelular

Existen diversos mecanismos/rutas de internalización celular en el organismo que se pueden dividir en pasivos (no hay gasto energético) y activos (hay gasto energético).

La endocitosis es una ruta de internalización dependiente de energía en la cual se produce una deformación de la membrana celular, para el posterior envolvimiento alrededor de la partícula que se va a introducir. Esta ruta es el principal método de internalización de macromoléculas en las células. Dado que las NPs tienen un tamaño mayor al de las macromoléculas, a menudo se internalizan en las células a través de la vía de endocitosis.

La endocitosis mediada por receptores tiene lugar cuando las NPs se unen a receptores específicos en la superficie celular, desencadenando su engullimiento por vesículas. Un ejemplo de este proceso es la endocitosis mediada por caveolas, en el cual pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, llamadas caveolas, engullen y transportan la NP al interior de la célula. Otro mecanismo es la endocitosis mediada por clatrinas, en el cual las NPs se unen a una proteína llamada clatrina para formar vesículas recubiertas que se invaginan y se desprenden de la membrana plasmática (Rennick, Johnston, & Parton, 2021). Otro potencial proceso de internalización celular es la endocitosis por macropinocitosis, donde las células engloban grandes volúmenes de fluido extracelular junto con las NPs. Por otro lado, también las NPs pueden ser fagocitadas, especialmente por células del sistema inmunológico como los macrófagos, que las reconocen y las internalizan para su degradación. Estos procesos permiten que las NPs entren en las células, donde pueden liberar sus cargas terapéuticas de manera

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

controlada, mejorando la eficacia de los tratamientos y reduciendo los efectos secundarios sistémicos (S. Ma et al., 2021).

1.5. Nanosistemas Biomiméticos Derivados de Membrana Celular

Las NPs biomiméticas obtenidas a partir de la extracción de membranas celulares han surgido como alternativa para el desarrollo de SLCF para el tratamiento para diversas enfermedades. Este tipo de NPs cuentan con una variedad de funciones provenientes y relacionadas con las de las células originales, incluidas la orientación biológica, evasión del sistema inmunológico, existencia de marcadores "propios" en su estructura, direccionamiento activo, y capacidad de penetración en tumores y diversos tejidos (C. H. Xu et al., 2020). Hasta el momento, el desarrollo de sistemas basados en membrana celular ha utilizado una amplia gama de tipos de células: Estos incluyen membranas de plaquetas, células madre mesenquimales, células cancerosas, macrófagos, glóbulos rojos, entre otros (H. Zhao et al., 2022).

De manera general, los sistemas biomiméticos obtenidos a partir de membranas celulares se pueden clasificar en dos categorías: Por un lado, están las vesículas que se obtienen a partir de fragmentos de membrana celular, los cuales son reconstituidos para obtener vesículas; por el otro, en vez de reconstituir los fragmentos de membrana, estos se utilizan para recubrir la superficie de NPs previamente formadas. Ambas aproximaciones cuentan con una alta especificidad, larga circulación, baja inmunogenicidad y biocompatibilidad gracias a las propiedades naturales de los vectores biológicos y las tecnologías de modificación de superficies (L. Chen et al., 2021)(Figura 7).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

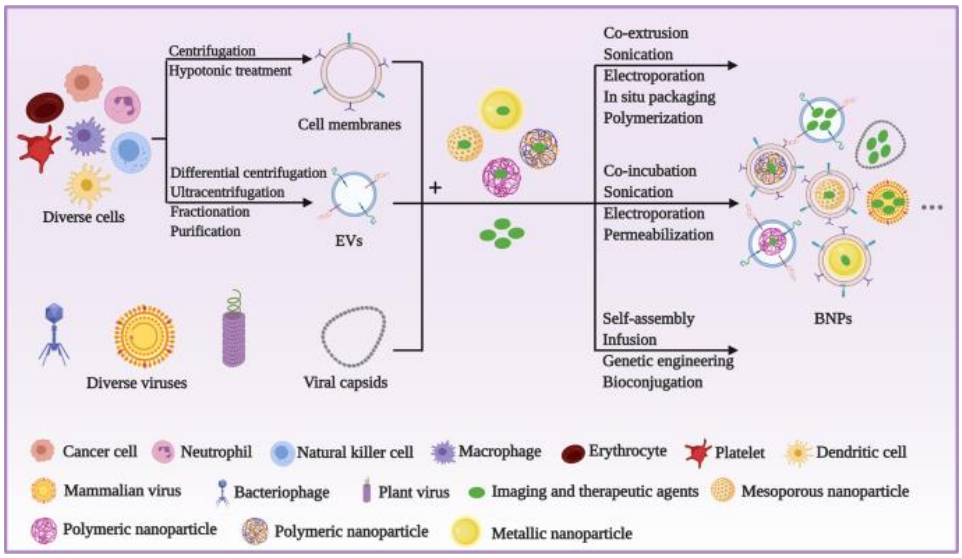


Figura 7. Obtención de nanopartículas biomiméticas (L. Chen et al., 2021).

1.5.1. Nanovesículas de Membrana Celular

Las NVs obtenidas a partir de membranas celulares, o también conocidas como nanocélulas artificiales, son NPs delimitadas por una bicapa lipídica que se pueden obtener bien mediante el proceso de purificación de fragmentos de la propia membrana citoplasmática celular y reconstituirlos en forma de vesículas mediante procesos de sonicación o de extrusión principalmente, o bien obtenerse directamente de las vesículas extracelulares que casi cualquier tipo de línea celular excreta. Estas últimas pueden participar en las comunicaciones intercelulares en situaciones fisiológicas o patológicas. Las vesículas extracelulares se dividen principalmente en exosomas (40–100 nm), microvesículas (50–1000 nm) y cuerpos apoptóticos (1–5 µm) según su origen, aunque los subtipos de vesículas extracelulares se superponen en términos de constitución molecular y función biológica (Agrahari, Agrahari, Burnouf, Chew, & Burnouf, 2019).

Las NVs están formadas por biomoléculas particulares como proteínas de membrana, bicapas lipídicas, metabolitos y ácidos nucleicos que reflejan sus orígenes celulares. Las bicapas lipídicas protegen los contenidos bioactivos del complejo entorno de los fluidos corporales y de la degradación de las proteasas y nucleasas extracelulares, mientras que las proteínas de membrana aseguran que las NVs se dirijan a sitios

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

específicos. Como resultado, las NVs pueden viajar a través del sistema circulatorio e ir interaccionando o uniéndose a las membranas de las células diana para entregar su contenido. Debido a su propiedades, estas NVs se han vuelto cada vez más importantes como vehículos para la administración dirigida de agentes de obtención de imágenes y como sistemas terapéuticos, que incluyen miRNA, siRNA, proteínas, péptidos y fármacos químicos) (Agrahari et al., 2019).

1.5.2. Nanopartículas Recubiertas con Membrana Celular

Las NPs recubiertas con diferentes tipos de membranas celulares han sido sujeto de estudio en los últimos año (Zou, Wang, Wang, Wang, & Zhang, 2020)s, ya que este recubrimiento totalmente biomimético disminuye la adsorción de proteínas in vivo y evita el reconocimiento del sistema inmunitario, lo que permite prolongar el tiempo de circulación del nanovehículo en el medio fisiológico. En los últimos años, se han explorado distintas combinaciones variando tanto el origen del recubrimiento, esto es, cambiando la línea celular de donde se obtiene la membrana, así como el tipo de NP que se encuentra en el núcleo, de tal manera que las características y propiedades del nanosistema biomimético pueden ajustarse según la aplicación deseada. De esta forma, se pueden obtener combinaciones prácticamente infinitas permitiendo, así, desarrollar diversos nanosistemas en función de las necesidades que se tengan.

1.5.2.1. Nanopartículas Recubiertas con Membrana Eritrocitaria

El recubrimiento de NPs con membrana celular eritrocitaria (Figura 8) fue el primer acercamiento para desarrollar este tipo de nanosistemas. El motivo por el cual estas células fueron las primeras en ser utilizadas es debido a su falta de organelos, lo cual facilita la extracción y purificación de su membrana celular (W. Gao & Zhang, 2015). Su membrana celular conocida como membrana fantasma, debido a la presencia de los receptores CD 47, desempeña un papel crucial al reducir la respuesta inmune y prolongar la vida media de las NPs en la circulación sanguínea. Así, el recubrimiento con esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

membrana proporciona propiedades de camuflaje, permitiendo que las nanopartículas pasen desapercibidas para el sistema inmunológico.

Algunos de los nanosistemas que se han desarrollado con este tipo de membrana celular son, por ejemplo, NPs de PLGA cargadas con doxorrubicina recubiertas con la membrana celular para el tratamiento de cáncer (Aryal et al., 2013). También se han recubierto NPs de óxido de hierro para ofrecerles un direccionamiento activo y aumentar su tiempo en circulación, todo esto manteniendo las propiedades magnéticas de las NPs para poder ser utilizadas como agentes de contraste para la imagenología por resonancia magnética (Ren et al., 2016).

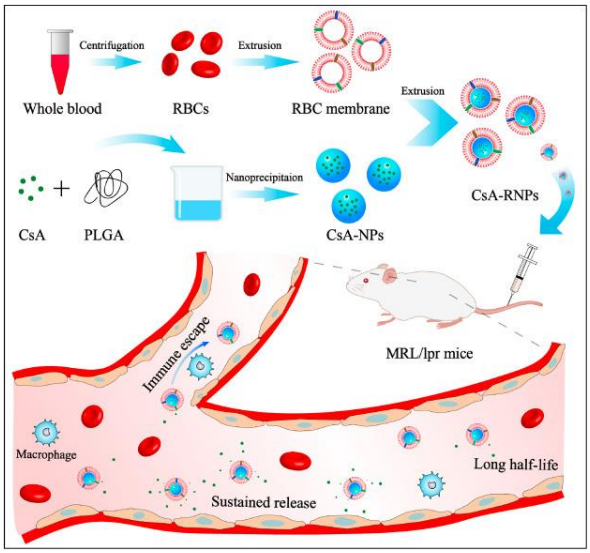


Figura 8. Preparación y aplicación de nanopartículas cubiertas con membrana celular de eritrocito (Hao et al., 2022).

1.5.2.2. Células Tumorales

Otra opción para camuflar NPs es el empleo de membrana de las células cancerosa (Figura 9), en este caso para su empleo en tratamientos anticancerígenos, por ejemplo. Las células cancerosas son fáciles de cultivar a gran escala in vitro y tienen una elevada capacidad de direccionamiento homotípico, en comparación con otras células. Esta

habilidad es transferible a los recubrimientos realizados con membranas de este tipo de células. Por ello, las NPs recubiertas con membrana celular de células cancerosas resultan una novedosa estrategia en la nanotecnología y la terapia médica, ya que intensifican la capacidad de reconocimiento y adhesión a las células cancerosas, mejorando la precisión y eficacia del tratamiento. Este enfoque, fundamentado en la biomimética, no solo amplía el espectro de posibilidades en la terapia oncológica, sino que también subraya la relevancia de la inspiración biológica para concebir terapias más precisas y eficientes (Raza et al., 2021).

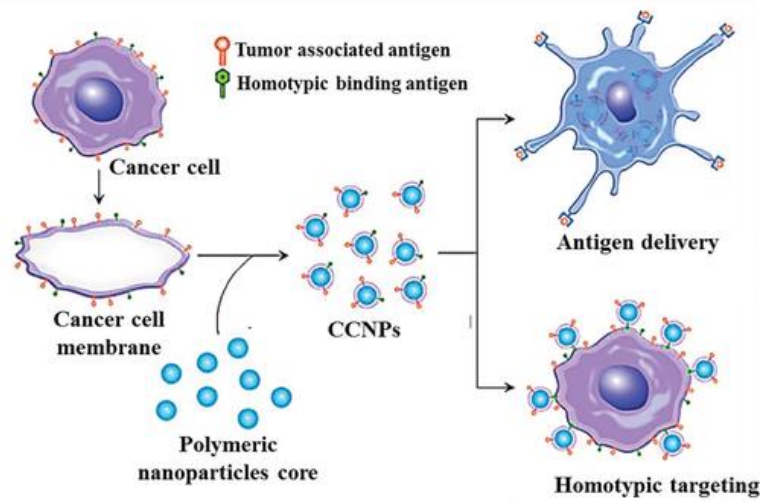


Figura 9. Nanopartículas cubiertas con membrana celular de células cancerosas (Raza et al., 2021).

Con esto en mente, se han desarrollado nanosistemas basados NPs huecas de cobre recubiertas con la membrana celular de la células de melanoma B-16 con el propósito de ser empleadas como agente fototérmico mediante la irradiación de luz infrarroja para el tratamiento de estas células tumorales (L. Hou, Shan, Hao, Feng, & Zhang, 2017). De igual forma, se han desarrollado NPs de melanina recubiertas con membrana celular de células de cáncer de mama MCF-7. La melanina presenta propiedades fotoacústicas, fototérmicas, es biodegradable y biocompatible pero, sin embargo, al introducirse en el organismo este es detectada y eliminado por el organismo,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por lo que con este recubrimiento biomimética se evita el reconocimiento y se mejora ostensiblemente su localización en el tejido tumoral (Jiang et al., 2019).

1.5.2.3. Plaquetas

Las plaquetas son elementos celulares sanguíneos sin núcleo, reconocidos por su función crucial en la hemostasia y en la preservación de la integridad de la pared vascular ante posibles lesiones con el propósito de evitar la hemorragia (Boulaftali, Hess, Kahn, & Bergmeier, 2014).

Las plaquetas desempeñan funciones especializadas, tales como la elusión del sistema inmunológico, la adhesión subendotelial y las interacciones con patógenos, lo que las posiciona como una buena propuesta para su consideración como potenciales fuentes para la configuración de nanotransportadores biomiméticos. Así, se pueden emplear las membranas plaquetarias en la concepción de NPs recubiertas con dichas membranas (Figura 10) (He, Zhang, & Feng, 2020ª), las cuales exhiben propiedades destacadas como una baja inmunogenicidad y afinidad hacia tumores, patógenos y sistemas vasculares lesionados. Estas membranas plaquetarias presentan una superioridad respecto a otras membranas celulares, confiriéndoles una ventaja única debido a la expresión de proteínas y receptores específicos en su superficie, como, por ejemplo, las integrinas, repeticiones ricas en leucina, selectinas, receptores transmembranales, receptores de prostaglandinas, receptores lipídicos, entre otros (Saboor, Ayub, Ilyas, & Moinuddin, 2013). La principal limitante de esta aproximación es la falta de una técnica robusta para la obtención a gran escala de membranas plaquetarias, el riesgo de respuestas inmunogénicas en casos aislados limitan la aplicación de las membranas plaquetarias en sistemas de administración de fármacos (H. Han, Bártolo, Li, Shahbazi, & Santos, 2022).

En la literatura previa se pueden encontrar diversos ejemplos de nanosistemas basados en NPs recubiertas con membrana plaquetaria como, por ejemplo, MOFs de ZIF-8 cargados con siRNA para el tratamiento de cáncer mediante terapia génica (Zhuang et al., 2020). También se han recubierto NPs de PLGA cargadas con agentes fluorescentes

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para ser utilizados como agentes de contraste en el diagnóstico de la AEs (Yang et al., 2020).

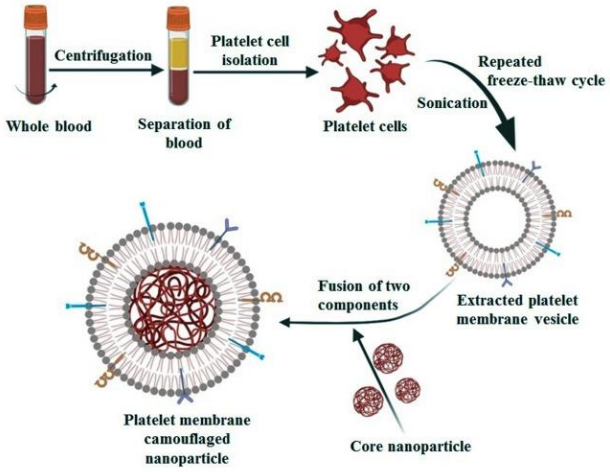


Figura 10. Preparación de nanopartículas cubiertas con membrana de plaquetas (Kunde & Wairkar, 2021).

1.5.2.4. Células Inmunitarias

Las células del sistema inmunológico, entre las que se encuentran los neutrófilos, las células asesinas naturales (NK, de sus siglas en inglés) y los macrófagos, poseen la capacidad de desencadenar una respuesta inmune activa para inducir inflamación, dirigirse a tumores y/o suprimir la formación de metástasis. Este fenómeno se atribuye a las funciones inmunológicas específicas de las proteínas complejas asociadas a su membrana celular. Por ello, al recubrir con membranas celulares NPs sintéticas (Figura 11), estas heredan el perfil ainmunológico de las células origen a través del recubrimiento biomimético, actuando como señuelos que neutralizan componentes patológicos diversos y complejos, sin depender de la estructura celular compleja específica (D. Wang et al., 2022), y logrando una respuesta terapéutica más efectiva (Y. Zeng et al., 2022). Por ejemplo, Li et al. desarrollaron sistemas antimicrobianos mediante el uso de la membrana celular de leucocitos para configurar nanovesículas que pueden encapsular agentes antimicrobianos con el objetivo de aprovechar los receptores tipo Toll de la membrana

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para brindarle direccionamiento activo al nanosistema que le permita eliminar células inmunitarias infectadas con *Staphylococcus aureus* (Y. Li et al., 2020). En otra investigación, Rao et al. desarrollaron un sistema de NPs magnéticas recubiertas con la membrana celular de macrófagos para evitar la degradación prematura de las NPs biomiméticas, prolongar su tiempo de circulación en sangre, y permitir que se acumulen en el área del tumor (Rao et al., 2020).

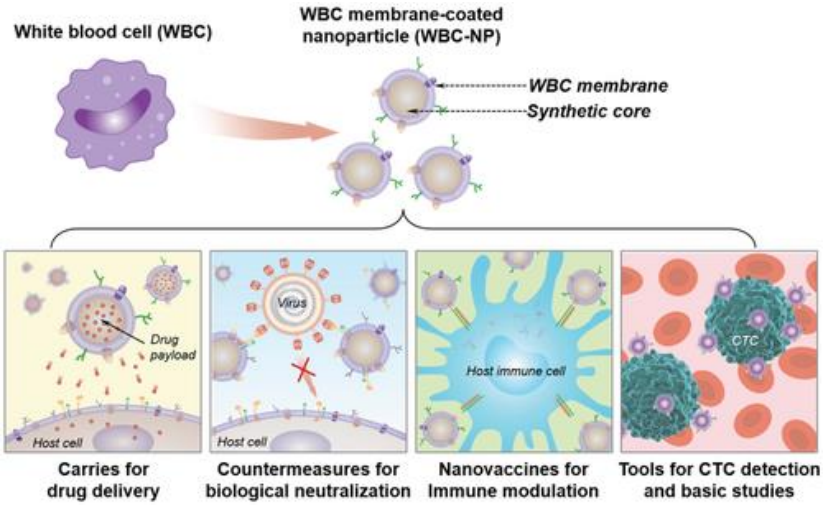


Figura 11. Aplicaciones de nanopartículas cubiertas con membrana celular de células inmunitarias (D. Wang et al., 2022).

1.6. Obtención de Nanovesículas y Nanopartículas Recubiertas a Partir de Membrana Celular

La obtención de las NPs recubiertas con membrana celular generalmente consta de tres pasos: La obtención de las vesículas o fragmentos celulares, la síntesis de las NPs y la fusión de las membranas celulares con las NPs. La tercera fase es la etapa más determinante de todo el proceso. Actualmente, en la literatura se mencionan principalmente dos métodos para la obtención de las NVs de membrana celular: extrusión y sonicación (Rampado, Caliceti, & Agostini, 2022). Es importante destacar que la ejecución completa del proceso debe llevarse a cabo de manera suave con el propósito

de preservar la estructura y bioactividad de los componentes proteicos de la membrana celular.

1.6.1. Extrusión

La extrusión se refiere a un proceso mediante el cual un material es forzado a través de un poro o una boquilla con una forma específica para producir un producto con una dimensión constante. Se utiliza un extrusor y un sistema auxiliar para producir un solo producto a partir de dos materiales diferentes, donde un material se extruye y se llena continuamente con otro. En aplicaciones clínicas, se utiliza una extrusión mecánica para fusionar las NPs preparadas con las membranas. Antes de la sonicación en el baño, se extruye la mezcla de membrana con NPs a través de membranas porosas de diferente tamaño varias veces. Después de una serie de extrusiones, las vesículas sobrantes se centrifugan y se eliminan, y los precipitados se recolectan para usar como productos finales.

1.6.2. Sonicación

La energía ultrasónica permite combinar la membrana celular y las NPs centrales en una nanoestructura núcleo-coraza. Este proceso aprovecha las ondas sonoras de alta frecuencia para inducir cavitaciones que provocan la desintegración y reconstitución de los fragmentos de membrana celular (Rampado et al., 2022). Esta estrategia tiene algunas ventajas como, por ejemplo, que apenas se pierde material en comparación con la extrusión; además, se pueden utilizar múltiples membranas al mismo tiempo, lo que permite incorporar las características de diferentes tipos de células. Por último, para lograr una configuración con una orientación de membrana adecuada y una energía óptima, se pueden utilizar combinaciones de membranas (con características como estabilidad y asimetría de carga) y NPs (Choi, Park, Park, Rhim, & Han, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.7. Aplicaciones de las Nanopartículas Cubiertas con Membrana Celular

Las NPs basadas en membrana celular han surgido como una innovación en la nanotecnología biomimética, combinando los avances en nanociencia con la complejidad funcional de las membranas celulares. Este enfoque capitaliza la capacidad de las membranas celulares para interactuar selectivamente con entornos biológicos, abriendo un conjunto de aplicaciones en diversos campos de la biomedicina. Desde la entrega de medicamentos de manera específica hasta la ingeniería de tejidos y la detección temprana de enfermedades, estas NPs ofrecen soluciones avanzadas que aprovechan el biomimetismo para mejorar la eficacia y la selectividad en aplicaciones biotecnológicas y médicas.

1.7.1. Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y la forma más común de demencia, afectando principalmente a personas mayores. Se caracteriza por pérdida de memoria, deterioro cognitivo, problemas de lenguaje, desorientación y cambios de comportamiento. Con el tiempo, los pacientes pierden la capacidad de realizar actividades diarias y se vuelven dependientes. La enfermedad está asociada con acumulaciones de proteínas en forma de fibras en el cerebro, como beta-amiloide y tau, y factores de riesgo incluyen la edad avanzada, antecedentes familiares y problemas de salud como enfermedades cardiovasculares y diabetes.

La generación de especies reactivas de oxígeno es uno de los primeros eventos en el desarrollo de esta patología, así que una de las estrategias para combatir esta enfermedad es la entrega de agentes antioxidantes a las células neuronales. Sin embargo, uno de los principales retos de esta enfermedad es la de atravesar la barrera hematoencefálica. Para ello, se han desarrollado sistemas basados en NPs lipídicas recubiertas con membrana celular de macrófagos con el propósito de poder atravesar esta barrera y poder entregar los compuestos bioactivos en el sitio de la afección (Y. Han et al., 2021). Long et al. prepararon liposomas de baicalina (BA-LP) modificados con

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

membrana de macrófagos (MA-BA-LP). La intensidad y duración de la fluorescencia en los cerebros de los ratones inyectados con el nanosistema marcado fluorescentemente (DiR) en las venas de la cola fueron sustancialmente mayores que en el grupo control. Los resultados obtenidos demostraron que los liposomas MA-BA-LP contaron con un mejor direccionamiento y acumulación en el cerebro que los liposomas sin el recubrimiento de membrana, BA-LP (Long et al., 2022). En otro trabajo, Dong et al. desarrollaron NVs derivadas de la membrana de neutrófilos que contenían el compuesto resolvín D2, un agente antiinflamatorio, para tratar la lesión cerebral postisquémica mediante la inhibición de la activación endotelial, la liberación de citocinas y la infiltración de neutrófilos en la lesión cerebral isquémica (X. Dong et al., 2019).

1.7.2. Cáncer

El cáncer continúa siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial. Los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud muestran que en 2022 se presentaron 20 millones casos nuevos de cáncer, y un total de 9.7 millones de muertes debido a esta enfermedad. Una de cada cinco personas desarrollará cáncer en su vida, y aproximadamente uno de cada nuevo hombres y una de cada doce mujeres mueren por esta enfermedad (WHO, 2024). Esta enfermedad se caracteriza por un crecimiento descontrolado y una proliferación anormal de células en el cuerpo. Las alteraciones genéticas que afectan la regulación normal del ciclo celular y la apoptosis provocan este proceso anómalo. De igual forma, las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y expandirse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o sanguíneo, produciendo tumores malignos, a esto se le denomina metástasis (Bray et al., 2018).

A pesar de las mejoras en el desarrollo de los fármacos quimioterapéuticos, estos tratamientos todavía provocan importantes efectos adversos en varios tejidos y órganos debido a su acumulación fuera del sitio/célula/tejido diana y a la resistencia a los medicamentos de las células tumorales. Los nanofármacos, referidos a la aplicación y empleo de nanotransportadores funcionalizados que encapsulan este tipo de fármacos u otro tipo de sustancias bioactivas para el tratamiento antitumoral, ofrecen una nueva

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

oportunidad para mejorar la eficiencia terapéutica, abriendo la puerta a terapias más personalizadas y efectivas, como se comentó con anterioridad (Misra, Acharya, & Sahoo, 2010).

Las NPs han demostrado ser un tratamiento prometedor para el cáncer, pero han surgido algunas limitaciones que complican su empleo en la práctica clínica. Por ejemplo, el sistema inmunológico puede eliminar las NPs antes de llegar a su destino, lo que reduce su eficacia, como se comentó en apartados anteriores. Además, la entrega selectiva a las células cancerígenas es difícil debido a la heterogeneidad tumoral y la variabilidad entre pacientes, lo que reduce la precisión. De igual forma, los posibles efectos secundarios y limitaciones surgen debido a la toxicidad inherente de algunas NPs, además de las dificultades en su producción a gran escala y su reproducibilidad de lote a lote (Shegokar & Nakach, 2020). Otro factor a tener en cuenta es la barrera hematotumoral, que dificulta la penetración efectiva en el tejido tumoral, así como el desarrollo de resistencia a lo largo del tiempo. A pesar de estas limitaciones, la investigación y el progreso tecnológico continúan trabajando para superar estas dificultades (Beh, Prajnamitra, Chen, & Hsieh, 2021).

Algunos de los nanosistemas basados en membrana celular para el tratamiento contra el cáncer constan de liposomas cargados con un fármaco anticancerígeno recubiertas con membrana celular de macrófagos, con el objetivo de dirigirse a las células cancerosas metastásicas a través de la interacción entre las integrinas α4 de la membrana del macrófago y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM1) de las células cancerosas. Estos estudios demostraron que el recubrimiento con la membrana celular aumentó la internalización de las NPs en las células cancerosas (Cao et al., 2016).

Otra aproximación que se ha evaluado es el recubrimiento de NPs con membranas de dos líneas celulares con el objetivo de aprovechar las propiedades de la membrana de ambas células. Un ejemplo consistió en el recubrimiento de NPs de PLGA cargadas con doxorrubicina, como agente anticancerígeno, recubiertas con membrana celular de macrófagos y de células de cáncer de mama (4T1). De esta forma se aprovecha el direccionamiento activo de los receptores de inflamación de los macrófagos y el direccionamiento homotípico de las células cancerosas (Gong et al., 2020).

USC DE COMPOSTELA

1.8. Aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares (CVDs) se definen como un conjunto de enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, como el corazón y los vasos sanguíneos; algunos ejemplos de este tipo de enfermedades son: la isquemia, las enfermedades coronarias, cerebrovasculares, arteriopatías periféricas y la cardiopatía reumática, entre otras, siendo otras originadas por eventos agudos como son los ataques al corazón o los ictus (Borén et al., 2020). Estas enfermedades continúan siendo la principal causa de muerte a nivel mundial, incluso por encima del cáncer, con 17.9 millones de decesos anualmente, lo que representa el 27% de las muertes totales a nivel mundial, según los datos más recientes de la organización mundial de la salud (OMS, 2019).

Así mismo, una de las principales afecciones y causa subyacente relacionada con las CVDs es la ateroesclerosis (AEs), la cual se caracteriza por ser una enfermedad crónica y compleja que involucra trastornos en el metabolismo de los lípidos y procesos inflamatorios del tejido vascular arterial. Este proceso comienza con una disfunción del endotelio vascular que puede ser provocado por distintos factores de riesgo como, por ejemplo, niveles elevados de colesterol y triglicéridos, presión sanguínea elevada, tabaquismo y/o diabetes. Esto permite que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se infiltren y se acumulen en el espacio subendotelial de las arterias. Con el tiempo, las LDL se oxidan (ox-LDL) generando inflamación en la zona y la sobreexpresión de receptores celulares relacionadas con el proceso inflamatorio endotelial como son la P-selectina, la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) promoviendo, así, el reclutamiento de monocitos a la zona afectada. Los monocitos logran penetrar la pared arterial y se diferencian en macrófagos. Los macrófagos fagocitan y acumulan lipoproteínas de muy baja densidad β (βVLDL), lipoproteínas de baja densidad acetiladas (AcLDL) y ox-LDL mediante los receptores de unión de eliminación (scavenger, en su denominación inglesa) transformándose, así, en células espumosas. Las células espumosas se acumulan en el área inflamada, y eventualmente mueren vía apoptosis y necrosis secundaria debido a la fagocitosis de la ox-LDL y a la hipoxia llevando, así, a la formación de un núcleo necrótico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De igual forma, los macrófagos secretan factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias que inducen la producción de colágeno y el crecimiento de las células de músculo liso de la matriz endotelial generando una placa fibromuscular. Los cambios estructurales sufridos progresivamente dan como resultado la formación de una cubierta fibrosa, que recubre un núcleo necrótico rico en lípidos que consta principalmente de ox-LDL, cristales de colesterol y desechos celulares. El crecimiento del núcleo necrótico y el adelgazamiento de la capa fibrosa conlleva finalmente a una oclusión arterial, potencial ruptura de la placa y trombosis.

La AEs es que se desarrolla sin presentar ningún síntoma hasta que ocurre un evento traumático o muerte súbita causada por la oclusión severa de un vaso o ruptura de la placa, por lo que la detección temprana es extremadamente importante para su tratamiento. Actualmente no existe un tratamiento o terapia específico contra esta enfermedad. La gran mayoría de las terapias actuales se basan en cambios en el estilo de vida tales como dejar de fumar, una dieta adecuada, actividad física, y todo ello acompañado de la administración sistémica de fármacos como la aspirina, que ayuda a licuar la sangre y disminuir la probabilidad de la formación de coágulos; medicamentos para regular la presión arterial; o algún fármaco de la familia de las estatinas que ayude a disminuir los niveles de colesterol en sangre, siendo este último el principal agente terapéutico para prevenir la AEs.

Las estatinas son una familia de fármacos, constituidos por siete compuestos diferentes: atorvastatina, fluvasatatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rousvastatina, y la simvasatatina. Su principal efecto terapéutico consiste en reducir los niveles de colesterol en sangre mediante el bloqueo de manera competitiva de la acción de la enzima 3-hidroxi-3metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa), la cual está implicada en gran medida en la síntesis de colesterol endógeno (Figura 12). Esto provoca que las células sobreexpresen receptores de LDL en su superficie generando, así, la disminución de colesterol en plasma.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

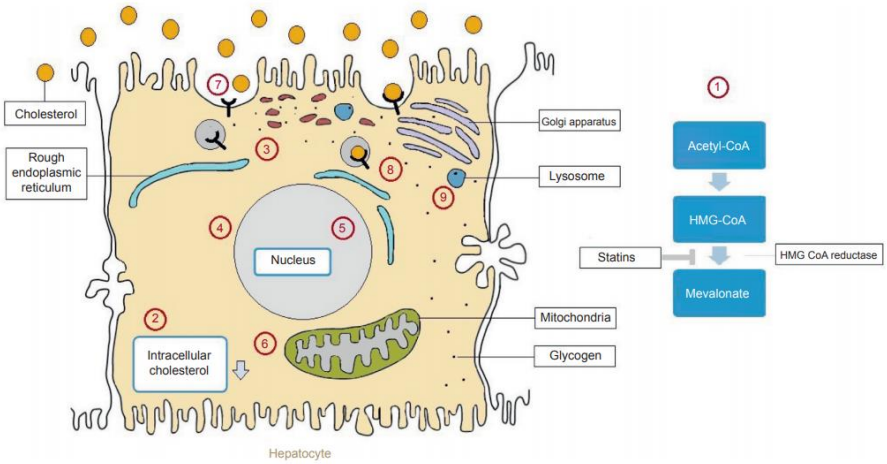


Figura 12. Mecanismo de acción de las estatinas (Sultan et al., 2019)

Sin embargo, aunque la regulación de los niveles de colesterol en sangre es el principal efecto terapéutico atribuido a las estatinas, también se ha comprobado que poseen otras propiedades terapéuticas como la antiinflamatoria, antioxidante y el aumento de los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) en plasma (Cerda, Hirata, & Hirata, 2012), a las que se les ha atribuido efectos antiaterogénicos. Así mismo, favorecen el transporte "reverso" del colesterol (RCT), esto es, el transporte de colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado donde posteriormente es metabolizado, ya sea para la obtención de moléculas necesarias para la función celular como ácidos biliares, vitamina D, hormonas sexuales como estradiol, progesterona, androsterona, testosterona, aldosterona y cortisol, o para funciones estructurales en las membranas celulares (Errico et al., 2013). Las estatinas tienen un efecto en el RCT debido a que actúan activando distintos genes implicados en este proceso, como: ABCA1, ABCG1, SCARB1, APOA1, LCAT, CETP, LPL, LIPIC, EL.

Por todos estos motivos, la administración oral de las estatinas es considerado uno de los mejores métodos terapéuticos para reducir el riesgo de desarrollar la placa aterosclerótica y, en consecuencia, una CVD. Sin embargo, el uso oral de estos fármacos presenta algunos inconvenientes como una baja biodisponibilidad, baja eficacia terapéutica, y potenciales efectos secundarios adversos como miopatías, daño hepático y renal, problemas digestivos y bajo recuento de plaquetas (Ward, Watts, & Eckel, 2019).

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8.1. Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos Para el Tratamiento de la Aterosclerosis

Gracias a las propiedades previamente descritas de las NPs como SCLF y sus avances en el tratamiento y diagnóstico del cáncer, se abren nuevas oportunidades para avanzar en el diagnóstico y tratamiento de otras enfermedades como la AEs. Se han desarrollado NPs con funciones específicas para esta enfermedad, como sistemas de entrega terapéutica y agentes de diagnóstico. Hoy en día, se han empleado seis tipos de nanomateriales en la nanomedicina para la AEs (Figura 13): micelas, liposomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbono y metales/óxidos metálicos cristalinos (Matoba, Koga, Nakano, Egashira, & Tsutsui, 2017).

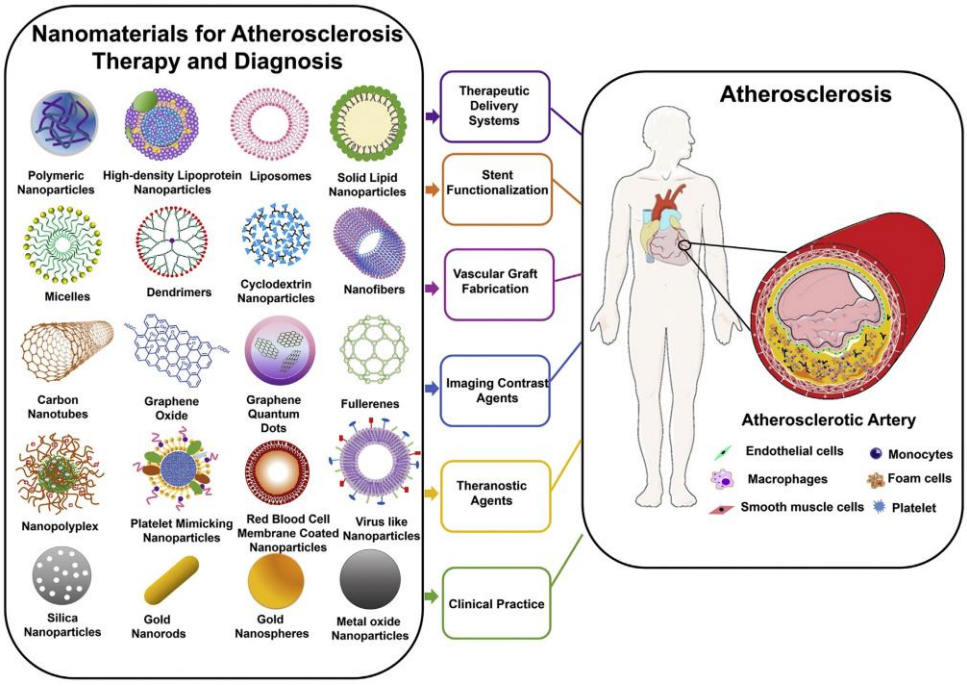


Figura 13. Nanomateriales para el tratamiento y diagnóstico de la aterosclerosis (J. Chen et al., 2021).

Como ocurre en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, la forma y tamaño de las NPs son beneficiosos para dirigirse a la vasculatura enferma. Por ejemplo, las nanofibras

autoensambladas de péptidos anfifílicos con un péptido de unión al colágeno IV se adhieren mejor a las lesiones vasculares que las nanoesferas con diámetro y secuencia de unión similares (Moyer et al., 2015). Por otro lado, también la elasticidad y composición de las NPs juega un papel preponderante para su direccionamiento y acumulación en los sitios ateroscleróticos. Por ejemplo, se ha demostrado que los nanogeles zwitteriónicos de poli(carboxibetaina) tienen un tiempo de circulación mayor a medida que disminuye su rigidez. Los nanogeles más blandos (180 kPa) mostraron un tiempo de circulación de aproximadamente 20 horas, el doble que los nanogeles más rígidos (1350 kPa), y una menor acumulación en el bazo (Lei Zhang et al., 2012).

Para localizar las NPs en sitios ateroscleróticos, se pueden usar estrategias de direccionamiento pasivo y activo, de manera similar al tratamiento del cáncer. El direccionamiento pasivo en la AEs aprovecha el efecto de permeabilidad y retención vascular mejorada (EPR) en el endotelio inflamado y la microvasculatura de la placa (Banquy et al., 2009). En la AEs en estado avanzado, las estrategias de direccionamiento pasivo explotan el aumento de la velocidad sanguínea en los puntos más estrechos de los vasos altamente ocluidos, lo que conduce a un mayor estrés de cizallamiento local (Korin et al., 2012) . Langer et al. demostraron en 2014 la utilidad del efecto EPR para dirigir NPs al tejido endotelial aterosclerótico. Utilizaron modelos in vitro e in vivo, mostrando que la mayor permeabilidad del endotelio aumentaba la acumulación de nanoesferas híbridas de lípido-polímero de 70 nm con núcleos de oro y PLGA recubiertos con lípidos PEGilados. En un modelo microfluídico con células endoteliales tratadas para aumentar la permeabilidad, se observó mayor acumulación de NPs. Esta observación se confirmó *in vivo* con la inyección de nanopartículas marcadas en conejos con AEs.

Por otro lado, el direccionamiento activo modifica la superficie de las NPs para incorporar ligandos que se dirigen a señales bioquímicas específicas del sitio de la placa, como proteínas en el endotelio inflamado, células espumosas de macrófagos y lípidos oxidados. Esto se logra mediante la incorporación de anticuerpos, oligonucleótidos y péptidos (Kelley, Safari, Lopez-Cazares, & Eniola-Adefeso, 2016). Tirrell et al. demostraron la efectividad del direccionamiento activo de NPs al endotelio usando micelas esféricas autoensambladas y PEGiladas de 17 ± 2 nm, que contenían el péptido VHPKQHR, dirigido al receptor VCAM-1. Estas micelas se unieron a placas ateroscleróticas tempranas en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ratones ApoE−/− en 24 horas, mostrando una unión significativamente mayor que las micelas de control PEG (Mlinar, Chung, Wonder, & Tirrell, 2014). Otra investigación mostró que NPs de poliestireno con anticuerpos contra ICAM-1, PECAM-1 y VCAM-1 (235 ± 6.8 nm) tenían una mejor internalización endotelial que las nanopartículas con solo anticuerpos contra ICAM-1 y PECAM-1 (272 ± 17 nm). Esto se debe a la activación de dos vías de captación: endocitosis mediada por clatrina (VCAM-1) y endocitosis mediada por moléculas de adhesión celular (ICAM-1 y PECAM-1) (Papademetriou, Tsinas, Hsu, & Muro, 2014).

1.8.2. Nanopartículas Para el Diagnóstico de la Aterosclerosis

El uso inicial de NPs para el diagnóstico de la AEs incluyó NPs de óxido de hierro con propiedades magnéticas como agentes de contraste vascular para resonancia magnética (RM) en los años 90. Weissleder et al. compararon la migración a través de la pared capilar y la vida media en sangre de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético ultra pequeño (USPIO) recubiertas de dextrano (diámetro de 2-5 nm) con nanopartículas de óxido de hierro de mayor tamaño, alrededor de 100 nm, AMI-25 (Weissleder et al., 1990). Por otra parte, se desarrollaron NPs miméticas a lipoproteínas de alta densidad (HDL) para la imagen de resonancia magnética, con afinidad por los macrófagos de las placas ateroscleróticas debido a apolipoproteínas (ApoA-I o ApoA-II). Estas partículas tienen ventajas como su pequeño tamaño (7-12 nm), componentes proteicos endógenos y biodegradables que no provocan reacciones inmunológicas, y evitan el reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) (Frias, Williams, Fisher, & Fayad, 2004).

Por otro lado, la tomografía computarizada (TC) se considera el método más clínicamente robusto y preciso para graduar la estenosis de las arterias coronarias y determinar la calcificación de la placa. Kim et al. prepararon un nuevo agente de contraste para TC basado en NPs de oro recubiertas con PEG para mejorar las limitaciones de los agentes de contraste basados en yodo (eliminación renal, toxicidad renal y permeación vascular). Estos investigadores observaron que las imágenes de TC de ratas utilizando las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

NPs recubiertas con PEG mostraban una clara delineación de los ventrículos cardíacos y los grandes vasos (D. Kim, Park, Jae, Yong, & Jon, 2007).

Las NPs también se utilizan en imagen fotoacústica para mejorar el contraste detectando la absorción óptica en los órganos. Las NPs de oro son especialmente efectivas debido a su resonancia plasmónica superficial. Por ejemplo, Kim et al. demostraron que nanocilindros de oro conjugados con anticuerpos contra ICAM-1 pueden detectar inflamación temprana en células endoteliales mediante imagen fotoacústica (K. Kim et al., 2007).

1.8.3. Nanopartículas para el Tratamiento de la Aterosclerosis

Actualmente, varios estudios han demostrado que diversos tipos de nanotransportadores, como NPs, pueden transportar moléculas terapéuticas a lesiones ateroscleróticas. Esto ha llevado a la reducción del tamaño de la lesión o a la mejora de la estabilidad de las placas vulnerables (Ka Wing Chan et al., 2017).

Los avances en el diseño de nanomateriales han permitido satisfacer necesidades terapéuticas específicas, incluyendo sistemas biosensibles capaces de detectar y responder a estímulos tanto internos como externos en áreas ateroscleróticas. Las nanopartículas pueden ser diseñadas para dirigirse a diversas etapas del proceso aterosclerótico, desde medidas preventivas como la restauración de la integridad vascular para reducir la penetración de lipoproteínas de baja densidad (LDL), hasta tratamientos avanzados como la ablación térmica para eliminar placas desarrolladas (P. Y. Chen et al., 2019). Así, la construcción de NPs dirigidas a células endoteliales activadas por flujo sanguíneo laminar o perturbado, como TFEB y TLR4 focal, reduce la activación endotelial y la adhesión de monocitos correspondiente (Qu et al., 2020).

En las aortas ateroscleróticas, el contenido de colesterol es significativamente mayor que en las sanas, aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares. El mecanismo de eflujo de colesterol desde las células espumosas está alterado en el tejido aterosclerótico. Una estrategia efectiva es el diseño de nanopartículas (NPs) que transporten y liberen fármacos para regular el metabolismo lipídico. Por ejemplo,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Duivenvoorden et al. desarrollaron NPs de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas cargadas con una estatina para inhibir la inflamación en placas ateroscleróticas. Este estudio demostró que un tratamiento de dosis bajas durante tres meses redujo la progresión de la inflamación de la placa, mientras que un régimen de dosis alta durante una semana disminuyó notablemente la inflamación en placas ateroscleróticas avanzadas (Duivenvoorden et al., 2014).

Otra estrategia terapéutica prometedora es intervenir en estadios tempranos del proceso inflamatorio mediante la administración de lípidos pro-resolutivos y mediadores proteicos como lipoxinas e IL-10 en lesiones ateroscleróticas. Esto ha demostrado beneficios al reducir la acumulación de células inflamatorias, promover su migración fuera de la placa, aumentar la fagocitosis de células muertas en el núcleo necrótico y facilitar la reparación del tejido dañado (Fredman et al., 2016).

1.8.4. Nanopartículas para la Teragnóstica de la Aterosclerosis

Recientemente, ha aumentado el interés en agentes teragnósticos que combinan funciones terapéuticas y diagnósticas en una sola entidad. Esta estrategia emergente podría mejorar la eficacia del tratamiento y el diagnóstico simultáneamente, mientras se reducen los efectos secundarios en el contexto de la AEs. Como se mencionó anteriormente, es crucial diagnosticar y tratar las placas vulnerables en la AEs antes de que se manifiesten clínicamente. Los macrófagos han surgido como un objetivo biológico, de imagen y terapéutico fundamental para esta enfermedad.

Weissleder et al. desarrollaron NPs teragnósticas usando nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIONs) recubiertas con dextrano y conjugadas con Alexa Fluor 750. Integraron el fotosensibilizador 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenil-2,3-dihidroclorina (TPC) con las SPIONs fluorescentes para la fototerapia de placas mediante radicales de oxígeno singlete citotóxicos. Este nanosistema demostró una eliminación altamente eficiente de macrófagos murinos y humanos in vitro, detectable mediante resonancia magnética (MRI) y fluorescencia cercana al infrarrojo (McCarthy, Jaffer, & Weissleder, 2006).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Por otro lado, Choi et al. desarrollaron NPs teragnósticas, denominadas MacTNPs, dirigidas a macrófagos y sensibles a especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas NPs pudieron inducir fototoxicidad en los macrófagos y activar la fluorescencia mediante fotosensibilizadores (Ce6), que también podían ser desactivados. Las MacTNPs se sintetizaron mediante autoensamblaje de moléculas anfifílicas sensibles a ROS, HA-Ce6. En estudios in vitro, se observó que las NPs de HA-Ce6 activaban la fluorescencia y causaban la muerte de macrófagos cuando se activaban con luz de 670 nm en células RAW264.7 (H. Kim, Kim, Kim, Kim, & Choi, 2014). Courrol et al. desarrollaron nanoesferas de oro con ácido aminolevulínico (ALA) como fotosensibilizador y sonosensibilizador para terapia fotodinámica y sonodinámica de la AEs. La administración de ALA externamente aumentó la acumulación de protoporfirina IX fluorescente (PpIX) en macrófagos, sirviendo como indicador de contenido macrofágico en la placa. Demostraron un incremento en fluorescencia de PpIX en macrófagos THP-1 tras incubación con nanoesferas de ALA-Au (de Oliveira Gonçalves, Vieira, & Courrol, 2018).

La sofisticada construcción de muchas nanoplataformas, con múltiples modificaciones superficiales y entrega de cargas terapéuticas, conlleva costos elevados, procesos de fabricación complejos, control de calidad difícil y problemas de estabilidad durante el almacenamiento. Estos desafíos dificultan la fabricación a gran escala y la reproducibilidad entre lotes. Además, las propiedades fisicoquímicas heterogéneas de los nanomateriales pueden afectar sus interacciones subcelulares y sus posibles efectos tóxicos a corto y largo plazo deben ser más investigados. No obstante, es crucial evaluar la estabilidad de las plataformas bajo condiciones fisiológicas y de almacenamiento (como la liofilización) para facilitar su administración. Para avanzar en la aplicación clínica, es necesario simplificar las formulaciones y mejorar la administración de los nanotransportadores.

1.8.5. Nanopartículas Biomiméticas para el Tratamiento de la Aterosclerosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Las NPs biomiméticas pueden representar una innovadora estrategia en el tratamiento de la AEs. Estas NPs, diseñadas para mimetizar las características de las

células de origen, pueden dirigirse específicamente a las placas ateroscleróticas. Gracias a su biocompatibilidad y capacidad de evadir el sistema inmunológico, ofrecen una prometedora alternativa para la administración de fármacos, mejorando la eficacia del tratamiento y reduciendo los efectos secundarios. Este enfoque abre nuevas posibilidades en la lucha contra una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el número de investigaciones en este campo hasta el momento es bastante reducido. Así, por ejemplo, Li et al. desarrollaron un nanosistema basado en NVs obtenidas a partir de células mesenquimales, las cuales se recubrieron con membrana celular de plaquetas combinando, por un lado, el direccionamiento activo ofrecido por la membrana de las plaquetas, puesto que estas están involucradas en el desarrollo de la AEs como se comentó con anterioridad, y el potencial efecto antiinflamatorio de NVs de las células mesenquimales, respectivamente (Q. Li et al., 2023). En otro estudio, Wang et al. desarrollaron NPs de PLGA que encapsulaban el fármaco rapamicina, el cual cuenta con propiedades antiinflamatorias, actividad antiproliferativa y activación de la autofagia. Posteriormente recubrieron estas NPs poliméricas con membrana celular de macrófagos debido a su implicación en el desarrollo de la AEs. Sus ensayos demostraron que el sistema cuenta con una buena liberación del fármaco, biocompatabilidad y acumulación en la placa aterosclerótica (Y. Wang et al., 2021). Gao et al. también utilizaron membranas derivadas de macrófagos para recubrir NPs poliméricas y lograron una mayor eficacia terapéutica en el tratamiento de la AEs. En su estudio, produjeron un núcleo polimérico interno sensible a la presencia de especies reactivas de oxígeno para lograr la liberación a demanda del fármaco modelo encapsulado. La estrategia de recubrimiento con membrana de macrófagos no solo facilitó la evasión de las NPs del sistema inmune, sino que también ayudó a la entrega dirigida del principio activo en la zona de la lesión aterosclerótica, donde el fármaco se liberó rápidamente debido al entorno oxidativo de la lesión aterosclerótica. Además, las membranas de macrófagos captaron citoquinas pro-inflamatorias, lo que ayuda a restringir la inflamación local adicionalmente (C. Gao et al., 2020ª).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.9. Retos de las Nanopartículas Cubiertas con Membrana Celular

A pesar de sus propiedades y diferentes aplicaciones, el recubrimiento con membranas celulares cuenta con varios desafíos, pueden surgir dos cuestiones importantes en la fabricación de nanomateriales recubiertos con membranas celular: 1) si la membrana celular se recubre con éxito en el núcleo y 2) si la orientación del recubrimiento de la membrana celular en los nanomateriales es correcta. Para ampliar la plataforma biomimética a escala piloto, es esencial desarrollar métodos de fabricación sencillos y viables (W. L. Liu et al., 2020). En ocasiones, surgen problemas durante la producción de grandes volúmenes que dificultan el control de las características deseables, como el tamaño de las partículas y su distribución. Además, se deben realizar estudios de estabilidad a largo plazo en diferentes condiciones de almacenamiento para comprobar la eficacia y la estabilidad durante el almacenamiento (Ai et al., 2021). De igual forma, la consideración de dos limitaciones importantes, la inversión de costo y tiempo es crucial y, por lo tanto, se debe desarrollar un método reproducible y robusto para tales formulaciones. Además de los estudios preclínicos, es importante realizar estudios clínicos tempranos para confirmar la seguridad y eficacia de las NPs biomiméticas antes de ser utilizadas a escala comercial.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el diseño, producción, caracterización y evaluación de diversos nanosistemas biomiméticos formados a partir de la extracción de membranas celulares, bien en la forma de nanovesículas o como recubrimientos de otro tipo de nanopartículas, y con un potencial empleo terapéutico en el tratamiento de la aterosclerosis gracias al mantenimiento de las propiedades bioactivas provenientes y mantenidas de las células madre completas como son la señalización celular, el direccionamiento activo homotípico, la evasión del sistema inmune y los tiempos de circulación elevados.

En el capítulo 3 se presenta el diseño, caracterización y aplicación de nanovesículas obtenidas a partir la extracción de la membrana celular de macrófagos en las cuales se encapsuló una estatina, la pravastatina, para el tratamiento de la aterosclerosis. El objetivo general de este capítulo es estandarizar un protocolo de síntesis de estas nanovesículas cargadas con el fármaco para ser empleadas como nanotransportador capaz de encapsular de manera eficiente el compuesto bioactivo, así como liberarlo de manera sostenida en el sitio de interés aprovechando la capacidad de direccionamiento activo y de evasión del sistema inmune que le confiere al nanovehículo la naturaleza de su membrana celular. Los objetivos específicos de esta parte de la tesis son:

- Estandarizar el proceso de obtención de las nanovesículas biomiméticas obtenidas a partir de la extracción de la membrana celular de macrófagos murinos RAW 264.7 optimizando, para ello, el número de extrusiones, tamaño de poro de la membrana de extrusión y contenido proteico, con el fin de alcanzar concentraciones de nanovesículas por lote de ca. $1.0 \cdot 10^8$-$1.0 \cdot 10^9$ nanovesículas/mL con un tamaño hidrodinámico de ca. 200-250 máximo y carga superficial negativa superior a -20.0 mV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Obtener nanovesículas que encapsulen de manera eficiente el fármaco pravastatina en importantes cantidades, ofreciendo un medio de protección a la carga bioactiva, así como una liberación sostenida en el sitio de acción terapéutica.
- Evaluar la biocompatibilidad del sistema desarrollado, analizando su potencial citotoxicidad y eficiente internalización celular dirigida en diferentes líneas celulares (macrófagos murinos RAW 264.7 activados y no activados, células HeLa de cáncer cervical humano, fibroblastos de ratón Balb/c 3t3, y células mesenquimales adiposas humanas, adMSCs), así como la el análisis de potenciales reacciones adversas como la potencial inducción de especies reactivas de oxígeno y/o la existencia de procesos inflamatorios tras la administración del nanosistema.
- Evaluar la actividad terapéutica del nanotransportador en cultivos de macrófagos murinos RAW 264.7 activados.

En la siguiente parte de la tesis, Capítulo 4, se diseñaron y desarrollaron dos nanosistemas más complejos en los que se combinan terapia y diagnóstico en una misma plataforma (sistema teragnóstico) para el tratamiento de la aterosclerosis. Estos nanotransportadores teragnósticos se formaron mediante un núcleo de una matriz polimérica del polímero PLGA y un recubrimiento biomimético elaborado a partir de la membrana celular extraída de macrófagos murinos RAW 264.7. Para proveer de la capacidad de bioimagen por resonancia magnética, se encapsularon nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro como agente de diagnóstico en el seno del núcleo polimérico, y para la acción terapéutica también en ese mismo núcleo se incorporó un fármaco de la familia de las estatinas, bien pravastatina (compuesto hidrofílico) o atorvastatina (hidrofóbico). Los objetivos específicos de esta parte de la tesis consisten en:

- Sintetizar las partículas superparamagnéticas de óxido de hierro mediante el método de descomposición térmica y caracterizarlas estructural y fisicoquímicamente por una variedad de técnicas experimentales (e.g.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

difracción de rayos X, susceptibilidad magnética, imágenes de microscopía electrónica de transmisión, etc)

- Obtener nanopartículas de PLGA capaces de encapsular de manera simultánea y eficiente de las partículas superparamagnéticas y el fármaco, y recubrirlas con extractos de membrana celular proveniente de macrófagos murinos.
- Caracterizar estructural y físico-químicamente las nanoplataformas obtenidas mediante un conjunto de técnicas experimentales (e.g., dispersión dinámica de luz, potencial-zeta, susceptibilidad magnética, microscopía electrónica, etc).
- Evaluar la biocompatibilidad celular de las nanoplataforma desarrolladas en cultivos 2D de diversas líneas celulares.
- Analizar las capacidades terapéuticas y de contraste de imagen de las plataformas desarrolladas.

Uno de los principales retos en la actualidad es la evaluación biológica de nanosistemas desarrollados para luchar contra la aterosclerosis debido a que resulta complicado, por no decir imposible, simular de manera adecuada tanto las condiciones hemodinámicas como la estructura y composición de una placa de ateroma o de torrente sanguíneo en cultivos celulares 2D y 3D, y los modelos animales presentan importantes restricciones éticas además de ser extremadamente costosos y laboriosos. Por ello, en el capítulo 5 de esta tesis, se ha analizado un dispositivo de microfluídica como potencial modelo avanzado para reproducir las condiciones hemodinámicas y fisiológicas del tejido endotelial inflamado, precursor de la formación de la placa de ateroma. Los objetivos específicos de este capítulo son:

- Optimizar las condiciones experimentales para la formación de las estructuras celulares, así como los flujos hemodinámicos adecuados en los chips de microfluídica, esto es, determinando la presión necesaria para obtener el esfuerzo de cizalla biológicamente relevante.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Evaluar los efectos terapéuticos de los nanosistemas desarrollados en cultivos celulares hemodinámicamente activos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Las líneas celulares de fibroblastos de embrión de ratón Balb/c 3t3, células de cáncer cérvico uterino HeLa y macrófagos de ratón RAW 264.7, 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina marcado con Atto 488, Triton™ X-100 y formaldehído (HCHO), hidrato de sal sódica de pravastatina y atorvastatina cálcica, acetilacetonato de hierro (III) ($Fe(acac)_3$, ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), oleilamina ($C_{18}H_{35}NH_2$), 1,2-hexadecanedio, éter bencílico ($C_{14}H_{14}O$) y tolueno ($C_6H_5CH_3$), ácido (D, L-láctico-co-glicólico) de Mw ≈ 7,000 – 17,000 kDa, poli(vinil alcohol) 80 % hidrolizado Mw ≈ 9,000 – 10,000 kDa, acetona (CH_3COCH_3), y metanol (CH_3OH) fueron suministrados por Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos).

Las células madre mesenquimales adiposas, medio de cultivo Dullbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 0.1 mM aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y un 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina, tripsina 0.25% con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), solución tampón salino fosfato (PBS) pH 7.4 (10X), kit de ensayo de Coomassie Plus de Pierce (#23236), tabletas inhibidoras de proteasas (#A32953), 22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-il) Amino)-23,24-Bisnor-5-Colen-3β-Ol (NBD-Colesterol), lipoproteína de baja densidad oxidada (OxLDL) y disolución tampón de lisis y extracción celular RIPA fueron suministrados por ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

El kit de conteo celular y citotoxicidad CCK-8 fue suministrado por Dojindo (Japón).

Las células endoteliales de aorta de rata, el medio de cultivo endotelial suplementado con 5% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de suplemento de crecimiento endotelial y 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina fue suministrado por Innoprot (España).

USC UNIVERSIDADE

Los tintes 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) con antifade Pro-Long Gold), Alexa Fluor™ Faloidina 647 y anti-CD106-PE anticuerpo monoclonal (anti-VCAM), kit de ensayo fluorométrico de especies reactivas de oxígeno, y el anticuerpo anti-CD49d (#17-1490-82) fueron suministrados por Invitrogen (Estados Unidos).

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo de Macrófagos RAW 264.7

Los macrófagos murinos RAW 264.7 fueron comprados de Cell Biolabs (San Diego, USA). Las células RAW 264.7 fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v), y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina y 1% (v/v) de aminoácidos esenciales. Las células fueron incubadas a 37°C, con 5% de CO_2 y 90% de humedad.

2.2.2. Síntesis y Caracterización de Nanovesículas de Macrófagos RAW 264.7

2.2.2.1. Síntesis de Nanovesículas

La obtención de las membranas celulares se realizó siguiendo un protocolo previamente reportado con ligeras modificaciones (Hu et al., 2015). Primero, el concentrado de células RAW 264.7 se resuspendió en una disolución de PBS 0.25X con una tableta de inhibidores de proteasas. Posteriormente, los extractos se congelaron a -80 °C en nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño a 37 °C, repitiendo este ciclo cuatro veces. Posteriormente, los extractos celulares fueron sonicados durante 5 min en un vial de vidrio tapado utilizando un baño sonicador Branson Ultrasonics CPX952219R (Estados Unidos) a una frecuencia de 42 kHz y una potencia de 100 W para después ser centrifugados a 700 rcf durante 10 min para precipitar los organelos más grandes (núcleos y mitocondrias); a continuación, se recuperó el sobrenadante para posteriormente volver a ser centrifugado a 15,000 rcf durante 30 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua. Finalmente, los fragmentos de membrana celular se sometieron a 10 ciclos de extrusión utilizando un extrusor de liposomas Lipex (Evonik, Alemania) (Figura 14) a través de una membrana de policarbonato de 800 nm de tamaño de poro para obtener las nanovesículas biomiméticas conformadas por la membrana celular de los macrófagos, también llamadas nanocélulas artificiales.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

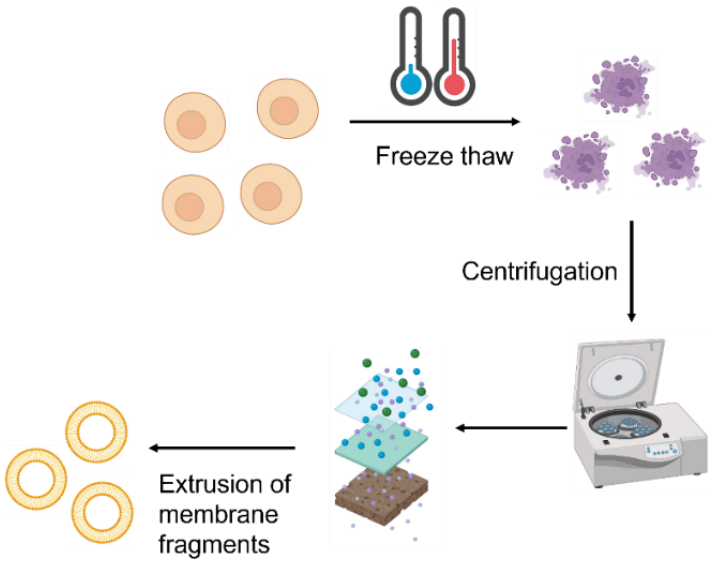


Figura 14. Proceso de síntesis de las nanovesículas de macrófagos RAW 264.7.

2.2.2.2. Caracterización Físico-Química de las Nanovesículas Biomiméticas

2.2.2.2.a. Dispersión de Luz Dinámica

Se determinó el diámetro hidrodinámico (D_H) de las nanovesículas biomiméticas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un equipo Nano Zs (Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). El D_H se determinó aplicando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \qquad (1)$$

donde k es la constante de Boltzman, T es la temperatura, η la viscosidad de la disolución y D el coeficiente de difusión de las nanopartículas en disolución. Las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediciones se realizaron por quintuplicado con un tiempo de muestreo de 120 s cada uno y realizando su promedio.

2.2.2.2.b. Potencial ζ

El potencial ζ fue medido utilizando un equipo Nano Zs (Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). El instrumento determina la movilidad electroforética de las partículas y lo convierte a potencial ζ utilizando la expresión de Smoluchowski:

$$\alpha = \varepsilon \frac{\zeta}{\eta} \qquad (2)$$

donde α, ε, y η denotan la movilidad electroforética, la permitividad y la viscosidad del medio, respectivamente. Cada muestra se inyectó en el interior de una celda zeta de medida desechable. Las mediciones se iniciaron una vez alcanzado el equilibrio térmico a 25 °C. Los valores fueron reportados en milivoltios (mV).

2.2.2.2.c. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, de sus siglas en inglés) fue utilizado para determinar la concentración de nanovesículas obtenidas a partir de un número inicial de 20 millones de células. La muestras fueron analizadas utilizando un equipo NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado con un láser de 488 nm, una cámara sCMOS. Para introducir las muestras en el equipo se empleó una bomba con jeringa. Todas las medidas se realizaron a 25 °C. Las muestras se diluyeron en agua MiliQ filtrada para obtener un volumen final de 1 mL, y se cargaron en la cámara de medición a un flujo de 50 µL/min. Las mediciones se obtuvieron grabando tres vídeos de 60 s para cada una. El software NanoSight NS300 fue utilizado para analizar las muestras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.2.2.d. Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue utilizada para determinar el tamaño y morfología de las nanovesículas formadas. Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 (Tokio, Japón). Las muestras se depositaron en una película de 3-4 nm de grosor de carbono amorfo soportado por una rejilla de cobre de 400 µm. Las muestras se prepararon depositando una gota (20 µL) de cada muestra, se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, posteriormente se secó el exceso de muestra con papel de filtro. A continuación, se tiño la muestra con una disolución de 2 (w/v) de ácido fosfotúngstico, eliminándose el exceso con dos lavados con agua Milli-Q y posterior secado a temperatura ambiente.

2.2.2.2.e. Cuantificación de Proteínas

Para la cuantificación de proteínas en las células completas y en las NVs obtenidas se utilizó el ensayo de Bradford (Kit de Ensayo Coomassie Plus de Pierce; Thermo Fisher Scientific #23236). Brevemente, como curva de calibración se utilizaron 150 µL de muestras estándar de albúmina diluida (disolución stock estándar de BSA a 2 mg/mL) en un rango de trabajo de 1–25 µg/mL. 50 µL de las NVs ($9.6x10^9$ NVs/mL) se mezclaron con 150 µL del reactivo Coomassie en una microplaca de 96 pocillos y, a continuación, se midió su absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas Fluorostar Omega (BMG Labtech, Alemania).

2.2.2.2.f. Determinación del Receptor CD 49d

Para comprobar la presencia y adecuada conformación del receptor CD 49d en las NVs, tanto las células de macrófagos de ratón RAW 264.7 y las NVs fueron marcadas con anticuerpos anti-CD 49d marcados fluorescentemente (Invitrogen #17-1490-82). Para ello, 50 µL de células ($10x10^4$ células/mL), 50 µL de NVs ($9.6x10^9$ NVs/mL) se mezclaron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

con 150 µL de la disolución de anticuerpos (5 µg/mL). Después de incubación durante 1 h, las células y las NVs fueron medidas con un citómetro de flujo Guava easyCyte BG HT (Cytek Biosciences, California, Estados Unidos), utilizando un láser a 651 nm como fuente de excitación y recolectando la fluorescencia de la muestra a 660 nm, respectivamente. La presencia del receptor CD 49d en las células y las NVs se analizó en función del promedio de intensidad de fluorescencia por célula y la cantidad de luz dispersada de manera lateral.

2.2.3. Nanovesículas Biomiméticas Cargadas con Pravastatina

2.2.3.1. Síntesis de Nanovesículas Biomiméticas Cargadas con Pravastatina

Para la encapsulación de fármaco se siguió el mismo protocolo previamente descrito para la obtención de las nanovesículas biomiméticas. Una vez obtenidos los fragmentos de membrana celular estas se sometieron a tres ciclos de extrusión. Posteriormente, se añadieron distintos volúmenes de una disolución de pravastatina de 10 mg/mL (1.5, 1.0, 0.5 mL) y se completaron las diez las extrusiones. Las nanovesículas obtenidas se caracterizaron mediante las mismas técnicas fisicoquímicas (dispersión de luz dinámica, potencial ζ y microscopía electrónica de transmisión) descritas anteriormente.

2.2.3.2. Cuantificación de Pravastatina Encapsulada en las Nanovesículas Biomiméticas

Para realizar la cuantificación del fármaco pravastatina encapsulado en el seno de las nanocélulas artificiales se empleó la técnica de espectroscopía de luz ultravioleta-visible. 10 mL de las nanovesículas cargadas con el fármaco se introdujeron en membranas de diálisis (Spectrum™ Labs Spectra/ Por™ 3.5 kD MWCO Standard RC Tubing) dispuestas en un matraz con 50 mL de agua MiliQ durante toda la noche para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

eliminar el excedente de fármaco no encapsulado. La cantidad de pravastatina en el sobrenadante se determinó por medio de espectroscopía de UV-Vis con un espectrofotómetro Jasco V750 (Tokio, Japón), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 238.5 nm. La %EE y el %DL se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%\mathrm{EE} = \frac{(\text{Masa de droga total} - \text{Masa de droga libre})}{\text{Masa de droga total}} \text{ X } 100\% \qquad (3)$$

$$\%\mathrm{DL} = \frac{(\text{Masa de droga total} - \text{Masa de droga libre})}{\text{Masa de NPs de PLGA}} \text{ X } 100\% \qquad (4)$$

2.2.3.3. Análisis de Liberación de Pravastatina

La liberación de la estatina fue evaluada en las NVs cargadas con PRA con el objetivo de comprender más a fondo el comportamiento que tendría dentro del organismo. Para ello, se emplearon membranas de diálisis y PBS 7.4 como medio de liberación a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo. Para ello, se colocaron 3.0 mL de la suspensión en bolsas de diálisis, que posteriormente se colocaron en 30 mL de PBS 7.4 a 37 °C. El ensayo se llevó a cabo durante 72 h, tomando alícuotas de 1.0 mL y siendo repuestas con un volumen igual de PBS 7.4 a determinados tiempos. La cantidad de PRA liberada fue determinada utilizando una curva de calibración obtenida a partir de espectroscopía de UV-Vis midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 238 nm. La información obtenida de la liberación fue ajustada al modelo matemático de Weibull (Pourtalebi Jahromi, Ghazali, Ashrafi, & Azadi, 2020ª):

$$\frac{\mathrm{pra_{Lib}}}{\mathrm{pra_{Total}}} = 1 - (\mathrm{e}^{-\mathrm{bx}^{\mathrm{a}}}) \qquad (5)$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

donde PRA_{Lib} es la PRA liberada a un cierto tiempo, PRA_{Total} es la PRA encapsulada en las NPs de PLGA, a y b son constantes cinéticas que describen el tipo de liberación que se está llevando a cabo.

2.2.3.4. Ensayos de Estabilidad Coloidal

Para evaluar la estabilidad coloidal de las nanovesículas cargadas con pravastatina se empleó la técnica de dispersión de luz dinámica realizando un seguimiento del diámetro hidrodinámico y del índice de polidispersidad de las nanopartículas biomiméticas a lo largo de 72 h en tres medios distintos, agua, disolución tampón PBS pH 7.4 y medio de cultivo celular DMEM suplementado con de suero fetal bovino 10% (v/v).

2.2.3.5. Caracterización Biológica

2.2.3.5.a. Viabilidad Celular

La citotoxicidad de las vesículas obtenidas fue evaluada en las líneas celulares de macrófagos RAW 264.7, células de cáncer cérvico uterino humano HeLa, fibroblastos de ratón Balb/c 3t3 y células madre mesenquimales adiposas (adMSCs). Los ensayos se realizaron mediante el método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio WST-8 (ensayo CCK-8) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Este proceso produce un colorante amarillo de formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazán generado por la actividad de la deshidrogenasa de las células es directamente proporcional al número de células vivas. Para ello, las células fueron subcultivadas en una placa de 96 pozos a una densidad de $10x10^3$ células por pozo. Tras 24 h de incubación se administraron las vesículas cargadas con pravastatina y vacías a las células en el rango de concentraciones de $1x10^7$-$1x10^4$ vesículas/µL. La citotoxicidad fue medida tras 24 y 48 h de incubación agregando tras lavado con PBS 100 µL de una mezcla de medio de cultivo (90 µL) y reactivo CCK-8 (10 µL) a cada pozo e incubando durante 1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

h. Posteriormente, la absorbancia fue medida a 450 nm. La viabilidad celular fue determinada tomando en cuenta la cantidad de CCK-8 convertido a formazán y calculada como porcentaje de viabilidad comparada con el grupo control (Almada et al., 2017) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \frac{(\text{Abs de la muestra})}{(\text{Abs del blanco})} \text{ x100} \qquad (6)$$

2.2.3.5.b. Internalización Celular

Para los ensayos de internalización celular, las NVs fueron marcadas con un fosfolípido fluorescente que se incorpora en la bicapa lipídica. En este caso, en particular, se empleó el 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetalonamina (DOPE) marcado con la sonda fluorescente Atto 488 (DOPE-Atto488, Sigma Aldrich™ #67335).

2.2.3.5.b.1. Citometría de Flujo

Para la determinación de los niveles de internalización celular mediante citometría de flujo, se sembraron células de macrófagos de ratón RAW 264.7, células de cáncer cérvico uterino humano (HeLa) y fibroblastos BALB/c 3t3 en placas de 24 pocillos (50,000 células/pozo) en 0.5 mL de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) durante 24 h. Pasado este tiempo, las células fueron expuestas a las nanovesículas (100 µL, $9x10^9$ NVs/mL) durante 3 ó 6 h de incubación. Después de la exposición, las células fueron lavadas con 0.5 mL de PBS por pocillo. A continuación, las células fueron tripsinizadas con 75 µL de tripsina-EDTA 0.25%. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 1,000 g durante 3 min y redispersadas en 0.2 mL de medio de cultivo DMEM. Las medidas se realizaron con un citómetro de flujo Guava easyCyte BG HT (Cytek Biosciences, California, Estados Unidos), utilizando un láser azul de 488 nm como fuente de excitación. Se empleó disolución tampón de PBS pH 7.4 como blanco antes de cada

medición. La internalización de las nanovesículas se analizó en función del promedio de intensidad de fluorescencia por célula y la cantidad de luz dispersada de manera lateral.

2.2.3.5.b.2. Microscopía de Fluorescencia

Para el análisis microscopia de fluorescencia y microscopía confocal, se sembraron células RAW 264.7, HeLa, Balb/c 3t3 y mesenquimales sobre cristales cubiertos de poli-L-lisina (12x12 mm^2) colocados dentro de placas de 6 pozos (3 mL, $1x10^5$ células por pozo) durante 24 h a condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se añadieron los volúmenes de nanovesículas (50, 25, 12.5 y 6.25 µL) a una concentración de 10^9 NVs/mL y se dejaron incubando durante 3 ó 6 h. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS pH 7.4 a 4 °C, se fijaron con paraformaldehído 4% (w/v) durante 10 min y nuevamente se lavaron con PBS. A continuación, se añadió 0.2% (v/v) de Triton X-100, se lavaron las células dos veces más con PBS, y se tiñeron con 30 µL de Alexa Fluor™ Faloidina 647 0.5% (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos) durante 20 min. Después, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, se montaron en portaobjetos de vidrio, se tiñeron con 30 µL de DAPI Pro-Long Gold (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos) y se refrigeraron durante 24 h a-20 °C. Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg Mannheim, Alemania) con un objetivo 40X, donde el canal azul corresponde a DAPI (λ_{ex} = 355 nm), el canal rojo a la Alexa Fluor™ Faloidina (λ_{ex} = 647 nm) y el canal verde a la sonda ATTO DOPE (λ_{ex} = 488) mientras que la luz transmitida se observó en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC).

2.2.3.5.c. Generación de Especies Reactivas de-Oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno en macrófagos murinos RAW 264.7, células de cáncer cérvico uterino humano HeLa, fibroblastos de ratón Balb/c 3t3 y células mesenquimales después de la adición de las NVs fue analizada por medio de un kit de ROS basado en una molécula fluorescente, la 5(6)-Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína

USC

diacetato (DFCA-DA). Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos durante 24 h. Pasado este tiempo, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 y, a continuación, se agregaron los volúmenes de las nanovesículas (50, 25, 12.5 y 6.25 µL) a una concentración de 10^9 NVs/mL y las células se incubaron durante otras 24 h adicionales. Posteriormente, se analizó la producción de ROS utilizando el kit correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Estados Unidos). El ensayo se basa en la oxidación del 2',7'-diclorodihidrofluorosceina por parte de las ROS presentes, generando un compuesto fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ROS generadas, y se empleó un lector de placas Fluorostar Omega (BMG Labtech, Alemania) utilizando los filtros de λ_{ex} = 485 nm y λ_{em} = 520 nm para su detección.

2.2.3.5.d. Liberación de Colesterol

Para evaluar la potencial capacidad terapéutica de las nanovesículas cargadas con pravastatina se realizó un ensayo de liberación de colesterol intracelular. Para ello, macrófagos RAW 264.7 fueron incubados con 10 µg/mL de oxLDL y 5 µM NBD-Colesterol durante 24 h. Posteriormente, las células fueron lavadas y tratadas con PRA libre a una concentración de 100 nM, y las NVs + PRA de igual forma a una concentración de fármaco también de 100 nM por otras 48 h. El medio celular fue recolectado y las células lisadas con tampón de lisis RIPA. El contenido de NBD-colesterol en el medio y en las células lisadas fue medido en un lector de microplaca a una longitud de excitación y emisión de 469 nm y 537 nm, respectivamente. El porcentaje de liberación de colesterol se reporta con la siguiente ecuación:

$$\%\text{Col Liberado} = \frac{\text{Col en el medio}}{(\text{Col en medio}+\text{Col en células})} \text{X}100 \qquad (7)$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.3.5.e. Cuantificación de IL-1β en Macrófagos RAW 264.7

La capacidad antiinflamatoria de las NVs + PRA se analizó midiendo la inhibición de la producción de la citocina inflamatorias IL-1β producida por macrófagos RAW 264.7 de ratón tras su exposición a LPS. Así, los macrófagos se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $10x10^4$ células/pocillo. Después de 24 h de incubación, las células se trataron con 100 ng/mL de LPS durante 24 h; posteriormente, las células se lavaron dos veces con 10 mM de PBS frío a pH 7.4, y se añadieron 100 µL de una disolución de NVs vacías, PRA libre (100 nM) y NVs + PRA (100 nM) a las células, incubándolas durante 24 h adicionales. Después de la incubación, el medio de cada pocillo se recogió y analizó para cuantificar la cantidad de citocina proinflamatoria IL-1β mediante un kit ELISA para IL-1β (Proteintech, #KE20021), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un lector de placas Fluorostar Omega (BMG Labtech, Alemania). Las medidas se realizaron al menos por quintuplicado.

2.2.4. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita

2.2.4.1. Síntesis de las Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita

Las SPIONS fueron sintetizadas por el método de descomposición térmica. Para ello, se mezclaron 1,059g de $Fe(acac)_3$ (3 mmol) con 1,695 g de ácido oleico (6 mmol), 1,605 g de oleilamina (6 mmol) y 2,585 g de 1, 2-hexadecanediol (10 mmol) en 20 mL de éter bencílico, obteniéndose una disolución de color marrón oscuro. Posteriormente, la disolución se colocó en agitación y se incrementó la temperatura a 110 °C a una velocidad de calentamiento de 8 °C/min. Una vez alcanzada la temperatura final se aplicó vacío (10 mbar) durante 60 min. Después, se sustituyó el vacío por un flujo de nitrógeno y se elevó la temperatura a 210 °C a una velocidad de calentamiento de 8 °C/ min. Una vez alcanzada la temperatura final esta se mantuvo constante durante 120 min. Finalmente, se aumentó de nuevo la temperatura de la reacción hasta los 295 °C a una velocidad de calentamiento

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de 5 °C/ min, manteniendo la reacción en reflujo durante 60 min. Las SPIONS se lavaron dos veces por medio de centrifugación a 8,000 rcf durante 20 min para eliminar el exceso de ácido oleico, se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 10 mL de tolueno y se guardaron a temperatura ambiente para su posterior utilización.

2.2.4.2. Caracterización de Nanopartículas Superparamagnéticas de Magnetita

2.2.4.2.a. Microscopía Electrónica de Transmisión

Para determinar el tamaño y morfología de las SPIONS obtenidas se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión utilizando un microscopio JEOL JEM-2010 (Tokio, Japón) operando a un voltaje de aceleración de 120 kV. Las muestras se depositaron en una película de 3-4 nm de grosor de carbono amorfo soportado por una rejilla de cobre de 400 µm. A continuación, se depositó una gota (30 µL) de la muestra y se dejó adsorber en la rejilla a temperatura ambiente durante 3 min. Finalmente, los restos líquidos se eliminaron con papel de filtro.

2.2.4.2.b. Difracción de Rayos X

Para determinar la estructura cristalina de las SPIONS se llevaron a cabo experimentos de difracción de rayos X con un difractómetro tipo “Bruker D8 Advance” (40 kV, 40 mA, theta/theta) equipado con un tubo de rayos X de Cu sellado (CuKα (λ = 1.5406 Å), y un detector tipo LYNXEYE XE-T. Los difractogramas fueron obtenidos en un rango angular de 3-80° con espaciado de 0.02 ° en un tiempo de paso de 2 s. Las muestras fueron rotadas durante la medición para obtener los perfiles de pico óptimos para el análisis, así como para minimizar el efecto de orientación preferente. Las muestras fueron depositadas en una base de cristal orientado (placa de Si (511)) para evitar el ruido de fondo (dispersión). Para el análisis matemático de los difractogramas obtenidos se utilizó el software “HighScore Plus, Version 3.0d”.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Para el análisis de los difractogramas de rayos X de las MNPs, se utilizó el método de Williamson-Hall para determinar el tamaño promedio del cristalito. En este modelo, se asume que el tamaño del cristalito (β_D) y la deformación ($\beta\varepsilon$) son independientes y ambos contribuyen a la amplitud del ancho del pico (β_T) (Feijoó et al., 2017) es decir:

$$(\beta_T) = \beta_D + \beta\varepsilon \qquad (8)$$

De la ecuación de Scherrer se sabe que:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta_D \cos\theta} \qquad (9)$$

y despejando β_D:

$$\beta_D = \frac{K\lambda}{D\cos\theta} \qquad (10)$$

donde β_D es la anchura a la altura media del pico (FWHM) en radianes, K = 0.9 es un factor de forma que considera que los polvos tienen una forma esférica, λ es el número de onda de la fuente de rayos X, D es el tamaño de cristalito, y θ es la posición del pico en radianes.

Por otra parte, la amplitud del pico en DRX debido a la deformación, está dada por:

$$\beta\varepsilon = 4\,\varepsilon\,\tan\theta \qquad (11)$$

donde $\beta\varepsilon$ es la amplitud de la deformación, ε es la deformación y θ es la posición del pico en radianes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Sustituyendo la ecuación (2) y (3) en la ecuación (1) se obtiene:

$$\beta_T = \frac{K\lambda}{D\cos\theta} + 4\varepsilon\tan\theta \qquad (12)$$

Ya que:

$$\tan\theta = \frac{\sin\theta}{\cos\theta} \qquad (13)$$

Por lo tanto, la ecuación (12) se puede reescribir como:

$$\beta_T = \frac{K\lambda}{D\cos\theta} + \frac{4\varepsilon\sin\theta}{\cos\theta} (14)$$

multiplicando por cosθ

$$\beta_T\cos\theta = \varepsilon(4\sin\theta) + \frac{K\lambda}{D} \qquad (15)$$

La ecuación (15) representa una línea recta, en donde ε es la pendiente, y $\frac{K\lambda}{D}$ es el ordenada en el origen.

$$Y = mx + b \qquad (16)$$

Comparando la ecuación (15) con la ecuación (16) se tiene que:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$y = \beta_T\cos\theta \qquad (i)$$

$$m = \varepsilon \qquad \text{(ii)}$$

$$x = (4 \sin\theta) \qquad \text{(iii)}$$

$$b = \frac{K\lambda}{D} \qquad \text{(iv)}$$

Construyendo la gráfica $(4 \sin\theta)$ frente $\beta_T \cos\theta$, el tamaño del cristalito (D) se extrae a partir del valor de la ordenada en el origen, y la deformación a partir del valor de la pendiente de la recta. Todos los picos de Bragg fueron utilizados para el análisis.

2.2.4.2.c. Susceptibilidad Magnética

La caracterización magnética de las MNPs se llevó a cabo en un magnetómetro SQUID (Quantum Design MPMS5, San Diego, CA). Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron en un rango de -40 kOe a 40 kOe a una temperatura de 300 K.

2.2.4.2.d. Medidas de Relajación Magnética

Las mediciones de relajación magnética se realizaron bajo un campo magnético de 3 T con un escáner de sobremesa MR Solutions (Guilford, Reino Unido) equipado con gradientes activamente protegidos de 48 $G \cdot cm^{-1}$. Para la obtención de imágenes de las muestras, se utilizó una bobina de 56 mm de diámetro en modo de transmisión/recepción. Para el análisis de los phantoms, las muestras a diferentes concentraciones (entre 20 y 800 µM en Fe) se disolvieron en 200 µL de agua Milli-Q en tubos de 300 µL. Para obtener los valores de r_2 en agua, se adquirió un mapa de T_2 con una secuencia MMES con los siguientes parámetros: TE = 50 ms, TR = 4800 ms y 10 ecos entre 150 y 1500 ms. El procesamiento se realizó utilizando el software ImageJ (Rasband, W.NIH) para la reconstrucción de los mapas de T_2, y los coeficientes de relajación r_2 se

USC DE COMPOSTELA

calcularon como la pendiente de la curva obtenida al ajustar el inverso de los valores de T_2 frente a la concentración del metal.

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2,0}} + r_2 \cdot C_{SPIONS} \qquad (17)$$

donde T_2 es el tiempo de relajación transversal (s), $T_{2,0}$ es el tiempo de relajación transversal en ausencia de agente de contraste (s), r_2 es el coeficiente de relajación transversal (mM/s), y C_{SPIONS} es la concentración de SPIONS.

2.2.5. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de PLGA Cargadas con PARA/ATOR y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular de Macrófagos RAW 264.7.

2.2.5.1. Síntesis de Nanopartículas de PLGA Cargadas con Pravastatina y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular

Para sintetizar las NPs de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, cargadas con PRA (fármaco hidrófilo) se empleó el método de nanoprecipitación empleando acetona como disolvente orgánico para disolver el polímero, y utilizando poli (vinil alcohol), PVA, como agente estabilizante. En un síntesis estándar, se disolvieron 25 mg de PLGA en 2.5 mL de acetona. A esta disolución se le añadieron distintas cantidades de PRA (30:1, 50:1, 70:1 m:m PLGA: PRA) disuelta en agua y diferentes cantidades de SPIONS secas (100:1 y 200:1 m:m PLGA: SPIONS). Posteriormente, esta disolución mezcla se añadió de manera progresiva (0.16 mL/min) a una disolución acuosa de PVA (25 mL 1.0% (w/v)) en agitación empleando, para ello, una bomba de inyección. La disolución final se sonicó con una punta sonicadora Bandelin Sonopuls HD 2200 (Berlín, Alemania) a una amplitud del 50% durante 20 min. A continuación, las nanopartículas formadas se dejaron en agitación durante la noche para permitir que los disolventes orgánicos terminasen de evaporarse. Por último, las NPs se lavaron mediante dos ciclos de centrifugación utilizando una centrífuga Hettich

USC UNIVERSIDADE

Universal 320 R (Tuttlingen, Alemania) a 6790 rcf durante 20 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en un volumen total de 10 mL de agua MiliQ (Madani et al., 2018). Posteriormente, para el recubrimiento con membrana celular de las nanopartículas poliméricas se tomó una suspensión de fragmentos de membrana celular obtenidos como se ha descrito con anterioridad en apartados anteriores, y se extruyeron tres veces con un extrusor de liposomas Lipex (Evonik Industries, Estados Unidos) a través de una membrana de policarbonato de 800 nm de tamaño de poro. A continuación, se añadieron las nanopartículas de PLGA manteniendo una relación 1:2 NPs PLGA: NVs en el número de NPs y NVs, se continuaron con las extrusiones hasta completar 10 ciclos. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron fisicoquímicamente mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica y potencial ζ previamente descritas en el apartado 2.1.3.1. y 2.1.3.2.

2.2.5.2. Síntesis Nanopartículas de PLGA Cargadas con Atorvastatina y SPIONS Recubiertas con Membrana Celular

Para la obtención de las nanopartículas de PLGA cargadas con ATOR (fármaco hidrofóbico) se empleó el método de emulsión simple. Para ello, se preparó una disolución de atorvastatina en metanol (1.0 mg/mL); a continuación, se añadieron diferentes cantidades del fármaco (30:1, 50:1 y 70:1) mezcló 1 mL de la disolución de fármaco con la disolución de PLGA (2.5 mL, 1.0 mg/mL) disuelto en acetona. A partir de este punto se siguió el mismo procedimiento descrito previamente en el apartado 2.4.1 para la preparación de las NPs poliméricas cargadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.5.3. Caracterización de NPs PLGA + PRA/ATOR + SPIONS + NVs

2.2.5.3.a. Susceptibilidad Magnética

Para comprobar que las nanopartículas poliméricas con magnetita encapsulada seguían manteniendo sus propiedades superparamagnéticas se realizó un análisis de su susceptibilidad magnética. Esta se llevó a cabo en un magnetómetro SQUID (Quantum Design MPMS5, San Diego, CA). Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron en un rango de-40 kOe a 40 kOe a una temperatura de 300 K.

2.2.5.3.b. Cuantificación de Fe_3O_4 en NPs PLGA + PRA/ATOR + NVs

Se empleó la técnica de espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para determinar la cantidad de Fe_3O_4 encapsulada dentro de las NPs empleando un equipo Varian 820-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para la preparación de la muestra, 20 µL de la solución de NPs se disolvió 360 µL ácido clorhídrico y 120 µL de ácido nítrico (agua regia) durante 2 h y posteriormente se diluyó con 4.5 mL solución de ácido clorhídrico al 1% v/v.

2.2.5.3.c. Microscopía Electrónica de Barrido

Para determinar la formación, tamaño y morfología de las nanopartículas corazón@coraza biomiméticas se realizaron imágenes SEM. Brevemente, se colocaron 30 µL de las muestran sobre rejillas de cobre cubiertas con carbono y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Las muestras fueron fijadas con oro para permitir su conductividad eléctrica. Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio FESEM Ultra-Plus Zeiss (Oberkochen, Alemania) operado a un voltaje de operación de 5 kV.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.5.3.d. Microscopía Electrónica de Transmisión

Para determinar el tamaño, morfología, la encapsulación de las nanopartículas superparamagnéticas y el recubrimiento exitoso con la membrana celular de las núcleos poliméricos de PLGA se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión utilizando un microscopio JEOL JEM-2010 (Tokio, Japón) operado a un voltaje de aceleración de 120 kV. Las muestras se depositaron en una película de 3-4 nm de grosor de carbono amorfo soportado por una rejilla de cobre de 400 µm. Se colocó una gota (30 µL) de la muestra y se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche.

2.2.5.3.e. Cuantificación de Pravastatina/Atorvastatina en las Nanopartículas Biomiméticas

Para determinar la cantidad de fármaco retenido en las nanopartículas, la eficiencia de encapsulación (%EE) y la capacidad de carga del fármaco en las nanopartículas (%DL) se tomaron las suspensiones de NPs de PLGA tras su síntesis, y se centrifugaron a 8,700 rcf durante 20 min a 25 °C. La cantidad de fármaco en el sobrenadante se determinó por medio de espectroscopía de UV-Vis con un espectrofotómetro Jasco V750 (Tokio, Japón), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 238.5 nm (pravastatina) y 240 nm (atorvastatina). La %EE y %DL se calcularon mediante las ecuaciones (3) y (4) respectivamente.

2.2.5.3.f. Análisis de la Liberación de Pravastatina

La Liberación de PRA fue evaluada tanto en las NVs cargadas con PRA como en las NPs de PLGA cargadas con SPIONS, PRA y recubiertas con las membrana celular con el objetivo de comparar los perfiles de liberación entre una y otra. Para ello, se emplearon membranas de diálisis y PBS 7.4 como medio de liberación a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo. Se colocaron 3.0 mL de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

suspensión en bolsas de diálisis (posteriormente se colocaron en 30 mL de PBS 7.4 a 37 °C. El ensayo se llevó a cabo durante 72 h, tomando alícuotas de 1.0 mL y reponiendo con un volumen igual de PBS 7.4 a determinados tiempos. La cantidad de PRA liberada fue determinada utilizando una curva de calibración obtenida a partir de espectroscopía de UV-Vis midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 238 nm.

2.2.5.3.g. Viabilidad Celular

La citotoxicidad de las nanopartículas biomiméticas obtenidas fue evaluada en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa y fibroblastos murinos Balb/c 3t3. Los ensayos se realizaron mediante el método colorimétrico basado en la reducción sal de tetrazolio WST-8 (ensayo CCK-8) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Para ello, las células fueron subcultivadas en una placa de 96 pozos a una densidad de $10x10^3$ células por pozo. Después de 24 horas de incubación aquellas fueron tratadas con las nanopartículas a distintas concentraciones de fármaco (10 nM – 100 nM). La citotoxicidad fue medida tras 24 h de incubación previo lavado de las células con PBS, y posterior agregación de 90 µL de medio de cultivo + 10 µL de CCK-8 a cada pozo e incubando durante 1 h. Posteriormente, la absorbancia fue medida a 450 nm. La viabilidad celular fue determinada tomando en cuenta la cantidad de CCK-8 convertido a formazán y calculada como porcentaje de viabilidad comparada con el grupo control (Almada et al., 2017) mediante la ecuación (6).

2.2.5.3.h. Liberación de Colesterol de Nanopartículas Biomiméticas

Al igual que para las NVs + PRA, se evaluó el efecto en la liberación de colesterol de las NPs biomiméticas cargadas tanto con PRA como ATOR, para ello se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 2.3.5.4, con la diferencia de que en esta ocasión las células se expusieron a las NPs biomiméticas con una concentración de fármaco de 100 nM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.6. Ensayos en Cultivos Celulares Dinámicos: Dispositivos de Microfluídica

Los ensayos de microfluídica se realizaron utilizando un dispositivo de microfluídica (Figura 15). Los dispositivos (µ-Slide I Luer 3D, 87176)) fueron obtenidos de Ibidi (Alemania). Se realizó un recubrimiento con un volumen de 16 µL de colágeno de cola de ratón a una concentración de 2 mg/mL, según las especificaciones del proveedor. El colágeno se dejó polimerizar a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se añadió un volumen de 350 µL de una suspensión de células a una concentración de $8x10^5$ células/ mL, se dejó que las células se adhirieran a la superficie durante 1 h para posteriormente ponerlas bajo condiciones de flujo. Una vez adheridas las células a la superficie se aplicaron las condiciones de flujo necesarias con una presión de 37.9 mbar para obtener el shear stress deseado de 1 Pa (10 dyn/cm^2). Las células se dejaron crecer durante todas la noche para obtener una confluencia del 100%, o sea una monocapa celular.

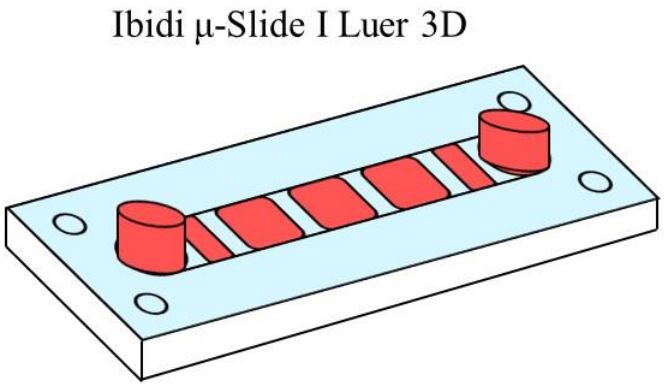


Figura 15. Esquema Representativo del Chip de Microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D.

2.2.6.1. Determinación de las Condiciones Hemodinámicas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Inicialmente, se determinaron las condiciones de presión necesarias para que las células se sometieran a un shear stress de 1 Pa (10 dyn/cm^2) debido a que esta es la

condición de shear stress a la que se encuentra sometido el endotelio vascular en condiciones fisiológicas normales (Chatzizisis et al., 2007). Para ello, se calculó el flujo (mL/min) necesario para obtener esa esfuerzo cortante mediante la siguiente ecuación:

$$\tau\left(\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}\right) = \eta\left(\frac{\text{dyn}\cdot\text{s}}{\text{cm}^2}\right) \cdot 60.1 \cdot \phi\left(\frac{\text{mL}}{\text{min}}\right) \qquad (18)$$

donde τ representa el shear stress, η la viscosidad del medio y ϕ el flujo. El valor de 60.1 está dado por la forma del microchip utilizado, el cual fue determinado por el proveedor. Con esta ecuación y empleando los valores de τ= 10 dyn/cm^2 (1 Pa), η= 0.0072 dyn · s/cm^2, se determinó que el flujo (ϕ) necesario para obtener el esfuerzo cortante deseado fue de 23.1 mL/min. Posteriormente, se realizó una curva de calibración midiendo los flujos a distintas presiones en el rango de 5 mbar-a 95 mbar.

La curva de calibración permite predecir la presión necesaria para generar el flujo deseado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{p} = \frac{\phi}{\text{m}} = \frac{23.1\ \text{mL/min}}{0.63} = 37.9\ \text{mbar} \qquad (19)$$

2.2.6.2. Determinación de la Concentración Celular Inicial

Para poder llevar a cabo los experimentos de microfluídica es necesario obtener una monocapa celular en la superficie de los chips de microfluídica. Para ello, se determinó la concentración de células inicial necesarias para obtener la monocapa evaluando distintas concentraciones de células. Así, se sembraron células endoteliales de aorta de rata a una concentración de 4x10^6 y 8x10^6 células/mL y se realizó un seguimiento del crecimiento celular utilizando un microscopio óptico Leica DMI6000 B a tiempos de incubación 0, 1, 24, 48 y 72 h, con el objetivo de optimizar las condiciones para obtener una monocapa celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

2.2.6.3. Evaluación de la Expresión de VCAM-1

Los receptores VCAM-1 son receptores que se encuentran en el endotelio vascular, y su sobreexpresión está relacionada directamente con los procesos inflamatorios, ya que permiten la adhesión de las células inmunitarias al endotelio vascular y su posterior paso a través de él. Por ello, se evaluó bien el incremento en la expresión de receptores VCAM-1 o su inhibición en los cultivos celulares dinámicos en ausencia y presencia de las nanopartículas biomiméticas cargadas. Para ello, se activaron las células endoteliales con LPS (100 ng/mL) durante 24 h y con los distintos sistemas con estatina. Se añadió un volumen (≈ 80 µL) tal que la concentración de fármaco final en el medio de cultivo fuera de 100 nM. Después del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente fijadas con paraformaldehído al 4.0% (v/v) durante 10 min A Continuación, se lavaron de nuevo con PBS tres veces y, posteriormente, se permeabilizó su membrana celular con Tritón X-100 0.2% (v/v) durante 4 min, y finalmente se procedió a un nuevo lavado con PBS. A continuación, se añadieron 5 µg/mL de una disolución de anticuerpo anti-CD106-PE (anti-VCAM) durante 1 h. Finalmente, las células se lavaron por última vez con PBS y se añadió ProLong Gold antifade DAPI (Invitrogen), las muestras se dejaron curar durante 24 h a-20 °C, para su posterior análisis en un microscopio confocal Leica Stellaris (Wetzlar, Alemania).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

NANOVESÍCULAS BIOMIMÉTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

3.1. Nanovesículas de Macrófagos como Sistema de Encapsulación de Fármacos

De manera general, el principal objetivo de los sistemas de liberación controlada de fármacos (SLCF) basados en NPs suministrados por vía parenteral a través del torrente sanguíneo es el permitir una liberación sostenida y controlada durante un periodo de tiempo prolongado disminuyendo, de esta forma, la necesidad de tener que administrar dosificaciones de manera tan recurrente, por tanto, evitando efectos tóxicos adversos por la afectación de tejidos/células sanas, concentraciones excesivas, incomodidades al paciente por las repetidas administraciones y la potencial generación de resistencias a la terapia, etc. (Mu, Chu, Liu, & Zhang, 2020). Sin embargo, estos SLCF también presentan ciertos desafíos a la hora de ser empleados en un sistema biológico limitando así, momentáneamente, su completa aplicación y universalidad en el área biomédica (Adepu, Ramakrishna, Costa-Pinto, & Oliveira, 2021b).

En primer lugar, cabe destacar las incidencias respecto a su potencial biodistribución y posterior eliminación del cuerpo. Una vez administradas, los SLCF deben llegar de manera eficiente al sitio de acción objetivo sin ser atrapados o eliminados prematuramente por el sistema reticuloendotelial (hígado y bazo) del cuerpo humano. Por otra parte, la acumulación de NPs en órganos no deseados puede provocar efectos tóxicos acumulativos. Además, la eliminación de los SLCF del cuerpo puede ser lenta debido a su escasa biodegradabilidad (dependiendo de su composición y metabolización), lo que puede resultar en toxicidad a largo plazo (G. Liu et al., 2021; Manzari et al., 2021).

De igual forma, la estabilidad de estas NPs en el entorno biológico es otro problema de capital importancia. Estas pueden experimentar agregación o degradación en el torrente sanguíneo, lo que puede reducir su capacidad para liberar el fármaco de manera controlada y eficaz y/o ser detectadas prematuramente por el sistema de defensa del cuerpo humano. (Fam et al., 2020; He, Zhang, & Feng, 2020b). Por ejemplo, la

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

interacción de los SLCF con el entorno biológico puede provocar una rápida opsonización de estos nanosistemas, esto es, que las proteínas plasmáticas se adhieran a las NPs y, por consiguiente, "marcándolas" irremediablemente para su identificación y eliminación por parte del sistema inmune. Este proceso no solo conlleva la reducción de las concentraciones terapéuticas efectivas y, por consiguiente, de la eficacia del tratamiento, sino que también puede provocar efectos secundarios adversos, lo que puede complicar aún más el desarrollo de terapias basadas en NPs para su uso seguro y eficaz en humanos.

Por lo tanto, es fundamental asegurar una farmacocinética y biodistribución adecuadas para que estas NPs alcancen el sitio de acción deseado y evitar la acumulación de los SLFC en tejidos/zonas no deseadas del cuerpo humano. Por ello, la compatibilidad biológica y la capacidad de dirigir específicamente las NPs a células o tejidos afectados son también aspectos esenciales para su aplicación clínica segura y efectiva (Begines et al., 2020; R. Liu et al., 2023). Además, es crucial garantizar la estabilidad y seguridad de los SLCF cuando son administrados en el cuerpo humano, así como durante su almacenamiento.

La fabricación de NPs con propiedades fisicoquímicas uniformes, controladas, reproducibles y trazables de batch a batch (condiciones GMP, del inglés Good Manufacturing Practices) es otro reto de suma importancia para la generalización de los sistemas basados en NPs para dosificación farmacológica, ya que requiere de técnicas y condiciones de producción sofisticadas y costosas, lo que limita la escalabilidad y la viabilidad comercial (Sung & Kim, 2020; Yao et al., 2020).

Entre las diferentes metodologías desarrolladas en los últimos años para la obtención de SLCF, destaca principalmente los métodos biomiméticos basados en el uso de componentes de membrana celular reconstituidos en la forma de NVs o bien como recubrimientos bioactivos de NPs/nanotransportadores utilizados como SLCF (He et al., 2020b; H. Wang et al., 2020). Estos nanosistemas son capaces de mantener las propiedades intrínsecas de la membrana celular, como su biocompatibilidad, evasión del sistema inmunológico y capacidad de direccionamiento activo a través de los receptores expresados en la propia membrana celular, pero eliminando la complejidad biológica de la maquinaria de las células primigenias (H. Y. Chen et al., 2020; Le, Lee, Lee, Shim, & Oh, 2021; C. H. Xu et al., 2020).

USC DE COMPOSTELA

Con esto en mente, en el presente capítulo se presentan los resultados correspondientes al proceso de estandarización y optimización de la metodología para la fabricación de NVs biomiméticas obtenidas a partir de fragmentos de membrana celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (Figura 16). Estas NVs fueron obtenidas siguiendo un protocolo previamente descrito en la literatura con ciertas modificaciones (Soprano et al., 2020). El procedimiento de obtención de estas NVs biomiméticas se basa en la inmersión de las células de origen en un medio hipotónico que contiene inhibidores de proteasas para, posteriormente, someterlas a ciclos de congelación/descongelación para asegurar su lisis completa, pero sin comprometer la estructura, conformación y función de sus componentes proteicos. A continuación, se realizan una serie de ciclos de centrifugación para separar los diferentes componentes celulares (núcleo celular, orgánulos, proteínas citoplasmáticos, membrana) y purificar los fragmentos de membrana celular obtenidos. Finalmente, estos fragmentos de membrana purificados se extruyen a través de una membrana porosa para reconstituirlos en la forma de nanovesículas (NVs).

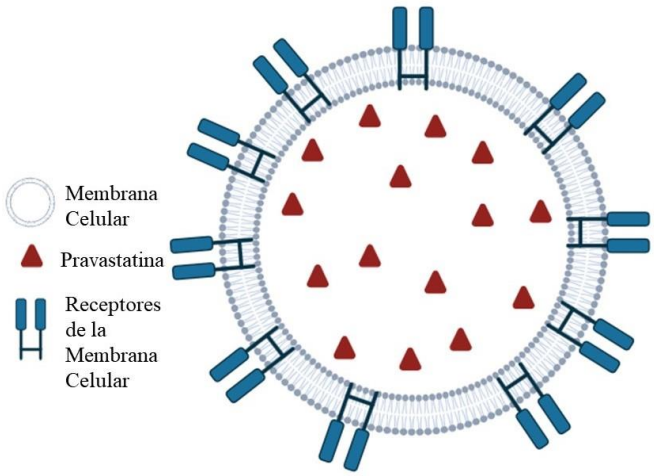


Figura 16. Esquema representativo de las NVs cargadas con PRA.

Estas NVs fueron caracterizadas mediante diversas técnicas físico-químicas, que incluyeron la dispersión de luz dinámica (DLS) para obtener su diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad, el potencial ζ para evaluar su carga superficial, ensayos de seguimiento de NPs (NTA) para determinar su concentración y análisis de distribución de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

tamaños, así como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño y morfología de las NVs.

3.1.1. Diseño y Caracterización de Nanovesículas

Inicialmente, se establecieron las condiciones óptimas para la obtención de las NVs a partir de las células de origen, macrófagos murinos RAW 264.7. Para ello, se fijó en $20x10^6$ el número inicial de células a emplear en el proceso de lisis, tal y como se describe en la sección 2.1.2, de cara a poder obtener concentraciones relativamente importantes de NVs una vez finalizado el proceso sintético. Con el fin de optimizar el proceso de obtención de las NVs, se realizó un análisis de la dependencia del tamaño de los nanotransportadores biomiméticos obtenidos mediante DLS en función del número de extrusiones aplicado manteniendo fijo el número de células iniciales constante en $20x10^6$, con el objetivo de obtener NVs de tamaños inferiores a los 200-250 nm, que es el límite para evitar la eliminación de los sistemas nanoparticulados por fagocitosis (Castro, Costa, & Campos, 2022). De esta manera, se puede asegurar que el nanovehículo podrá alcanzar cualquier zona del cuerpo humano al poder viajar incluso por el capilar más estrecho (Lima, Bernfur, Vilanova, & Cedervall, 2020; Nunes, Andrade, Ramalho, Loureiro, & Pereira, 2022). La Figura 17 presenta los resultados de esta evaluación preliminar. En la Figura 17, A), se observa que a partir de la décima extrusión, el diámetro hidrodinámico de las NVs se mantuvo prácticamente constante y por debajo de los 250 nm, tamaño óptimo para la aplicación de NPs como nanotransportadores por vía intravenosa (Kang et al., 2020), como se comentó con anterioridad.

Por otra parte, Figura 17, B), correspondiente a la distribución del diámetro hidrodinámico promedio de las NVs antes y después del proceso de extrusión, muestra una clara disminución del diámetro hidrodinámico de las NPs biomiméticas tras los ciclos de extrusión, así como una clara reducción de la polidispersidad del sistema, pasando de dos poblaciones de tamaño de partículas a solo una.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

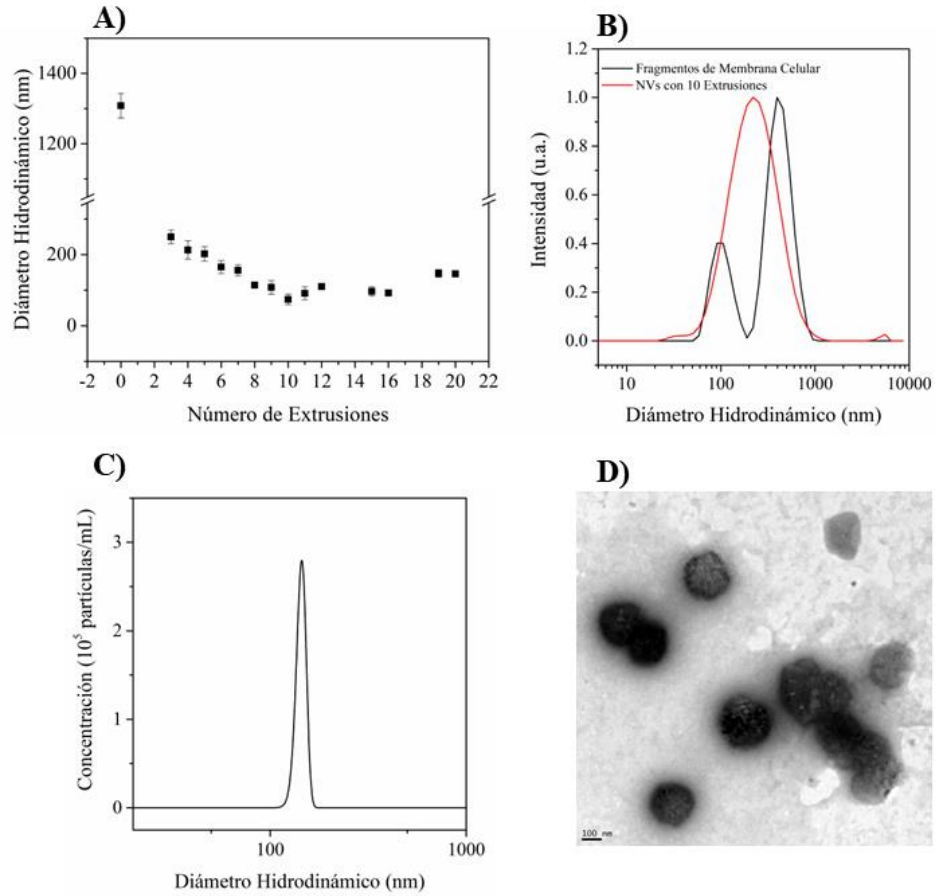


Figura 17. Optimización del número de extrusiones. A) Evolución del diámetro hidrodinámico de las NVs con el número de extrusiones aplicado. B) Distribución de tamaños de las NVs antes y después de las diez extrusiones. C) Distribución de tamaño obtenidas por NTA de las NVs obtenidas a partir de $20x10^6$ células iniciales. D) Micrografía TEM de las NVs obtenidas (escala 100 nm).

Una vez definido el número de extrusiones necesarias para obtener las NVs con un tamaño adecuado se procedió a determinar su tamaño final mediante DLS, carga superficial mediante medidas de potencial ζ, y la concentración de NVs obtenidas en el proceso sintético estándar a partir de una concentración inicial de $20x10^6$ células mediante análisis NTA, respectivamente. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos. Como se puede observar, el diámetro hidrodinámico promedio de las NVs obtenidas fue de ca. 169 ± 3 nm con un PDI de 0,29 ± 0.01; estos valores indican una aceptable monodispersidad de las muestras ya que se considera como población monodispersa cuando los valores de PDI están por debajo de 0,3 (Danaei et al., 2018). Así mismo, se

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

determinó el valor de carga superficial de las NVs en medio acuoso a pH 6,0 de -16,4 ± 2,2 mV, consecuencia directa de la presencia de los grupos fosfato de los fosfolípidos que componen la membrana celular (Genito, Batty, Bachelder, & Ainslie, 2021). Este valor de potencial ζ se aproxima al umbral de -20/-25 mV considerado como adecuado para asegurar una estabilidad coloidal en disolución gracias a la acción de las repulsiones electrostáticas (Midekessa et al., 2020; Shah, Rangaraj, Singh, & Srivastava, 2021). No obstante, aunque el valor de carga superficial esté ligeramente por debajo del valor óptimo ideal, se debe considerar que en este caso particular existen otras contribuciones importantes a la estabilidad coloidal del nanotransportador biomimético como la existencia de impedimentos estéricos debidos a la presencia de distintos tipos de moléculas en la superficie de la membrana celular como, por ejemplo, proteínas transmembranales, receptores de superficie y carbohidratos, entre otros (Dingjan & Futerman, 2021).

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, PDI, potencial ζ y. concentración de las NVs obtenidas.

Diámetro Hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	Concentración (NVs/mL)
169 ± 3	0.29 ± 0.01	-16.4 ± 1.3	$9.6x10^{10}$ ± 0.3

A partir del análisis realizado mediante NTA (Figura 17, C)), la concentración de NVs obtenida en las síntesis estándar es de ca. $9.6x10^{10}$ ± 0.3 NVs/mL, y con un tamaño hidrodinámico promedio cercano a los 180 nm, en claro acuerdo con el valor obtenido por DLS. Finalmente, mediante las imágenes TEM (Figura 17, D)) obtenidas se logró confirmar la obtención de las NVs, ya que en ellas se observaron estructuras esféricas monodispersas de alrededor de ca. 150 nm; esta ligera diferencia de tamaños respecto al obtenido por DLS o NTA se debe al proceso de deshidratación de la muestra durante al proceso de preparación de la muestra previo a su observación en el microscopio electrónico. Además, se ha podido observar mediante TEM la existencia de una doble

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

capa de membrana que rodea al interior acuoso de la NV (Figura 18, A)), fruto de la presencia no solo de proteínas transmembranales sino también a la presencia de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática de la célula de origen (G. Wu et al., 2020).

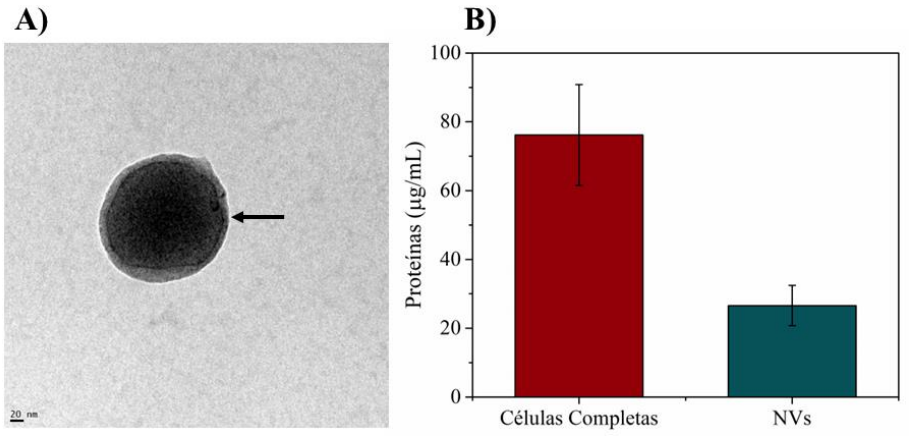


Figura 18. A) Imagen TEM de NV obtenida a partir de macrófagos RAW 264.7 (Bicapa lipídica indicada con una flecha), B) Cuantificación de proteínas de células RAW 264.7 completas y NVs obtenidas a partir de 20x106 células.

Con el objetivo de determinar la cantidad de proteínas que se retienen en la estructura de las NVs, se cuantificó mediante un método colorimétrico la cantidad de proteína de $20x10^6$ células RAW 264.7, así como la cantidad de proteína presentes en las NVs, obtenidas a partir del mismo número de células. En la Figura 18, B) se puede observar que el contenido de proteínas en las NVs es menor comparado con la cantidad de proteínas presentes en las células RAM 264.7 completas. Este resultado nos indica dos cosas, por un lado, que durante el proceso de síntesis, específicamente durante los procesos de centrifugado, se eliminan los organelos celulares, los cuales están compuestos principalmente por proteínas (Wiśniewski, Hein, Cox, & Mann, 2014); por el otro, que en las NVs se retiene aún una cantidad proteica apreciable, probablemente siendo estas las proteínas transmembranales que son las que permiten la evasión del sistema inmune y el direccionamiento de las NVs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Considerando las integrinas α4β1 (VLA-4), las cuales están constituidas por dos subunidades, la CD49d (α4) y CD29 (β1), presentes en los macrófagos, desempeñan una

función primordial en el reconocimiento y adhesión a las células del endotelio vascular inflamado, a través del reconocimiento específico de los receptores VCAM-1, es importante a tener la certeza de que estos receptores se conservan en las NVs sintetizadas. Por lo que se realizaron ensayos de citometría de flujo marcando las NVs con anticuerpos anti-CD 49d con FTIC para evidenciar la presencia de estos receptores.

La Figura 19 muestra que las células completas (A), en este caso los macrófagos, presentaron un aumento en la señal de fluorescencia, indicando que los anticuerpos empleados se adhirieron a los receptores presentes en la membrana celular. Como control negativo (B), se emplearon las NVs solas en ausencia de los anticuerpos, las cuales no presentaron fluorescencia alguna. Por último, las NVs en presencia del anticuerpo (C) mostraron un incremento de la fluorescencia al igual que las células completas, lo cual confirma que el receptor celular de interés se mantiene estructuralmente activo y correctamente orientado en las NVs tras los procesos de extracción, purificación, extrusión y reconstitución de los fragmentos de membrana celular. Como consecuencia, las NVs contarían con la capacidad de adherirse al endotelio vascular inflamado.

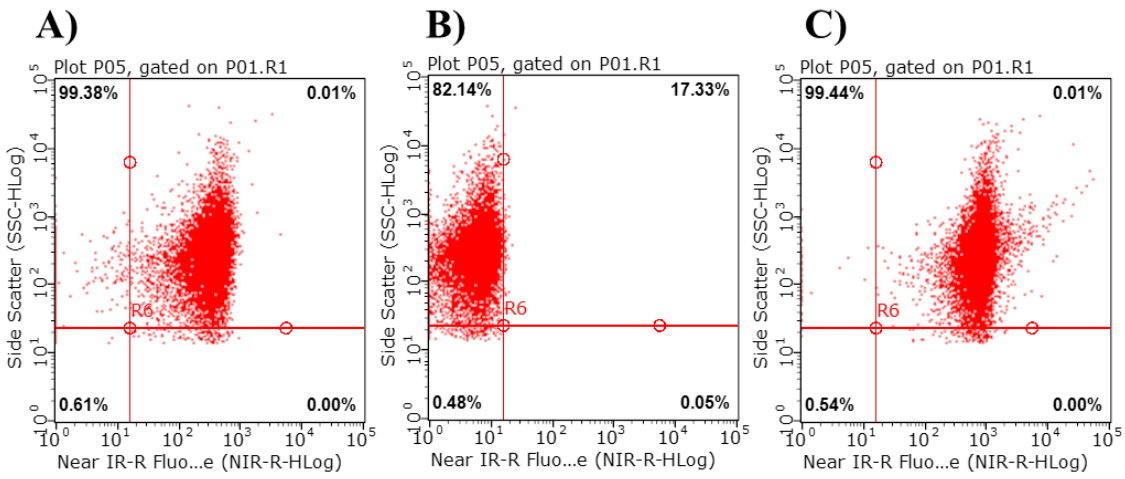


Figura 19. Citometría de flujo de A) Macrófagos RAW 264.7marcados con anticuerpo CD 49d. B) NVs solas. C) NVs marcadas con anticuerpo anti CD49d. Diagramas de densidad de dispersión lateral (SSC) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a nm (canal FITC-A).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.2. Citocompatibilidad de las NVs

El potencial de biocompatibilidad de las NVs se evaluó mediante ensayos *in vitro* en cuatro líneas celulares distintas: macrófagos murinos RAW 264.7, fibroblastos murinos Balb/c 3T3, células tumorales de cáncer de cuello de útero humano, HeLa, y células madre mesenquimales de tejido adiposo, adMSCs. Las células se incubaron en presencia de distintas concentraciones de NVs (6.25-50x10^9 NVs/mL) evaluando la viabilidad de las células después de 24 y 48 h de exposición, respectivamente. La Figura 20, A) y B) confirma que las NVs no afectan la viabilidad de las líneas celulares significativamente, observándose una viabilidad celular del 90% después de un periodo de incubación de 24 h en presencia de las NVs a distintas concentraciones. Similares resultados se obtuvieron tras 48 h de incubación para todas las líneas celulares, esto es, viabilidades celulares siempre superiores al 90% siendo, confirmando pues que las NVs son biocompatibles, de acuerdo con los estándares de las agencias regulatorias (Kus-liśkiewicz, Fickers, & Ben Tahar, 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

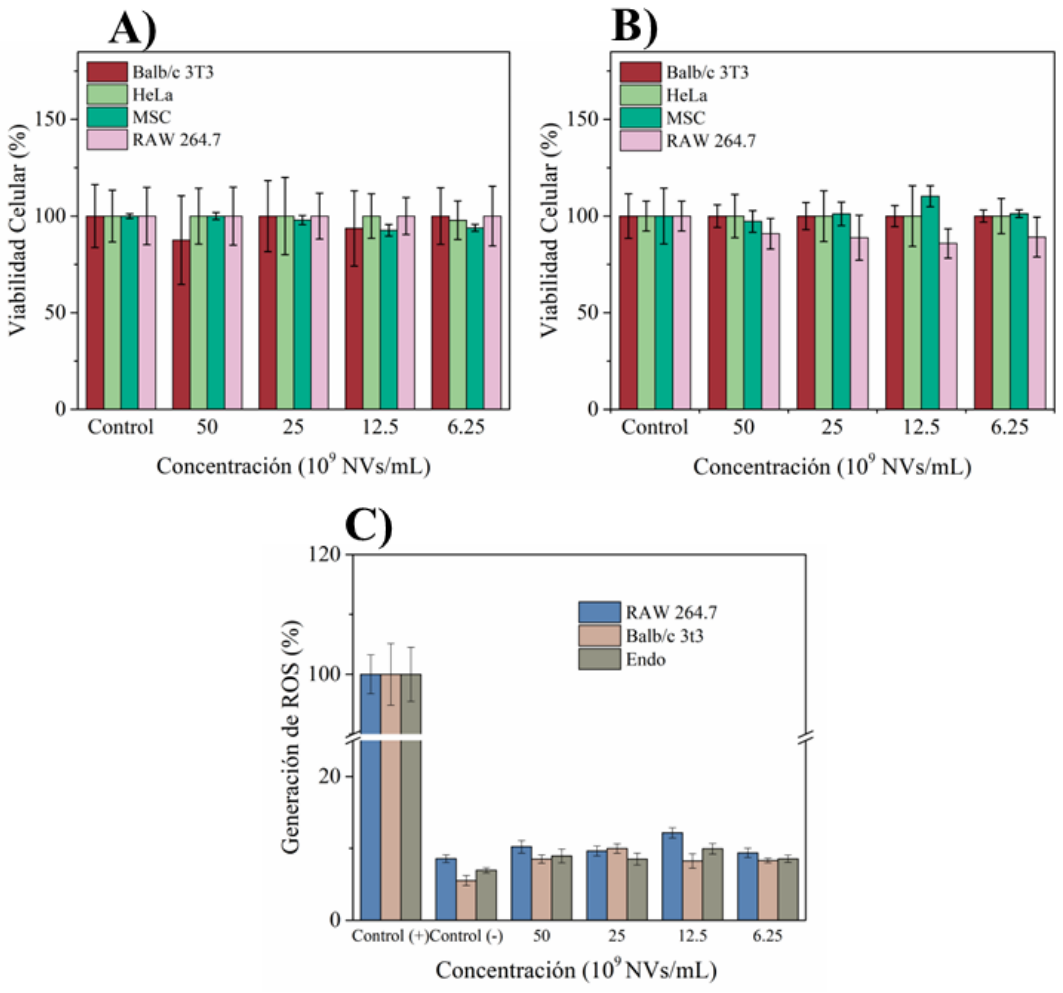


Figura 20. Ensayos de viabilidad celular de NVs tras A) 24 h y B) 48 h de incubación, C) Generación de ROS tras la administración de diferentes concentraciones de NVs en líneas celulares RAW 264.7, Balb/c 3t3 y endoteliales de aorta de rata.

Por otra parte, resulta importante evaluar si el nanosistema de NVs genera un desajuste metabólico celular que induzca un aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), puesto que las ROS, e.g., radicales de ·OH, H_2O_2, O_2^-, $^1O_2$, etc, son generadas de manera natural por las células como parte de su metabolismo; sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio entre la producción de tales especies oxidativas y la capacidad antioxidante celular se genera estrés oxidativo, que puede generar daños en el ADN, proteínas y lípidos celulares (Hajam et al., 2022), y propiciar el desarrollo de enfermedades como el cáncer, problemas cardiovasculares, neurodegenerativos, etc (Arfin et al., 2021; Hayes, Dinkova-Kostova, & Tew, 2020). Por tal motivo, se evaluó la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

producción de ROS en tres líneas celulares, macrófagos RAW 264.7, fibroblastos Balb/c 3t3 y células endoteliales de aorta de rata, a diferentes concentraciones ($50x10^9$-$6.25x10^9$ NVs/mL). La Figura 20, C) muestra que la administración de las NVs apenas implicó un muy ligero incremento en la generación de ROS con respecto al control negativo (células solas) tras su administración, que puede deberse a que al ser un "agente extraño" genere un ligero y momentáneo estrés celular debido a su concentración posiblemente elevada en el medio celular y mientras no se produce su metabolización y/o excreción celular (Horie & Tabei, 2021).

3.2.1. Obtención y Caracterización de NVs Cargadas con la Pravastatina

Una vez confirmada la citocompatibilidad de las NVs, se procedió a analizar su potencial como nanotransportador biomimético de compuestos terapéuticos para la terapia de la AEs. Así, el fármaco seleccionado fue la pravastatina (PRA), compuesto perteneciente a la familia de las estatinas y de naturaleza hidrófila. El principal efecto terapéutico de PRA es reducir de los niveles de colesterol en sangre, inhibiendo la acción de la enzima HMG-CoA reductasa (Kadoglou, Khattab, Velidakis, Patsourakos, & Lambadiari, 2022; L. Zhao et al., 2023). Adicionalmente, a la PRA se le han atribuido una importante capacidad antiinflamatoria y, más aún, favorece el transporte del colesterol de manera reversible, de los tejidos periféricos, como las arterias o los músculos, hacía el hígado donde es metabolizado (Ferri & Corsini, 2020; Koushki et al., 2021; Morofuji et al., 2022; Satny, Hubacek, & Vrablik, 2021).

Con esto en mente, como primer paso del proceso de obtención del nanotransportador biomimético se procedió a optimizar la cantidad de fármaco que es posible encapsular en las NVs. Para ello, se añadieron tres cantidades de fármaco diferentes (1.5, 1.0 y 0.5 mg) a los fragmentos de membrana celular para su extrusión (4.0 mL), para dar lugar a las NVs cargadas. Posteriormente, las NVs así obtenidas se sometieron a un proceso de diálisis para eliminar el fármaco libre que no se incorporó en el interior acuoso de las NVs. La cantidad de fármaco encapsulado se determinó de manera indirecta, determinando la concentración de PRA en el medio de diálisis. Por otra

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

parte, se evaluó el efecto de la encapsulación del fármaco y del proceso de diálisis sobre el diámetro hidrodinámico de las NVs mediante DLS.

La Tabla 2 muestra las eficiencias de encapsulación y carga de fármaco de cada una de la nanoformulaciones evaluadas. Así, se observó una disminución paulatina en la eficiencia de encapsulación a medida que se incrementó la cantidad de PRA añadida en el proceso de síntesis, lo que puede indicar una progresiva saturación del nanosistema. En cambio, el porcentaje de carga del fármaco se incrementó conforme se aumentaba la cantidad de fármaco añadido de fármaco añadido desde el 0.7 al 1.5%. En base a estos resultados obtenidos, se optó por utilizar el nanovehículo biomimético con una carga inicial de 1.0 mg de fármaco, ya que a pesar de que el nanosistema con 0.5 mg de fármaco añadidos cuenta con una mayor eficiencia de encapsulación la masa final de compuesto bioactivo encapsulado es casi la mitad; por el contrario, al añadir 1.5 mg de PRA solo se alcanzó un 58.4% de eficiencia de encapsulación, esto es, prácticamente la mitad del fármaco utilizado se pierde en el proceso de síntesis lo que en términos de rendimiento es inadecuado.

Tabla 2. % de Eficiencia de encapsulación, % de carga, y masa de fármaco encapsulada a partir de los diferentes masas de PRA añadidas inicialmente durante el proceso sintético de las NVs.

Masa de PRA Añadida (mg)	%Eficiencia de Encapsulación	% Carga de Fármaco	Masa de PRA Encapsulada (mg)
1.5	58.4 ± 9.1	1.5 ± 0.2	0.88 ± 0.06
1.0	77.9 ± 6.3	1.3 ± 0.1	0.78 ± 0.07
0.5	85.4 ± 7.2	0.7 ± 0.1	0.43 ± 0.09

A continuación, se puede observar (Figura 21 y Tabla 3) que el proceso de diálisis tiene un pequeño impacto en el tamaño de las NVs produciendo un ligero incremento en el diámetro de las NVs. Por ejemplo, el diámetro de las NVs vacías cambia de 169 a 189 nm antes y después del proceso de diálisis. Por otra parte, el diámetro hidrodinámico de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las NVs con PRA antes del proceso de diálisis era de 195 y después del proceso de diálisis aumentó a 238 nm. Este ligero incremento puede estar relacionado directamente con variación de la presión osmóticas necesarias para alcanzar el equilibrio Donnan a ambos lados de la membrana semipermeable de diálisis, lo que implica un pequeño hinchamiento de las NVs, sin provocar alteraciones en la forma de la distribución de población de tamaños (Y. Liu, Yang, Jin, Xu, & Zhao, 2020; L. Xu et al., 2022). No obstante, el tamaño final se mantuvo por debajo del rango de los 250 nm, tamaño deseado para su potencial aplicación por vía intravenosa (Dolai, Mandal, & Jana, 2021; Tosi, Duskey, & Kreuter, 2020; Yaghmur & Mu, 2021).

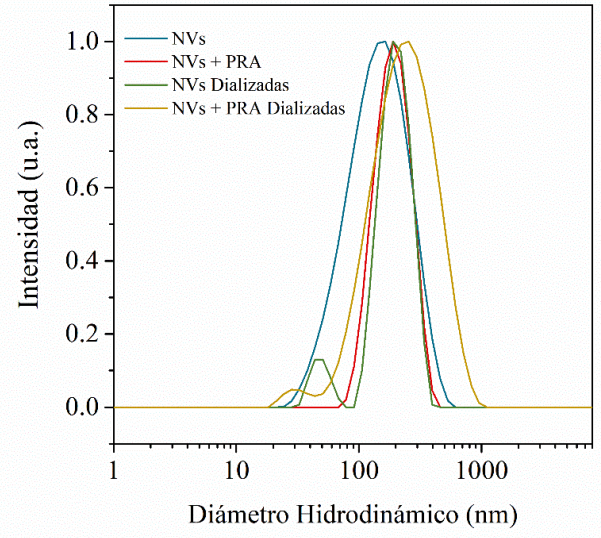


Figura 21. Distribución de tamaños de NVs y NVs + PRA antes y después del proceso de dialisis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ de NVs y NVs + PRA antes y después del proceso de diálisis.

Muestra	Diámetro Hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
NVs	169 ± 3	0.25 ± 0.01	-16.4 ± 1.3
NVs + PRA	195 ± 12	0.37 ± 0.10	-13.3 ± 0.9
NVs dializadas	189 ± 7	0.32 ± 0.03	-14.9 ± 1.1
NVs + PRA dializadas	238 ± 3	0.36 ± 0.08	-12.9 ± 1.2

Además, se observó una ligera disminución de la carga superficial de las NVs cargadas respecto a las NVs vacías, disminuyendo de -16,4 a -13,3 mV. Este comportamiento podría indicar que algunas de las moléculas de PRA, que contienen un ácido carboxílico en su estructura química, podrían poseer la capacidad de adherirse electrostáticamente a la superficie externa de las NVs, gracias a la presencia de grupos amino en las proteínas que componen la membrana celular (Ridolfi et al., 2023; S. S. Sahu et al., 2021; Tiwari et al., 2023). Otra posible explicación a esta variación es que una pequeña cantidad de fármaco pueda adsorberse también en la superficie de las NVs (Midekessa et al., 2020). No obstante, serían necesarios estudios adicionales (e.g., calorimetría de valorización isotérmica, simulaciones de dinámica molecular etc) para confirmar completamente esta cuestión.

Por otro lado, las fotografías de TEM permiten corroborar que tanto las dimensiones como la morfología de las NVs cargadas con PRA no experimentan cambios significativos en cuanto a su tamaño y morfología respecto a las NVs vacías (Figura 22). Las NVs cargadas se mantuvieron como nanoestructuras esféricas monodispersas de ca. 150 nm de diámetro, tamaño sensiblemente inferior al obtenido mediante DLS (238 ± 3 nm). Este hecho confirma que el proceso de incorporación del fármaco dentro de las NVs no afecta a su morfología esférica. Por otro lado, cabe recordar de nuevo que la diferencia entre los tamaños obtenidos mediante DLS y TEM difieren debido a que para la preparación de las muestras para poder ser observadas mediante TEM, estas tienen que someterse a un proceso de secado reduciendo así, su tamaño. Por otro lado, es necesario

USC UNIVERSIDADE

recordar que para poder obtener las imágenes de TEM es necesario teñir las muestras con ácido fosfotúngstico puesto que al ser de naturaleza biológica la densidad electrónica de las NVs no es lo suficientemente alta para generar un contraste adecuado.

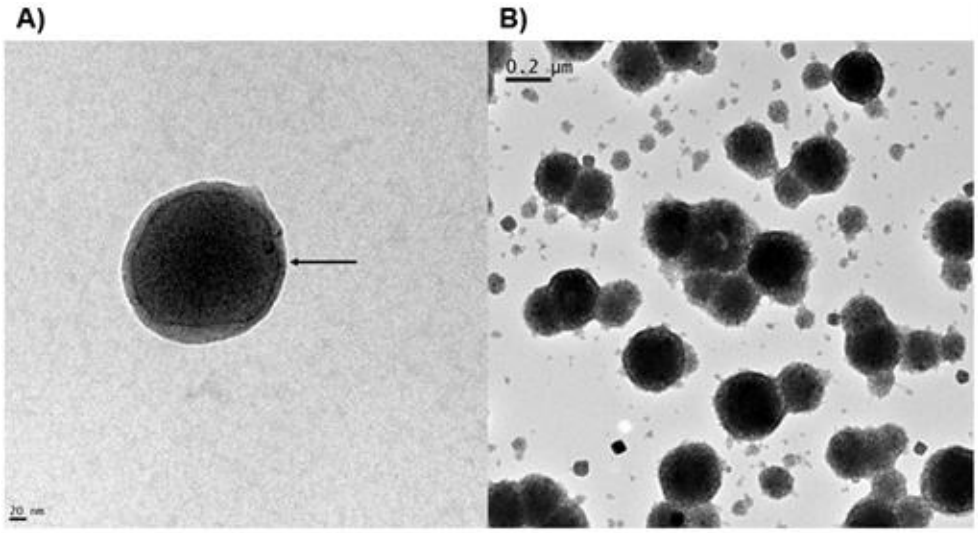


Figura 22. Micrografías TEM de NVs solas A) y NVs + PRA B).

La Figura *23*, A) muestra la cinética de liberación de las NVs + PRA. La liberación de PRA, realizada en buffer fosfato pH 7.4 a un temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo, muestra un comportamiento típico de liberación, el cual se caracteriza por una primera fase de liberación rápida dentro de las primeras 10 h, en la que se alcanza un 70% de liberación del fármaco. Posteriormente, el proceso de liberación continúa a través de una fase mucho más lenta hasta alcanzar un plateau alrededor de las 50 h, con un 90 % de la carga liberada tras 72 h de incubación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

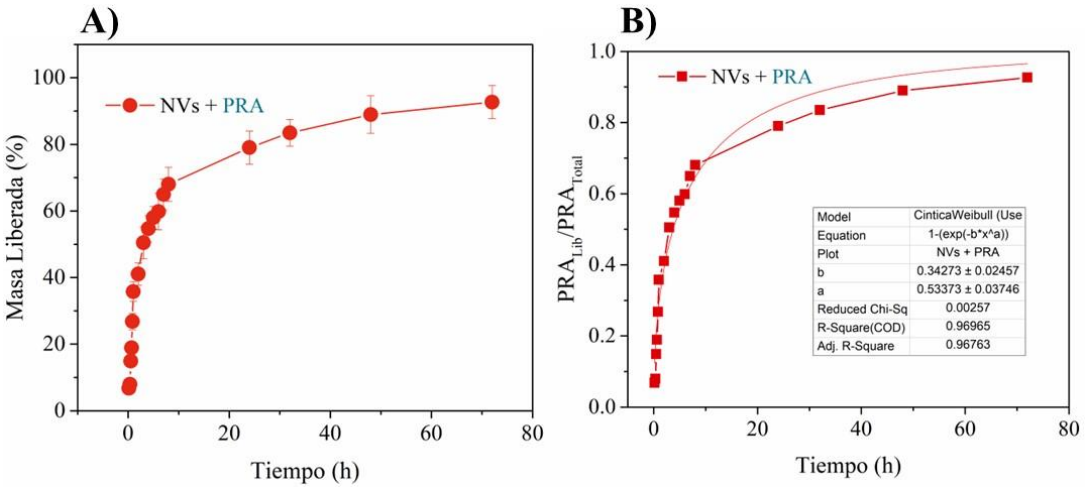


Figura 23. A) Cinética de liberación de NVs + PRA. B) Ajuste matemático con el modelo de Weibull.

Los modelos matemáticos de cinética de liberación de fármacos son herramientas cruciales en el desarrollo y optimización de sistemas de liberación de medicamentos. Permiten predecir cómo se liberará un fármaco de una formulación en el tiempo, lo que asegura que el medicamento alcance las concentraciones terapéuticas deseadas en el cuerpo. Además, ayudan a diseñar y optimizar sistemas de liberación para que liberen el fármaco de manera controlada y eficiente, facilitando la comparación entre diferentes formulaciones. Por otra parte, estos modelos también disminuyen costos y tiempos en la fase de desarrollo al permitir simulaciones previas a los experimentos, los cuales son útiles para cumplir con requisitos regulatorios al proporcionar datos sobre el comportamiento de la formulación en condiciones reales. Asimismo, permiten personalizar terapias ajustando dosis y tasas de liberación según las necesidades del paciente, garantizando la seguridad y eficacia del tratamiento. En el desarrollo de sistemas de liberación prolongada, aseguran una liberación constante y predecible del fármaco, apoyando tanto la investigación fundamental como la producción y regulación farmacéutica.

Aunque existen diversos modelos matemáticos empleados en la industria y en la ciencia para describir la liberación de fármacos, tales como los son el de orden cero, de primer orden, el de Higuch, raíz cuadrada, Korsmeyer-Peppas, entre otros (Pourtalebi Jahromi, Ghazali, Ashrafi, & Azadi, 2020b), el modelo matemático de Weibull (Ecuación 5) es ampliamente utilizado en la descripción de la cinética de liberación de fármacos debido

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a su flexibilidad y capacidad para adaptarse a una variedad de perfiles de liberación. El modelo de Weibull permite modelar la fracción del fármaco liberado en función del tiempo, donde x es el tiempo de liberación inicial, α es un parámetro de escala relacionado con la tasa de liberación, y β es un parámetro de forma que describe la curva de liberación. Además, el parámetro β aporta información sobre los mecanismos de liberación del fármaco: Para valores de $\beta \leq 0.75$ indica una difusión del fármaco en el proceso de liberación de tipo Fickiano, esto es, que tal difusión del fármaco tiene lugar desde áreas de alta concentración (interior de las NPs) a áreas de más baja concentración (exterior de la NP) (Papadopoulou, Kosmidis, Vlachou, & Macheras, 2006). Para tener una mejor compresión de la cinética de liberación del fármaco, se procedió a analizar los datos experimentales de la cinética de liberación del nanosistema NVs + PRA mediante el modelo matemático de Weibull, debido a que su adaptabilidad permite ajustar tanto liberaciones rápidas como lentas y diferentes patrones de liberación, lo que lo hace versátil y útil para ajustar datos experimentales de diversos sistemas de liberación, como tabletas, cápsulas y matrices poliméricas. Como se puede observar en el ajuste presente en la Figura *23*, B), el valor del parámetro β fue de 0.34 ± 0.02, indicando así que el proceso de liberación de la PRA de las NVs es de tipo Fickiano, o sea que va de un gradiente de alta concentración (interior de las NVs) a uno de baja concentración (exterior de las NVs).

3.2.2. Evaluación de la estabilidad coloidal de NVs cargadas con Pravastatina

Una vez estandarizado el proceso de obtención de las NVs cargadas con PRA, se procedió a analizar su estabilidad coloidal para evaluar su comportamiento en medios fisiológicos complejos. Para ello, las NVs se dispersaron en tres medios continuos diferentes: Agua MiliQ, tampón PBS pH 7.4, y medio de cultivo DMEM suplementado con 10% (v/v) se suero bovino fetal, FBS. La razones para la selección de estos tres medios diferentes fueron las siguientes: i) El agua es el medio de redispersión inmediato de las NVs una vez finalizado el proceso sintético estándar; ii) el tampón PBS posee una concentración iónica, osmolaridad y pH similares a los de diversos fluidos y tejidos biológicos (Bunzen, 2021); iii) y el medio de cultivo DMEM suplementado simula las

USC DE COMPOSTELA

condiciones de pH (7.4) y de concentración de proteínas encontradas en el plasma sanguíneo (Cardoso et al., 2020).

Para este análisis se evaluó la evolución temporal del tamaño hidrodinámico e índice de polidispersidad de las NVs durante 72 h. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos. Se observó que, en medio acuoso, el diámetro hidrodinámico y PDI de las NVs cargadas con PRA se mantienen prácticamente constante a lo largo del período de incubación, confirmando que son estables en este medio. Por el contrario, la dispersión en PBS mostró un incremento progresivo del tamaño durante las primeras 24 h de incubación de ca. 220 ± 3 a 280 ± 4 nm probablemente relacionado con la necesidad de equilibrar la presión osmótica entre el medio exterior e interior de las NVs para, posteriormente, experimentar un proceso de crecimiento adicional de su tamaño mucho más abrupto y pronunciado hasta alcanzar los 500 ± 20 nm. Este último puede deberse a la presencia relativamente importante de iones presentes en el medio salino que dan lugar a un apantallamiento progresivo de las cargas superficiales de las NVs disminuyendo la carga superficial de las NVs favoreciendo su agregación, lo que se traduce en un aumento en el diámetro hidrodinámico detectado por DLS (Trenkenschuh & Friess, 2021). Por último, el tamaño de las NVs cargadas en DMEM suplementado con FBS se incrementó ligeramente con el paso del tiempo y no se ha detectado agregación/precipitación en el sistema. Sin embargo, los valores de PDI fueron muy elevados, alrededor de 0.9 (Figura 24, B)) lo que indica la existencia de poblaciones de NPs y/o especies químicas heterogéneas de tamaños diversos; a este respecto, las proteínas del suero contribuyen de manera importante a esta polidispersidad pues presentan tamaños un orden de magnitud inferiores a los de las NVs, (Saleh et al., 2020).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

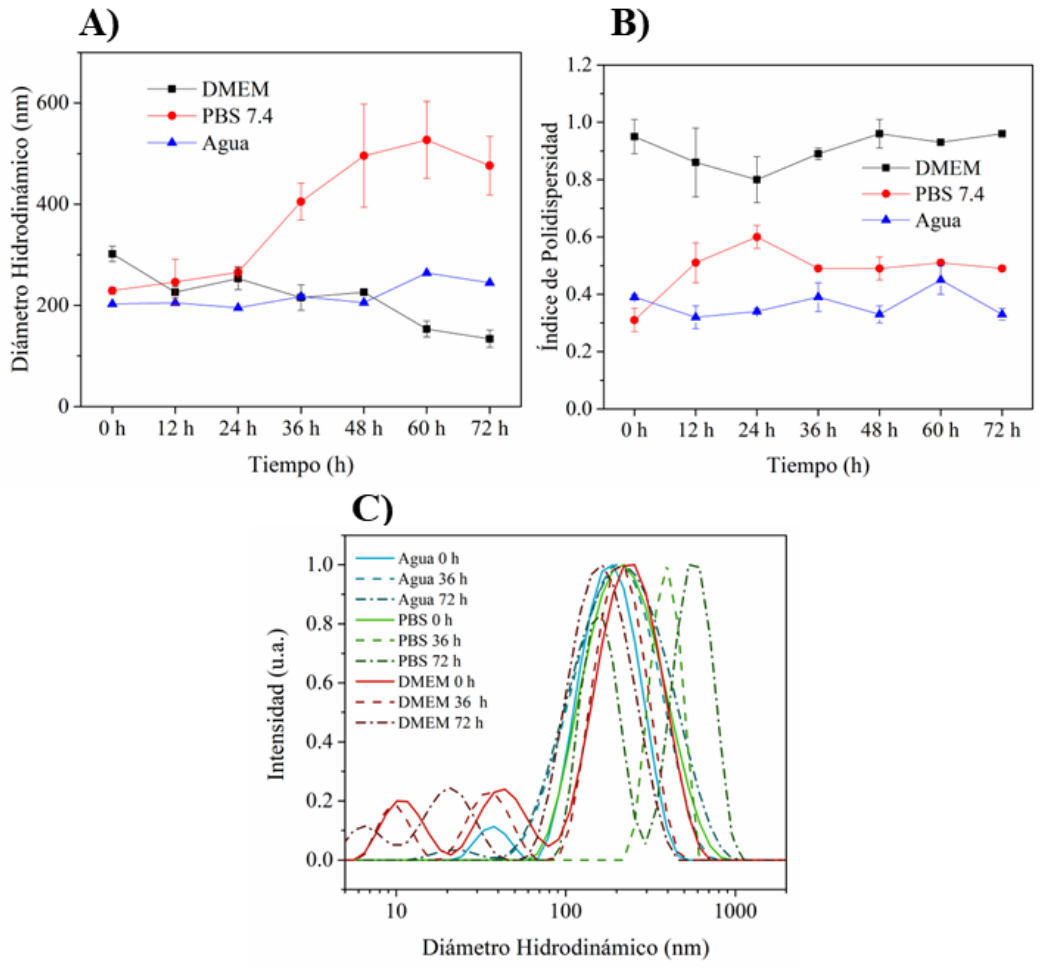


Figura 24. Estabilidad de NVs + PRA en agua, tampón PBS 7.4 y DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS. A) Diámetro hidrodinámico. B) Índice de polidispersidad. C) Distribución de tamaños de las NVs cargadas en los distintos medios a varios instantes de tiempos de incubación.

3.2.3. Evaluación in vitro de la biocompatibilidad de las Nanovesículas cargadas

A continuación, se procedió a evaluar la biocompatibilidad de las NVs cargadas con PRA bajo similares condiciones y empleando idénticas líneas celulares que en el caso de las NVs vacías descritas previamente, esto es, líneas celulares de macrófagos murinos RAW 264.7, fibroblastos de ratón Balb/c 3T3, células de cáncer cervicouterino humano, HeLa, y células mesenquimales humanas de tejido adiposo. La Figura 25 muestra los resultados obtenidos tras la administración cuatro concentraciones distintas de NVs

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cargadas con el fármaco y evaluadas tras tiempos de incubación de 24 (A) y 48 h (B), respectivamente. Los datos experimentales obtenidos confirman viabilidades celulares por encima del 80% en todas las líneas celulares tras 24 h y 48 h de incubación, valores muy similares a los obtenidos para las NVs vacías. Estos resultados sugieren que la incorporación de PRA en las NVs no afecta a su biocompatibilidad, confirmando la biocompatibilidad del nanotransportador biomimético.

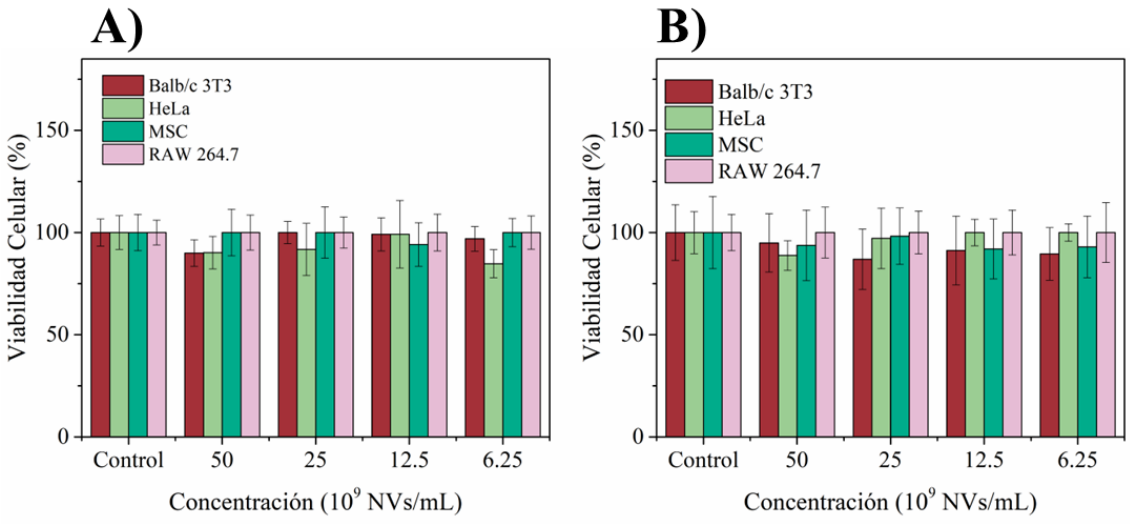


Figura 25. Ensayos de viabilidad celular de NVs cargadas con PRA tras A) 24 h y B) 48h de incubación.

3.2.4. Internalización Celular de las Nanovesículas

Una vez comprobado que las NVs cargadas con la estatina no afectan en absoluto a la viabilidad celular en las condiciones evaluadas, se procedió a estudiar su capacidad de internalización en las líneas celulares evaluadas previamente (Balb/c 3T3, HeLa, RAW 264.7 y adMSC) mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo tras 3 y 6 h de exposición. Para ello, se incorporó un fosfolípido marcado fluorescentemente (relación membrana: lípido 500:1 (v/v)), en este caso, el 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoethanolamina marcado con la sonda fluorescente ATTO 488 (DOPE ATTO 488), que se inserta en la doble capa de las NVs, durante el proceso de reconstitución de las NVs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) (Figura 26) derivados de las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 27 y Figura 28) muestran que, tras una incubación de 3 h de las células en presencia de las NVs cargadas con la estatina, las células internalizan una cantidad relativamente importante del nanotransportador biomimético. Esta es más elevada en el caso de las células HeLa comparada con las demás líneas celulares, hecho que puede estar directamente relacionado con su metabolismo mucho más acelerado (Ciccarese, Raimondi, Sharova, Silic-Benussi, & Ciminale, 2020; X. Hou, Zaks, Langer, & Dong, 2021). Cabe destacar también que la internalización celular de las NVs cargadas en los macrófagos murinos tras 3 h de incubación es muy reducida, destacando pues el biomimetismo del nanotransportador que evita en gran parte su reconocimiento por este tipo celular directamente implicado con los procesos de detección y eliminación de agentes foráneos en el sistema biológico (C. Gao et al., 2020b).

Por otra parte, al incrementar el tiempo de incubación a 6 h se observó un aumento en los valores de MFI y, por consiguiente, un incremento en los niveles de internalización celular en todas las líneas celulares confirmándose una dependencia de este proceso con el tiempo de exposición, al menos en el intervalo temporal analizado, estableciéndose el siguiente orden de internalización: HeLa > adMSCs > Balb/c 3T3 > RAW 264.7.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

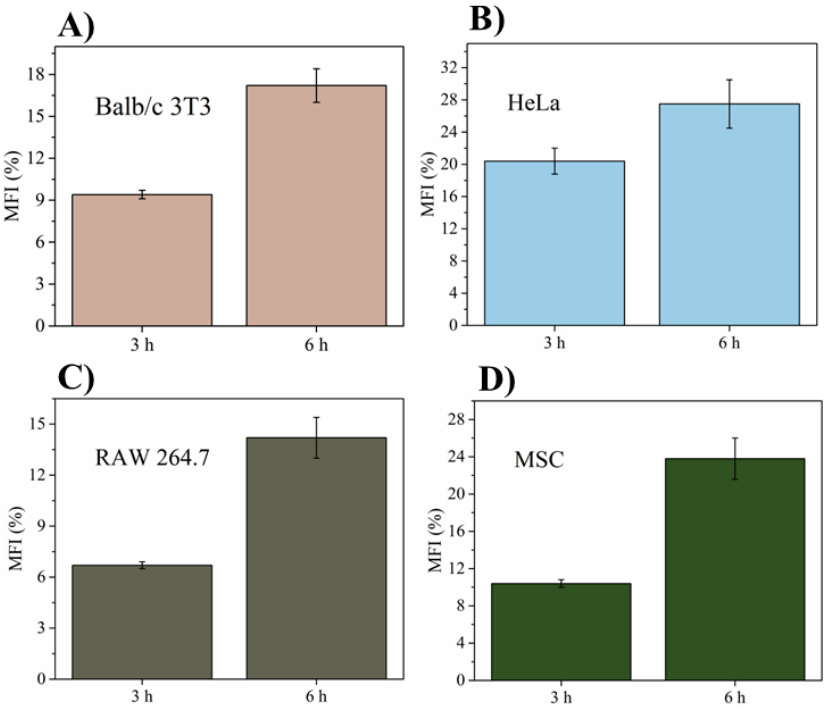


Figura 26. Intensidad de fluorescencia media derivadas de las imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA y marcadas fluorescentemente con DOPE-ATTO 488 tras 3 y 6 h de exposición, respectivamente, en células A) Balb/c 3T3, B) HeLa, C) RAW 264.7, y D) adMSC.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

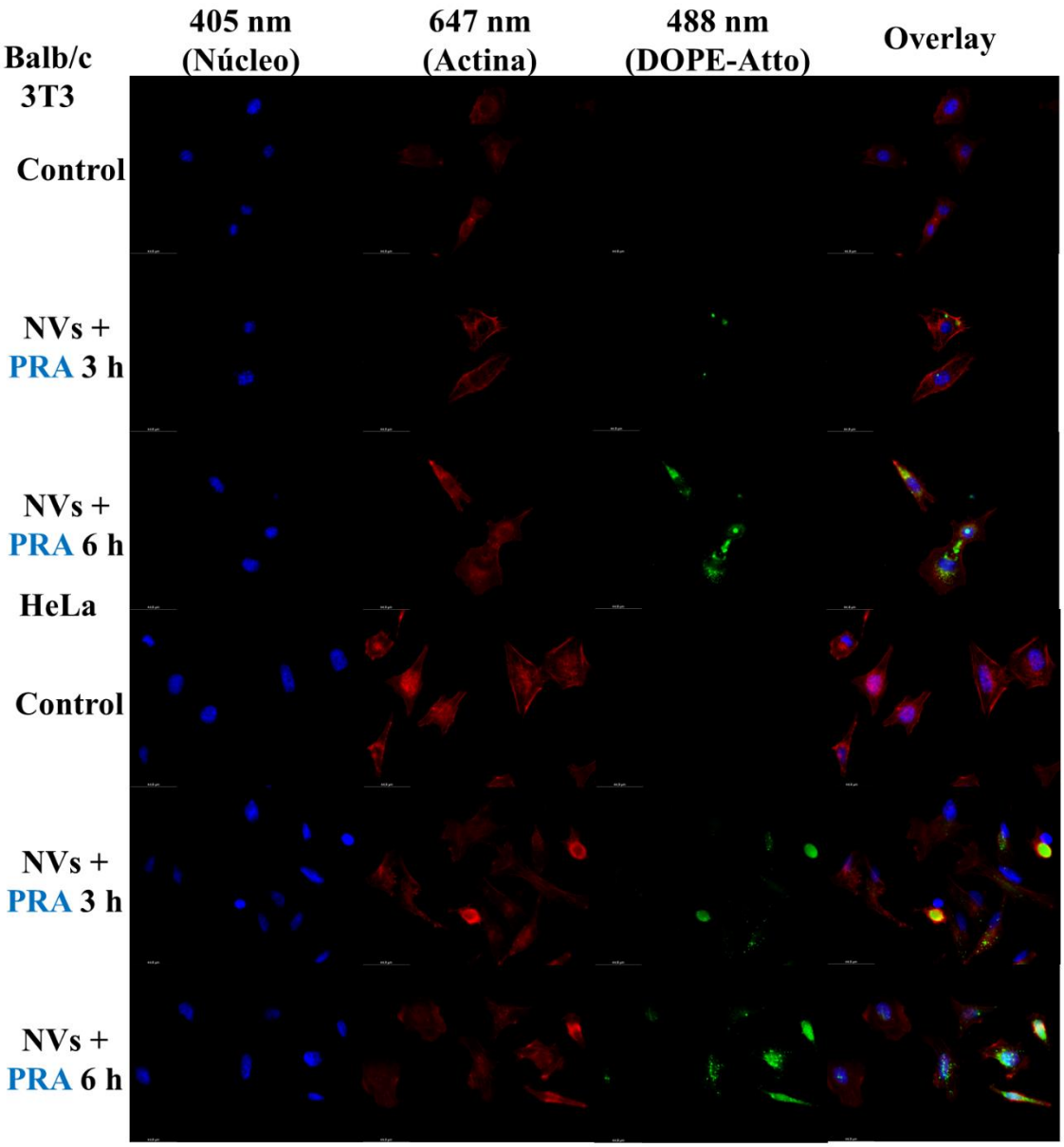


Figura 27. Imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA en fibroblastos murinos Balb/c 3T3 y células de cáncer cérvico uterino HeLa tras 3 y 6 h de incubación. El canal azul muestra el núcleo celular teñido con DAPI (λ_{ex}: 355 nm); en rojo se muestran los filamentos de actina (λ_{ex}: 650 nm), en el canal verde se muestran las NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488 (λ_{ex}: 502 nm), y en la columna final la imagen con todos los canales superpuestos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

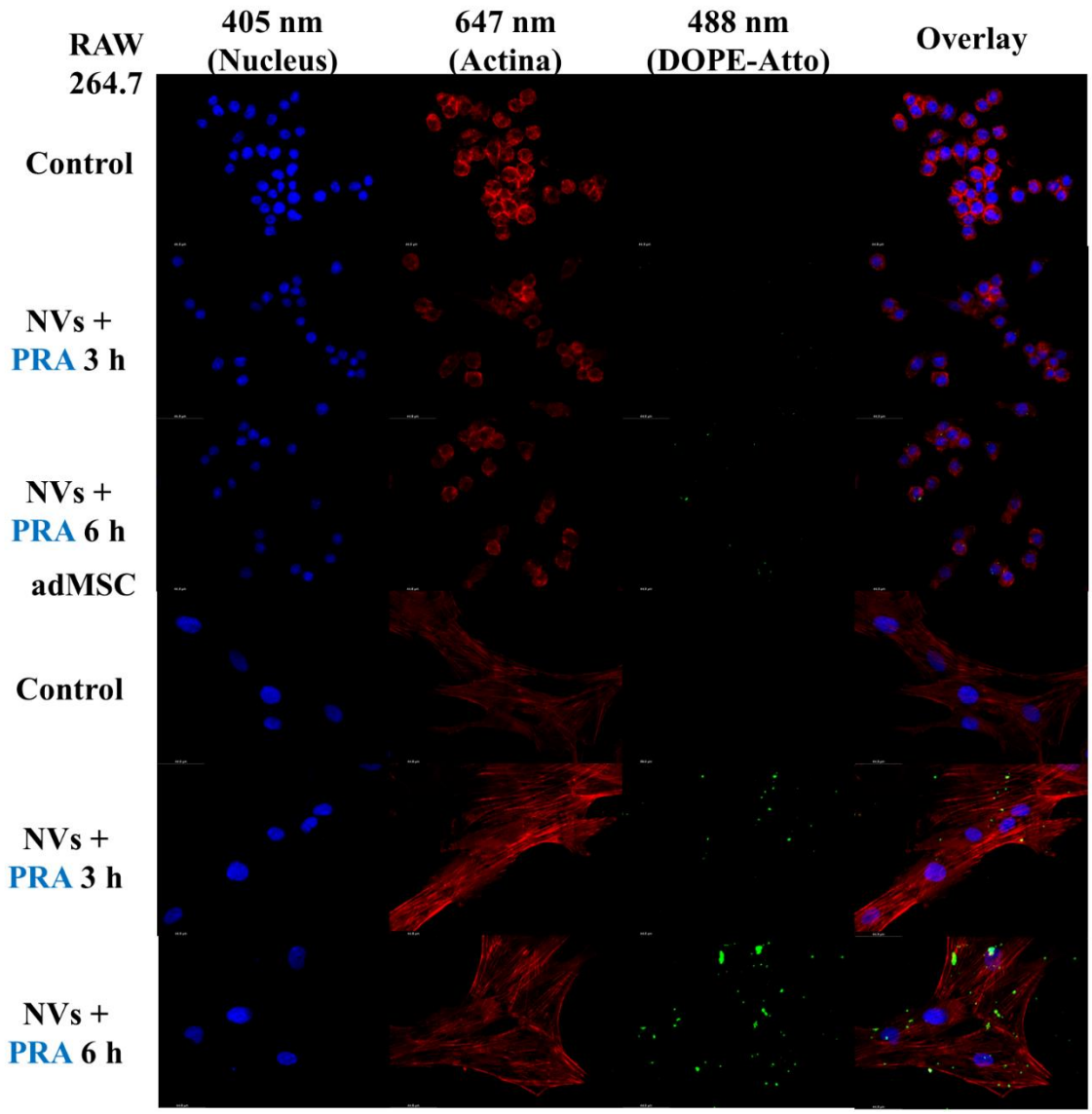


Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia de NVs cargadas con PRA en macrófagos RAW 264.7 y células mesenquimales adiposas tras 3 y 6 h de incubación. El canal azul muestra el núcleo celular teñido con DAPI (λ_{ex}: 355 nm); en rojo se muestran los filamentos de actina (λ_{ex}: 650 nm), en el canal verde se muestran las NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488 (λ_{ex}: 502 nm), y en la columna final la imagen con todos los canales superpuestos.

Para confirmar los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia, se procedió a realizar un análisis cuantitativo para determinar la capacidad de internalización celular de las NVs cargadas con PRA mediante citometría de flujo. Para esto, las NVs fueron dopadas fluorescentemente con DOPE-Atto 488, las cuales se incubaron las mismas líneas

USC DE COMPOSTELA

celulares e idénticas condiciones de incubación (3 y 6 h). Las muestras fueron irradiadas con un láser de 488 nm y la señal de emisión de fluorescencia se colectó a 530 nm, comparándose las intensidades de emisión de las células solas (en ausencia de NVs) y la de las NVs marcadas fluorescentemente colocalizadas con las células. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos. En primer lugar, observan incrementos significativos de la MFI en función del tiempo de incubación como se observó en las imágenes de microscopía de fluorescencia, confirmando la dependencia del tiempo de exposición con la internalización celular, al menos en el intervalo analizado. En segundo lugar, se corrobora la escasa detección y posterior incorporación de las NVs cargadas por parte de los macrófagos, confirmándose que la NVs son apenas reconocidas por este tipo celular como elemento externo y, por lo tanto, no procediendo a su captura y posterior eliminación. Por otro lado, las NVs + PRA son especialmente internalizadas por e las células HeLa y las mesenquimales, particularmente las primeras gracias a su metabolismo acelerado. No obstante, este proceso de internalización a priori podría parecer estar en contra del pretendido direccionamiento homotípico de este nanosistema biomimético; sin embargo, es necesario tener en cuenta que las condiciones de cultivo bidimensional celular efectuado favorece de manera importante la interacción entre las NPs y las células, facilitando su interacción con las células y posterior captura.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

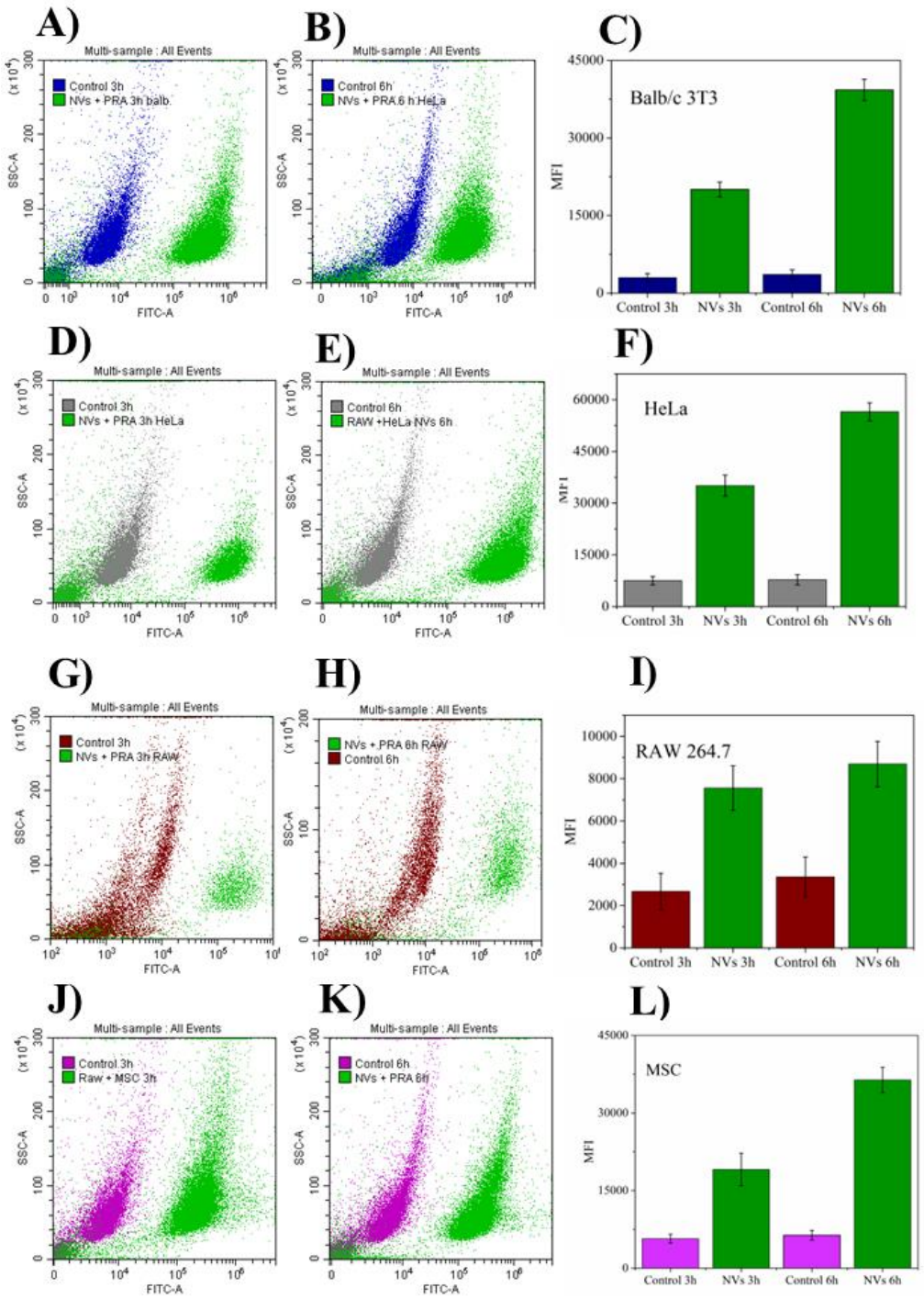


Figura 29. Análisis de citometría de flujo de células tratadas con NVs cargadas con PRA marcadas con DOPE-ATTO 488. Las células en ausencia de la nanoplataforma se emplearon como control negativo. Diagramas de densidad de dispersión lateral (SSC) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm (canal FITC-A). Balb/c 3T3 3 h (A) 6 h (B), HeLa 3 h (D) 6 h (E), RAW 264.7 3 h (G) 6 h (H), MSC 3 h (J) 6 h (K). Valores de MFI de Balb/c 3T3 (C), HeLa (F), RAW 264.7 (I) y adMSCs (L).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los pacientes ateroscleróticos en la gran mayoría de los casos presentan niveles altos de colesterol y, en particular, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, lo que favorece en gran medida la formación de la placa aterosclerótica (Mortensen et al., 2023; Mortensen & Nordestgaard, 2020). En estudios previos se ha observado que la PRA, además de sus propiedades antiinflamatorias cuenta con la capacidad de disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno, de citoquinas pro-inflamatorias y/o propiciando el transporte reverso de colesterol (Poznyak et al., 2022; Sucharski & Koenig, 2022; Von Eckardstein, 2020). A este respecto, de manera habitual el colesterol es sintetizado en el hígado, y es transportado a los tejidos mediante las LDL. De manera inversa, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son las encargadas de transportar el colesterol de los tejidos hacía el hígado para ser metabolizado, a este proceso se le denomina transporte reverso de colesterol reverso (TCR) (Pownall, Rosales, Gillard, & Gotto, 2021), lo que favorece la disminución de colesterol en sangre.

Por este motivo, de cara a establecer la potencialidad terapéutica de las NVs cargadas con la estatina se procedió a evaluar tanto para evitar el estrés oxidativo celular como su capacidad de generar la liberación de colesterol desde células espumosas. Para determinar la capacidad inhibitoria de ROS se sometieron cuatro líneas celulares a estrés oxidativo y se administraron las NVs cargadas con la estatina a concentraciones de 25, 50 y 100 nM de la estatina encapsulada. La Figura 30, muestra los resultados obtenidos. Se observa que en las cuatro líneas celulares evaluadas se produjo una importante disminución de los niveles de generación de ROS, incluso a niveles inferiores a los detectados para el control negativo (células sanas), gracias a la potente actividad antiinflamatoria de la PRA (Satny et al., 2021) puesto que la generación de ROS está directamente relacionada con los procesos inflamatorios (X. Huang, He, Pan, Luo, & Deng, 2021; Simpson & Oliver, 2020). Así mismo, estos resultados nos indicarían, de manera indirecta, que el efecto terapéutico del fármaco no se ve afectado al estar encapsulado dentro de las NVs.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

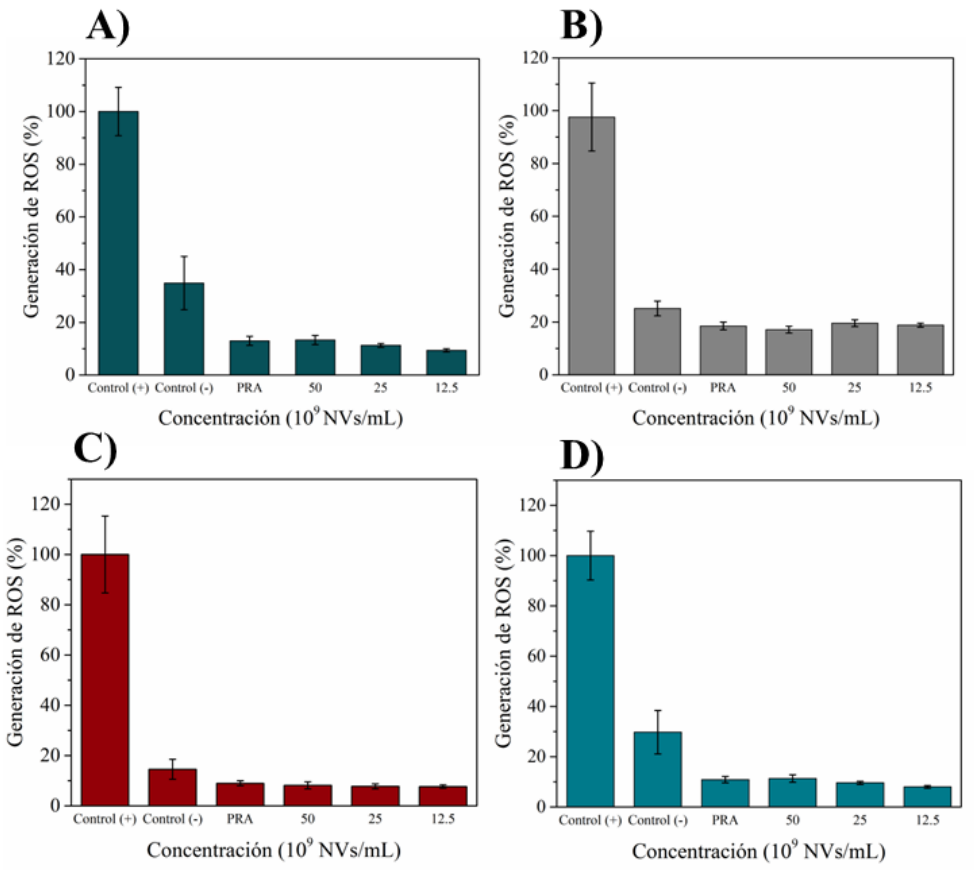


Figura 30. Generación de ROS de NVs cargadas con PRA tras 24 h de exposición en las líneas celulares: A) Fibroblastos Balb/c 3t3, B) cáncer cérvico-uterino humano, HeLa, C) macrófagos murinos RAW 264.7, D) células madre mesenquimales de tejido adiposo.

Para determinar la capacidad de estimular la expulsión de colesterol de las células, se cultivaron células espumosa a partir de macrófagos RAW 264.7 expuestos a LDL oxidada (ox-LDL) y colesterol. El colesterol se marcó fluorescentemente para realizar su seguimiento y cuantificación. Una vez obtenidas las células espumosas, estas se expusieron a la estatina libre, las NVs vacías y cargadas con el fármaco a una concentración de 100 nM, y se midió la cantidad de colesterol que se expulsaba desde las células espumosas y se liberaba al medio. La Figura 31, A) muestra los resultados obtenidos. Como era de esperar, la administración del fármaco PRA libre generó una liberación considerable de colesterol en comparación al control negativo (células solas), confirmando que cuenta con esta capacidad de propiciar la liberación de este lípido

USC DE COMPOSTELA

desde las células espumosas. Las NVs vacías no presentaron ningún efecto en los niveles de colesterol liberado. Sin embargo, las NVs cargadas con PRA mostraron un efecto similar al fármaco libre. No obstante, es necesario considerar, que estos ensayos se realizan en condiciones estáticas en cultivos celulares 2D en los que las células tienen una alta biodisponibilidad del fármaco libre. Por el contrario, dentro del organismo, al no contar con un direccionamiento activo, gran parte del fármaco se degrada de manera prematura, haciendo necesario el uso de una mayor dosis para obtener el efecto terapéutico deseado. Por este motivo, la protección, el direccionamiento activo y la evasión del sistema inmune que ofrecen las NVs puede ayudar a propiciar la obtención de un efecto terapéutico similar utilizando una menor dosis de fármaco. Por todo esto, se puede considerar como muy esperanzador que las NVs cargadas con PRA poseen el mismo efecto terapéutico que el logrado con el fármaco libre.

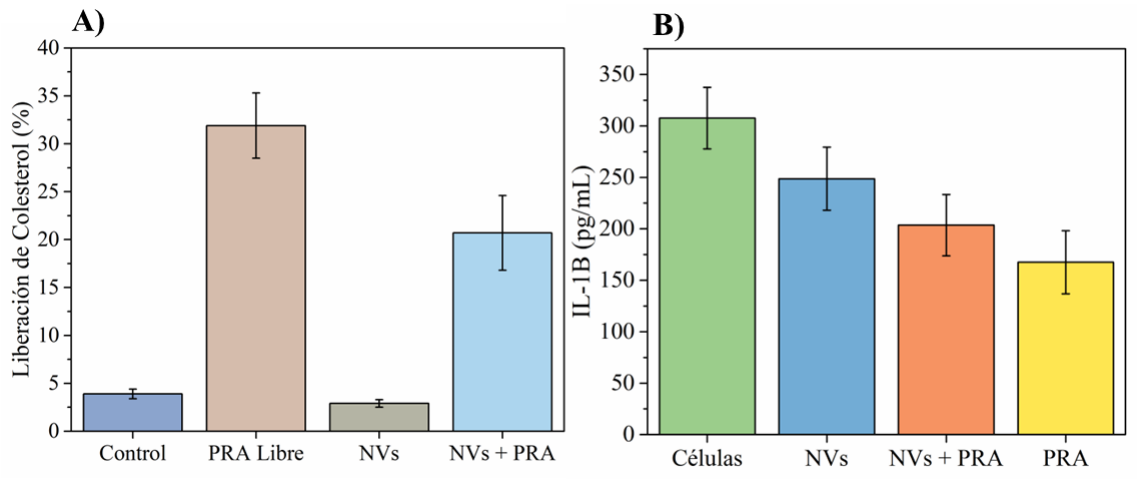


Figura 31. A) Eflujo de colesterol de células espumosas tras 24 h de exposición de NVs + PRA. B) Cuantificación de IL-1β en macrófagos RAW 264.7.

Como se comentó con anterioridad, la AEs se caracteriza por ser una enfermedad crónica donde existe una acumulación de lípidos, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias, las cuales terminan formando una placa que pueden obstruir el flujo sanguíneo. No obstante, el proceso comienza con una disfunción endotelial,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

provocada por factores de riesgo como el colesterol LDL alto, hipertensión, tabaquismo y diabetes, permitiendo que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) penetren y se oxiden en la pared arterial. La presencia de LDL oxidado desencadena una respuesta inflamatoria, facilitando la adherencia y migración de monocitos y linfocitos T hacia la íntima. Los monocitos se diferencian en macrófagos, fagocitan LDL oxidado y se convierten en células espumosas, que liberan citocinas proinflamatorias como IL-1β, TNF-α e IL-6, amplificando la inflamación.

La interleucina 1 beta (IL-1β) es una citocina proinflamatoria crucial en la respuesta inmune del organismo. Producida principalmente por macrófagos y monocitos, la IL-1β desempeña un papel central en la regulación de las respuestas inflamatorias y febriles. Actúa promoviendo la activación de linfocitos T y B y estimulando la producción de otras citocinas y quimiocinas. Además, IL-1β participa en la destrucción de tejido durante procesos inflamatorios crónicos y está implicada en diversas patologías, incluyendo artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y ciertos trastornos autoinmunes. Por este motivo, resulta de gran interés evaluar la capacidad del sistema desarrollado de disminuir la secreción de esta interleucina. Para ello, se realizaron ensayos ELISA para cuantificar la cantidad de IL-1β secretada por macrófagos estimulados con lipopolisacárido para favorecer su inflamación y posteriormente exponerlos al sistema.

La Figura 31, B) muestra que los macrófagos solo estimulados con LPS secretaron alrededor de 300 pg/mL de IL-1β, valor que fue tomado como punto de referencia (control positivo). En primer lugar, se observa que las NVs solas permitieron una pequeña disminución de la actividad inflamatoria, aunque esta no se puede considerar como relevante y se encuentra probablemente dentro de la incertidumbre estadística. Por otra parte, tanto el fármaco libre como encapsulado dentro de las NVs provocó una importante disminución de la secreción de la citocina IL-1β; cabe mencionar que el efecto fue mayor para el fármaco libre probablemente, como consecuencia de la mayor disponibilidad del fármaco debido a la liberación sostenida de este desde el nanotransportador. Esto provoca que su concentración efectiva en el medio celular sea sensiblemente inferior en el intervalo de duración del experimento. Además, al realizarse

USC UNIVERSIDADE

la evaluación en un modelo de cultivo celular 2D dos dimensiones se produce, pues, una mayor biodisponibilidad del fármaco libre. Por ello, el resultado obtenido se puede considerar muy positivo ya que se alcanzó un efecto antiinflamatorio similar del fármaco encapsulado que el del fármaco libre, lo que confirma también que su efecto terapéutico no se ve afectado al estar dentro de las NVs.

En conclusión, se logró desarrollar y estandarizar una metodología para la obtención de NVs a partir de macrófagos murinos RAW 264.7 cargados con un fármaco hidrofílico de la familia de las estatinas, en concreto, PRA. La caracterización físico-química y ensayos in vitro demostraron que el sistema cuenta con las características de tamaño, morfología, eficiencia de encapsulación, biocompatibilidad y de internalización celular fueron adecuados para que se considere su posible aplicación como sistema de liberación contralada de fármaco contra la AEs.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE LA ATEROSCLEROSIS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

4.1. Nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7

Aunque se han realizado grandes avances en el desarrollo de NPs como sistemas de administración y liberación de fármacos basados en materiales orgánicos e inorgánicos, en muchas ocasiones estos nanosistemas pueden ser reconocidos como extraños por el cuerpo humano y, por lo tanto, causar respuestas inmunitarias no deseadas además de poder experimentar una rápida eliminación renal o hepática. Sumado a esto, otro reto que afrontan estos nanovehículos es su degradación prematura y, en consecuencia, la liberación de la carga terapéutica fuera del sitio de acción objetivo dando lugar a una baja eficiencia terapéutica. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos de faciliten la protección de los nanovehículos frente al reconocimiento por el sistema retículo endotelial de tal manera que pueda prolongarse su tiempo de permanencia en el organismo. Una opción para lograr este objetivo es mediante el desarrollo de sistemas biomiméticos, recubriendo a las NPs con membranas celulares incorporando, así, muchas de las funciones y propiedades de las células de origen como la forma y la composición de la superficie prescindiendo, al mismo tiempo, de la complejidad de la maquinaria celular, como se comentó con anterioridad. Gracias a esto, las NPs serían capaces de evadir la eliminación del organismo por parte del sistema inmune protegiendo al nanosistema y a los agentes activos encapsulados mejorando, así, su liberación en el sitio deseado aprovechando la presencia de receptores específicos de estas estructuras celulares.

La principal estrategia utilizada para la obtención de estos sistemas biomiméticos es la denominada top-down, esto es, partir de células completas las cuales se “destruyen” para despojarlas de toda su maquinaria celular interna y emplear únicamente los fragmentos de membrana celular debidamente purificados que se utilizarán

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

posteriormente para realizar el recubrimiento de la nanopartícula. Algunos de los materiales que se han empleado previamente como nanomatrices o nanonúcleos funcionalizados/recubiertos mediante esta aproximación han sido, por ejemplo, liposomas (Z. Liu et al., 2021), NPs de silicio (Sultan et al., 2019), nanocorazas de oro (H. Sun et al., 2017), o NPs magnéticas (J. Li et al., 2018), entre otras.

Respecto a las NPs basadas en polímeros, el ácido poli (láctico-co- ácido glicólico) (PLGA) ha sido utilizado extensivamente en farmacéutica, cosmética, etc., gracias a su probada biocompatibilidad y a que sus productos de degradación (ácido láctico y ácido glicólico) se incorporan en rutas metabólicas celulares. Por estos motivos, la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA) lo ha aprobado para su uso en aplicaciones biomédicas (Ghitman, Biru, Stan, & Iovu, 2020).

Con esto en mente y en base a los resultados previos obtenidos y mostrados en los apartados anteriores, se desarrollaron dos nanoplataformas biomiméticas con una estructura corazón@coraza basadas en núcleos de NPs de PLGA, que tienen la capacidad de encapsular en su estructura interna tanto NPs superparamagnéticas que pueden actuar como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética, y un fármaco de la familia de las estatinas como agente terapéutico, bien uno de carácter hidrófilo (pravastatina, PRA) y otro de carácter hidrófobo (atorvastatina, ATOR), fármacos empleados comúnmente en los tratamientos para disminuir los niveles de colesterol en sangre (Satny et al., 2021; Sultan et al., 2019). Los núcleos poliméricos de PLGA se funcionalizan con un recubrimiento realizado a partir de la membrana celular de macrófagos RAW 264.7 (Figura 32), que le confiere al nanovehículo la capacidad inherente de evadir el sistema inmune, de estabilidad en medios complejos fisiológicos y de direccionamiento activo gracias a los receptores presentes en la estructura membranal, que son propias de las células madre originales (Ai et al., 2021; Oroojalian, Beygi, Baradaran, Mokhtarzadeh, & Shahbazi, 2021; Ziling Zeng & Pu, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

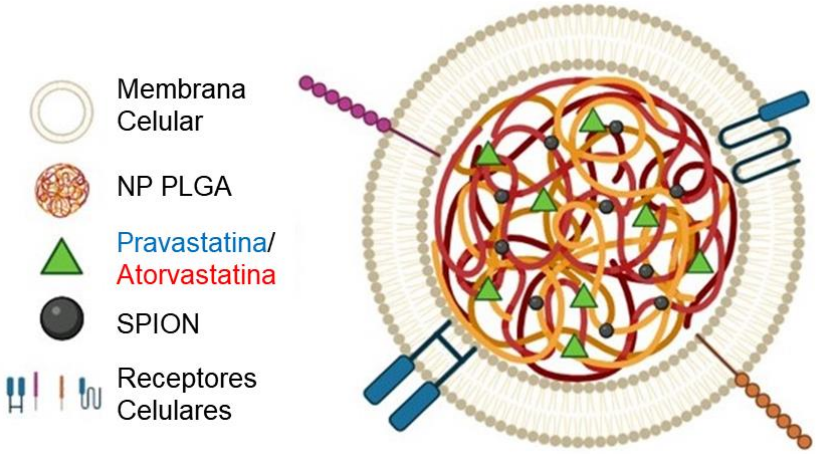


Figura 32. Representación esquemática de nanosistemas biomiméticos desarrollados basados en NPs de PLGA cargadas con SPIONS y la estatina (PRA o ATOR) como nanonúcleos funcionalizados con un recubrimiento de membrana celular proveniente de macrófagos RAW 264.7.

Teniendo como referencia los resultados previamente obtenidos para las NVs con PRA encapsulada, y habiendo comprobado su potencial uso como transportadores de compuestos bioactivos, con el fin de permitir la encapsulación de fármacos hidrófobos en importantes cantidades además de permitir una modulación adicional de la cinética de liberación del principio activo, en caso de ser necesaria, se optó por recubrir nanonúcleos de PLGA con extractos de membrana celular de macrófagos. Además, de esta manera, este tipo de partícula se beneficiaría de un recubrimiento biomimético sobre un tipo de NPs ampliamente empleada en el ámbito biofarmacéutico y, que debiera permitir mejorar sus propiedades como nanotransportador dotándolo de potenciales funcionalidades adicionales a la vez que se superan algunas de sus debilidades (e.g., degradación rápida, reconocimiento por macrófagos y problemas de estabilidad coloidal en determinadas condiciones, etc). La matriz polimérica de PLGA permitiría superar una de las limitaciones del nanosistema basado solo en NVs, siendo esta que en su interior solo se pueden encapsular cantidades significativas de fármacos de naturaleza hidrofílica. En este caso, la matriz polimérica abre la posibilidad de encapsular fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos únicamente mediante una adaptación del proceso de síntesis de los nanonúcleos (Pourtalebi Jahromi et al., 2020b). Para ello, se sintetizaron dos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nanosistemas teragnósticos basados en NPs de PLGA: El primero de ellos, un fármaco hidrófilo (PRA), y un segundo fármaco de carácter hidrófobo (ATOR), encapsulados mediante un proceso de emulsión simple y emulsión doble, respectivamente (Ghitman et al., 2020; D. Zhang et al., 2022); ambos fármacos pertenecientes la familia de las estatinas usados ampliamente en el área clínica para disminuir los niveles de colesterol en sangre y en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Razavi, Mehta, & Sperling, 2022). Por otro lado, se pretende que las NPs superparamagnéticas de magnetita (SPIONS) que se incorporan en el nanovehículo actúen como agente de contraste en bioimagen por resonancia magnética, como se indicó con anterioridad. Además, a las concentraciones encapsuladas y condiciones de aplicación de campo magnético alterno externo adecuados, estas SPIONS podrían también generar calor localizado, esto es, hipertermia magnética (Rezanezhad et al., 2021).

Por último, los nanonúcleos de PLGA se recubren con membrana celular de macrófagos RAW 264.7 debido a la implicación de estas células en la AEs. En particular, los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la AEs, una patología caracterizada por la acumulación de placas lipídicas en las arterias como ya se ha descrito previamente. El proceso se inicia con la disfunción endotelial, que facilita la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la íntima arterial y su posterior oxidación. Este ambiente proinflamatorio induce el reclutamiento de monocitos desde la circulación sanguínea, los cuales se diferencian en macrófagos en el sitio de lesión. Los macrófagos internalizan las LDL oxidadas mediante fagocitosis, transformándose en células espumosas, las cuales se acumulan y forman la estructura inicial de la placa aterosclerótica (Barrett, 2020; Eshghjoo, Kim, Jayaraman, Sun, & Alaniz, 2022), como se comentó ya con anterioridad. Por este motivo, el recubrimiento biomimético confiere al nanovehículo la capacidad de evadir del sistema inmune evitando, así, su degradación temprana, así como de un direccionamiento activo al sitio de la afección debido a la presencia de los receptores en la membrana, específicamente las integrinas α4β1 que se unen a los receptores moleculares de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), sobreexpresados en el endotelio vascular inflamado (Troncoso et al., 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.1. Síntesis y Caracterización de SPIONS por Descomposición Térmica

Las SPIONS pueden actuar como excelentes agentes de contraste en bioimagen por resonancia magnética gracias a su alta susceptibilidad magnética y potencial biocompatibilidad. Su diseño ajustable y capacidad para ser funcionalizadas permite una mejor distribución y detección precisa en el cuerpo humano, mejorando la resolución y sensibilidad de las imágenes diagnósticas (P. Dong et al., 2021).

Para la síntesis de las SPIONS, se empleó la metodología de descomposición térmica (ver el Capítulo de Materiales y Métodos para los detalles) ya que es un proceso sintético muy eficaz y versátil que permite producir NPs de magnetita (Fe_3O_4) con un control preciso de su tamaño y propiedades magnéticas asegurando, al mismo tiempo, una alta pureza, buen rendimiento y poblaciones homogéneas (Pardo et al., 2020a). Su simplicidad y eficiencia lo hacen ideal para la producción a escala, adaptándose los nanoproductos obtenidos a diversas aplicaciones en nanomedicina y nanotecnología (Pardo et al., 2021).

Inicialmente, se comprobó la obtención exitosa de SPIONS monodispersas mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 33 muestra las micrografías obtenidas, en las que se pueden observar NPs esféricas de 7.6 ± 1.7 nm de diámetro con una distribución de tamaños completamente homogénea, característica de este proceso sintético. Estos resultados están en concordancia con valores de tamaño de partícula previamente obtenidos empleando condiciones sintéticas parecidas de ca. 9.3 ± 0.8 nm, 7.1 ± 0.7 nm y 6.5 ± 0.6 nm (Pardo et al., 2022, 2020b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

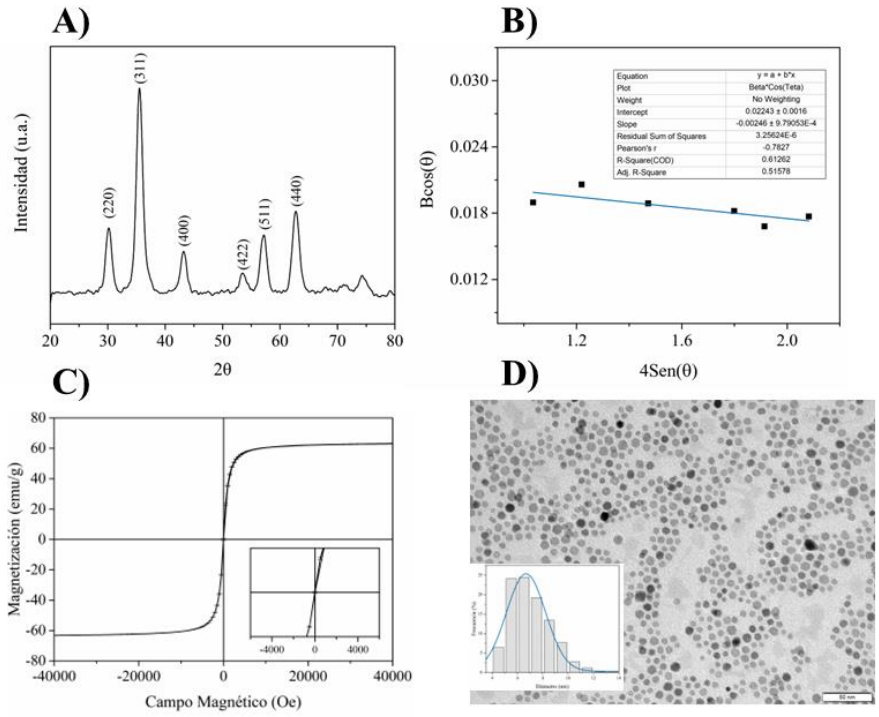


Figura 33. Caracterización de SPIONS. A) Patrón de difracción de rayos X. B) Ajuste matemático de Williamson-Hall. C) Histéresis magnética. D) Micrografías de TEM (Escala 50 nm).

La naturaleza cristalina y la fase de las MNPs obtenidas se analizó mediante difracción de rayos X (XRD). La Figura 33, A) muestra los picos a 30.2°, 35.5°, 37.3°, 43.1°, 53.5°, 57.1°, 62.7° correspondientes a los planos (220), (311), (222), (400), (422), (511), y (440) respectivamente, que confirma la estructura cúbica de espinela inversa de la magnetita. Por otro lado, la ausencia de picos de difracción correspondientes a los planos (113), (210), (213), y (210) de las fases cristalinas de maghemita y hematita, sugiere que la proporción de estos compuestos de hierro no es significativa en las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas (Ibarra et al., 2015; Lotfi, Ghaderi, Bahari, & Mahjoub, 2017; Petcharoen & Sirivat, 2012; Ling Zhang, He, & Gu, 2006), por lo que las partículas obtenidas corresponden a una fase de magnetita pura.

De igual forma, mediante el patrón de XRD se determinó el tamaño promedio del cristalito y el grado de deformación de las MNPs. Aplicando la ecuación (5) y realizando un ajuste lineal de la representación gráfica de βcosθ frente a 4senθ (Figura 33, B)) donde

la pendiente representa la deformación en la muestra, esto es, la tensión presente en la estructura cristalina del material. Así, una mayor deformación puede estar asociada con tensiones internas o defectos en la red cristalina, lo que puede influir en las propiedades mecánicas del material. Por otro lado, el valor de la ordenada en el origen corresponde al tamaño del cristalito. Todos los picos del patrón de difracción fueron utilizados para el análisis mediante el método de Williamson-Hall (Lemes et al., 2014), para realizar una estimación del tamaño de cristalito de las SPIONS más preciso que cuando se usa sólo el pico de mayor intensidad (Lemes et al., 2014). El resultado del ajuste obtenido fue de 6.2 ± 0.1 nm de diámetro, que está en acuerdo con los valores de los tamaños de partícula obtenidos por TEM (Figura 33, D)). Las pequeñas diferencias en el tamaño obtenido por TEM y el ajuste matemático de los datos de XRD se debe a que las dimensiones de las NPs y el tamaño del cristalito no representan exactamente lo mismo: El tamaño del cristalito es la región de la nanopartícula que mantiene la misma estructura cristalina, y esta dimensión puede ser o no igual al tamaño de nanopartícula, ya que una misma nanopartícula puede estar compuesta de varios cristales (Kushwaha & Chauhan, 2021).

A continuación, se evaluaron las propiedades magnéticas de las MNPs mediante medidas de histéresis magnética a 300 K (Figura 33, C)). De estas se pueden obtener los valores de la magnetización de saturación (M_S), que se define como el valor máximo de magnetización que puede alcanzar un material ferromagnético o ferrimagnético cuando se expone a un campo magnético externo. En este punto, todos los momentos magnéticos de los átomos o iones en el material se alinean completamente con el campo magnético aplicado, resultando en una magnetización máxima; por otro lado, el campo coercitivo (H_C) indica la intensidad del campo magnético necesaria para reducir la magnetización de un material ferromagnético o ferrimagnético a cero después de haber sido magnetizado previamente; en otras palabras, es la medida del campo magnético que se debe aplicar en dirección opuesta al campo original para desmagnetizar completamente el material. Y la magnetización remanente (M_R) corresponde a la magnetización que permanece en un material después de que se ha retirado un campo magnético externo aplicado; en otras palabras, es la magnetización residual que queda en el material una vez que se ha magnetizado y luego se ha retirado la fuente de campo magnético (Niculescu, Chircov, & Grumezescu, 2022). A las condiciones evaluadas, para

USC UNIVERSIDADE

las SPIONS sintetizadas se obtuvieron unos valores de M_S, H_c, y M_R de 62 emu/g, 5.03 Oe y 0.02 emu/g, respectivamente. Estos resultados confirman que las SPIONS sintetizadas presentan una elevada magnetización y cuentan con un comportamiento superparamagnético, es decir, en ausencia de un campo magnético externo el momento magnético de cada partícula es de dirección aleatorio, resultando en un momento magnético total igual a cero.

Es necesario comentar que el principal restricción con la que cuenta la imagen por resonancia magnética actualmente radica en que los compuestos de contraste utilizados para la generación de las imágenes de diagnóstico, no generan el contraste lo suficientemente alto para poder distinguir entre los tejidos sanos y afectados y poder realizar un diagnóstico totalmente preciso (Steel, Robertson, & Taube, 2021). Por este motivo, es necesario emplear compuestos que aumenten este contraste. Actualmente, los agentes de contraste empleados en la práctica clínica están basados en complejos de gadolinio, los cuales ayudan a obtener una mejor calidad en las imágenes obtenidas proporcionando un contraste más claro en las bioimágenes, gracias a su contribución del proceso de relajación de espín-red, conocido como relajación tipo 1. Esta mejora en el contraste es dependiente de los coeficientes de relajación, que en el caso del gadolinio alcanzan el rango de 4-6 $mM^{-1}s^{-1}$ (Green et al., 2022). Por otro lado, los coeficientes de relajación de las SPIONS son de alrededor de 30-100 $mM^{-1}s^{-1}$ (Lemal et al., 2020), dando como resultado, a priori un mayor contraste en las imágenes traduciéndose, así, en una mayor sensibilidad en el diagnóstico. Sin embargo, es necesario hacer notar que esta mejora otorgada por las SPIONS se debe al incremento del tiempo de relajación espín-espín, o tipo 2, proporcionando un incremento del contraste negativo (esto es, mayor oscuridad) en las zonas donde se localizan las NPs. Además de ese mayor incremento en los coeficientes de relajación con respecto a los compuestos basados en gadolinio, la biocompatbilidad de la SPIONS, su biodegradabilidad a través del metabolismo del hierro, tamaño y capacidad de funcionalización son propiedades adicionales que las convierte en excelentes candidatas para sustituir a los agentes de contraste convencionales basados en gadolinio (Ganapathe, Mohamed, Yunus, & Berhanuddin, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por todo ello, se procedió a evaluar los coeficientes de relajación transversal (r_2) de las SPIONS obtenidas. Esta relajación, recordemos, es el inverso del tiempo requerido

para que la magnetización transversal del vector de las SPIONs alcance el 37% de su magnitud original después de su excitación inicial. Cuanto mayor sea este valor, mayor será su efecto de contraste negativo proporcionado por las SPIONS. El coeficiente de relajación r_2, que se relaciona directamente con la potencial mejora de contraste de imagen, se obtuvo a partir de la pendiente de la curva que relaciona la tasa de relajación transversal ($R_2 = 1/T_2$) respecto a la concentración molar del agente de contraste. Para ello, se midieron los tiempos de relajación transversal para las SPIONS sintetizadas a varias concentraciones (Tabla *4*).

Tabla 4. Valores de los inversos de los tiempos de relajación transversal de las SPIONs.

Concentración de Fe_3O_4 (mg/mL)	1/T2 (s)
0.5	127.47 ± 5.34
0.25	69.04 ± 3.07
0.125	21.17 ± 0.83
0.05	1.15 ± 0.11
0.005	1.32 ± 0.06
0.0005	1.13 ± 0.02

La Figura 34 muestra el ajuste lineal obtenido, cuya pendiente es igual a 266.8 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$ valores significativamente elevados. En la literatura se pueden encontrar trabajos donde reportan SPIONS de dimensiones de 9 nm con valores del coeficiente r_2 de 130 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$ (Jun et al., 2005), también Pardo y colaboradores reportaron SPIONS de 8.5 nm que presentaron valores de 58 ± 3 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$ (Pardo et al., 2020b), por lo que se puede concluir que las SPIONS sintetizadas presentan valores sensiblemente mejores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

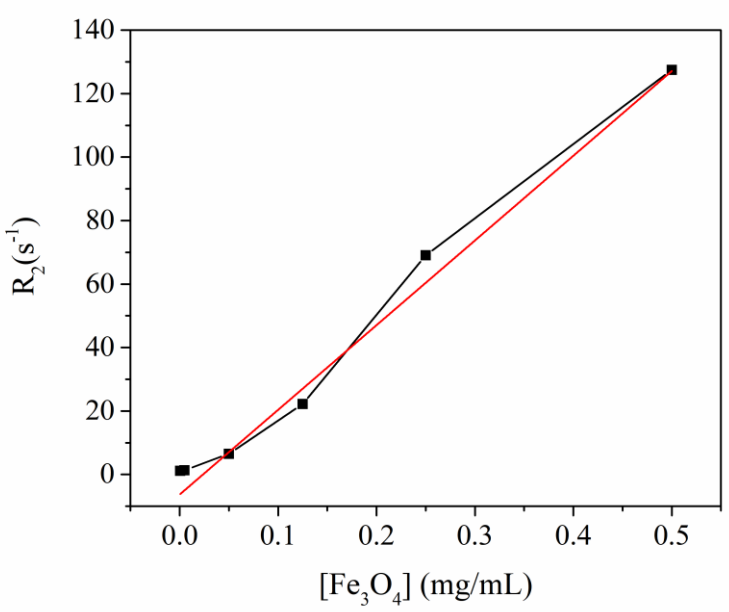


Figura 34. Ajuste lineal de las tasas de relajación transversal frente a concentración de SPIONS.

4.1.2. Optimización del Recubrimiento de las Nanopartículas de PLGA con Membrana Celular

Una vez obtenidas las SPIONS y confirmadas sus propiedades magnéticas se procedió a la obtención de la nanoplataforma biomimética, que consta de nanonúcleos formados por NPs de PLGA capaces de encapsular bien la estatina PRA o ATOR y las SPIONS en su interior, para posteriormente ser sometidas a ciclos de extrusión junto con las NVs vacías de membrana celular para permitir su recubrimiento y dotarlas del carácter biomimético.

Para ello, el primer paso fue evaluar la influencia del incremento de la cantidad de NVs en el diámetro hidrodinámico de las NPs resultantes manteniendo, para ello, constante el número inicial de nanonúcleos de PLGA a razones de PLGA: NVs de 2:1, 1:1, 1:2 y 1:5. En la Figura 35 se observa que las NPs de PLGA (vacías) obtenidas a partir de su síntesis clásica presentaron un diámetro hidrodinámico de ca. 162 ± 8 nm. Cuando se realiza el proceso de recubrimiento a través de la coextrusión de las NPs poliméricas con las NVs de membrana celular de macrófagos RAW 264.7 previamente obtenidas, se puede

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

observar un progresivo incremento en el diámetro hidrodinámico del nanosistema híbrido obtenido conforme la cantidad de NVs inicial se aumenta hasta la relación 1:2 NPs de PLGA: NVs, lo que confirma el recubrimiento progresivo de las NPs de PLGA con la membrana celular. El incremento máximo observado del diámetro de las NPs híbridas con respecto a las NPs de PLGA vacías fue de ca. 20 nm, el cual entra dentro del rango correspondiente al espesor de las bicapa lipídica celular, que es de alrededor de 7.5 – 10 nm (Frallicciardi, Melcr, Siginou, Marrink, & Poolman, 2022; Zhihui Zeng et al., 2020), lo que estaría de acuerdo con un recubrimiento completo de las NPs poliméricas. Por el contrario, a la relación máxima evaluada de 1:5 NPs de PLGA: NVs se observó un incremento abrupto en el diámetro hidrodinámico del nanosistema, así como de la desviación estándar, indicando que un exceso elevado de NVs puede provocar, por un lado, la formación de agregados de partículas y/o la existencia de varias poblaciones de partículas. Basándose en los resultados obtenidos, para los siguientes experimentos se seleccionó la relación NPs de PLGA: NVs de 1:2.

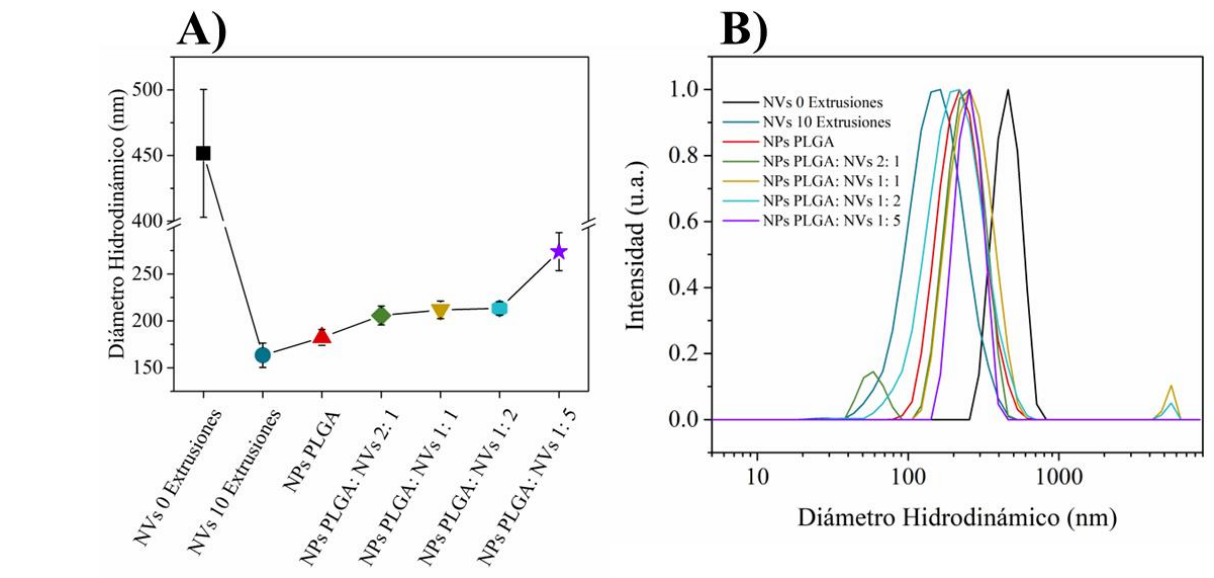


Figura 35. Optimización del recubrimiento de los nanonúcleos de PLGA con la membrana celular de macrófagos RAW 264.7 a distintas razones PLGA: NVs. A) Diámetros hidrodinámicos, B) Distribución de tamaños.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.3. Síntesis y Caracterización de las Nanoplataformas Biomiméticas Formadas por Núcleos de PLGA Cargados con Estatina y SPIONS y Recubiertos con Membrana Celular de Macrófagos

Una vez establecidas la relación de NPs PLGA: NVs óptima para su recubrimiento, se procedió a sintetizar el nanosistema completo. Para ello, se emplearon dos métodos distintos de síntesis de NPs de PLGA en función de la naturaleza de la estatina a encapsular. En el caso de la PRA, al ser un fármaco hidrófilo y que el núcleo de las NPs de PLGA es de naturaleza hidrofóbico, se empleó el método de emulsión simple; por el contrario, para la encapsulación de ATOR se empleó el método de doble emulsión.

Inicialmente, para determinar la cantidad de fármaco ideal para encapsular en los dos sistemas, se prepararon tres formulaciones de distintas variando la relación masa de PLGA: masa de fármaco (70:1, 50:1 y 30:1). La

Tabla *5* muestra los diámetros hidrodinámicos, PDI, potencial ζ, %EE y %DL de los nanosistemas obtenidos. Así, se puede observar un incremento considerable en el diámetro hidrodinámico de las NPs al incorporar los fármacos, mientras que ni el PDI ni la carga superficial de las NPs experimenta cambios significativo. Los incrementos de tamaño pueden deberse a que las moléculas de fármaco quedan atrapadas dentro de la red polimérica de la NP produciendo un cierta expansión de la matriz para acomodar las moléculas del compuesto bioactivo; además, se produce también un incremento de tamaño en función de la cantidad de fármaco añadido, alcanzando unos diámetros máximos de 244 nm en el caso del nanosistema con PRA y 245 nm con el de ATOR, respectivamente, cuando se emplea la mayor cantidad de fármaco, valores que se encuentran en el límite superior aceptable para NPs poliméricas que se deseen emplear para administración intravenosa. Además, es necesario considerar que a estas NPs todavía hace falta incorporarles las SPIONS y recubrirlas con la membrana celular, lo que probablemente generaría un incremento de sus tamaños, llevándolas por arriba de los 250 nm. En cambio, los valores de potencial ζ se mantuvieron prácticamente constantes para todas las nanoformulaciones evaluadas. Por este motivo, esta nanoformulación quedó descartada y se empleó la formulación 70:1 (m: m) en ambos casos, con características fisicoquímicas y eficiencias de encapsulación de los respectivos fármacos

USC DE COMPOSTELA

máximos del 90.3% en el caso de la PRA y del 89.1% en el caso de la ATOR, respectivamente. Ambos valores son elevados y congruentes con resultados previos (Song et al., 2008; S. Ben Sun, Liu, Shao, & Miao, 2015; Watcharadulyarat, Rattanatayarom, Ruangsawasdi, & Patikarnmonthon, 2023; D. Zhang et al., 2022). Aunque los valores %EE y %DL son similares también a los de otros nanosistemas reportados en la literatura, se tiene que considerar que las plataformas desarrolladas en este trabajo son más complejas, ya que incorporan las SPIONS en su estructura. En la literatura se han reportado valores similares tanto de eficiencia de encapsulación como de carga fármaco en NPs de PLGA encapsulando ATOR y PRA, con valores de 71.5 ± 0.1 y 80.3 ± 0.1 (Z. Li et al., 2017) ó 82.0 ± 3.6, 51.7 ± 5.0% (Abdelkader, Abosalha, Khattab, Aldosari, & Almurshedi, 2021) (Elsayed, Girgis, & El-Dahan, 2023).

Tabla 5. Optimización de la carga de PRA y ATOR en NPs de PLGA.

Muestra (Relación m: m)	Diámetro Hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	%EE	%DL
NPs PLGA	162 ± 8	0.10 ± 0.01	-29.9 ± 0.9	-	-
PRA 70: 1	207 ± 4	0.13 ± 0.03	-30.2 ± 1.2	90.3 ± 7.1	1.30 ± 0.12
PRA 50: 1	212 ± 4	0.17 ± 0.04	-31.1 ± 2.5	87.9 ± 6.3	1.76 ±0.13
PRA 30: 1	244 ± 5	0.18 ± 0.05	-32.6 ± 3.7	88.3 ± 8.0	1.32 ± 0.09
ATOR 70: 1	207 ± 5	0.11 ± 0.1	-28.4 ± 4.1	89.1 ± 9.6	1.80 ± 0.11
ATOR 50: 1	217 ± 6	0.12 ±0.04	-27.1 ±2.4	85.3 ± 7.4	1.63 ± 0.07
ATOR 30: 1	245 ± 7	0.15 ± 0.01	-29.7 ± 3.1	81.1 ± 6.8	1.41 ± 0.10

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez definida la relación de masa de fármaco que se emplearía en los nanosistemas, se procedió a optimizar la cantidad de SPIONS que se utilizará. Para ello, se evaluaron dos relaciones PLGA:SPIONS (m:m); en concreto, se evaluaron las relaciones 100:1 y 200:1 (PLGA:SPIONS) (Tabla 6). En este caso, con una relación 100:1 (m:m) se observó un incremento abrupto del diámetro de las NPs, sobrepasando los 250 nm, así como del PDI y acompañado de una importante disminución de la eficiencia de encapsulación de los fármacos, probablemente atribuido al desplazamiento de las moléculas de la estatina al incorporar una importante cantidad de SPIONS que pueden llegar a quedar atrapadas en el interior de las NPs. Por otro lado, cabe mencionar que la presencia de las SPIONs en la matriz polimérica no afecta apenas al valor de la carga superficial de las NPs ni a la capacidad de encapsulación de las estatinas; es más, se produce un sensible incremento de la encapsulación para ambas estatinas siendo especialmente relevante para la ATOR, probablemente consecuencia de un posible efecto sinérgico gracias a un probable incremento de la hidrofobicidad del núcleo polimérico por la presencia de las NPs magnéticas. Por este motivo, se empleó la relación 200:1 como relación óptima para la síntesis del nanosistema y que fue empleada en experimentos posteriores.

Tabla 6. Optimización de la carga de SPIONS en NPs de PLGA

Muestra (Relación m: m)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	%EE	%DL
NPs PLGA + PRA (70: 1)	207 ± 3.7	0.10 ± 0.01	-30.2 ± 1.2	90.3 ± 5.4	1.30 ± 0.12
c/ SPIONS (200: 1)	220 ± 6	0.27 ± 0.03	-26.5 ± 0.7	78.0 ± 2.9	1.81± 0.06
c/ SPIONS (100: 1)	289 ± 2	0.36 ± 0.07	-25.8 ± 0.4	31.5 ± 1.7	0.37 ± 0.03
NPs PLGA + ATOR (70: 1)	207 ± 5	0.11 ± 0.05	-28.4 ± 4.1	89.1 ± 9.6	1.80 ± 0.11
c/ SPIONS (200: 1)	218 ± 8	0.29 ± 0.06	-25.2 ± 1.9	87.3 ± 7.9	2.71 ± 0.18
c/ SPIONS (100: 1)	275 ± 16	0.40 ± 0.03	-24.7 ± 0.8	44.1 ± 3.7	1.33 ± 0.08

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez optimizadas estas condiciones, se procedió a desarrollar los nanosistemas finales, esto es, la realización del recubrimiento de las NPs de PLGA con la membrana celular. La Tabla 7 muestra la evolución de los tamaños de las nanoplataformas, su polidispersidad y carga superficial a medida que se incorporan sus distintos componentes, esto es, a medida que se realiza la encapsulación del agente del contraste y el fármaco y, a continuación, se procede a realizar el recubrimiento biomimético. La Figura 36 muestra la evolución de la distribución de tamaños de las NPs biomiméticas en este proceso. Así, se puede observar que al recubrir las NPs cargadas con los extracto de membrana se produce un ligero incremento en el diámetro hidrodinámico de las plataformas con respecto a las NPs de PLGA sin recubrir de ca. 10-20 nm, siendo ligeramente mayor en el caso de la nanoplataforma con PRA. Este incremento confirma el recubrimiento exitoso de las NPs poliméricas con el recubrimiento polimérico.

Por otro lado, cabe destacar que los valores de PDI obtenidos después del recubrimiento son inferiores a 0.3, con una ligera disminución de este tras el proceso de recubrimiento que puede derivarse del proceso de extrusión empleado para generar el recubrimiento, que ayuda a homogenizar la muestra. Por lo tanto, los nanosistemas biomiméticos se pueden considerar monodispersos (Danaei et al., 2018), como se confirma adicionalmente de las distribuciones poblacionales relativamente estrechas mostradas en la Figura 36. En el caso de los valores de potencial ζ, apenas se observó variación de la carga superficial en los nanosistemas recubiertos con membrana celular respecto a las NPs de PLGA puras (Jan et al., 2023). Sin embargo, si se compara el potencial ζ de las NPs cubiertas con el de las NVs solas (-16 mV), se observa una diferencia considerable, la cual puede deberse a la propia disposición de los elementos que compone la capa biomimética, que puede ser ligeramente distinta respecto a la adoptada en las NVs, por lo tanto, alterando la carga superficial y/o a cierta protusión de algunas cadenas poliméricas hacia fuera del recubrimiento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Diámetro hidrodinámico, PDI y potencial ζ de NPs de PLGA recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
NPs PLGA	182 ± 8	0.10 ± 0.01	-29.9 ± 0.9
NPs PLGA + PRA + SPIONS	220 ± 6	0.27 ± 0.09	-26.5 ± 0.7
NPs PLGA + ATOR + SPIONS	218 ± 8	0.29 ± 0.06	-25.2 ± 1.9
NPs PLGA + PRA + SPIONS + NVs	233 ± 15	0.24 ± 0.04	-26.1 ± 0.8
NPs PLGA + ATOR + SPIONS + NVs	225 ± 17	0.27 ± 0.05	-24.0 ± 1.5

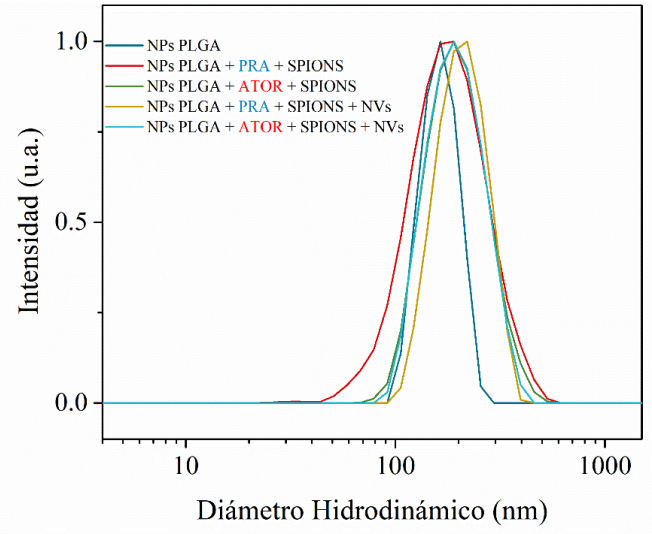


Figura 36. Distribución de tamaños de NPs de PLGA cargadas con SPIONs y la estatina, y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7.

Posteriormente, se procedió a obtener micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) con el propósito de comprobar la morfología y dimensiones de las NPs biomiméticas resultantes. La Figura 37 muestra las imágenes obtenidas, en las que se pueden observar nanoestructuras esféricas monodispersas de alrededor de 180-190 nm

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de diámetro, ligeramente más pequeñas si se comparan con los datos obtenidos por DLS (225 – 230 nm). Esta diferencia es debida a que para la toma de imágenes por SEM es necesario realizar un proceso de secado de las muestras por lo que se produce un proceso de colapso de su estructura mientras que en DLS las NPs están hidratadas, por lo que, en consecuencia, su tamaño es superior. Por otro lado, puesto que para poder observar las NPs por SEM fue necesario realizar un recubrimiento con iridio ya que la gran mayoría de los componentes son de naturaleza orgánica y no tienen una alta densidad electrónica, lo que provoca que tengan poco contraste a la hora de obtener las imágenes, fue imposible verificar mediante esta técnica que las NPs estaban recubiertas con la membrana celular o si las SPIONS se encontraban dentro de las mismas.

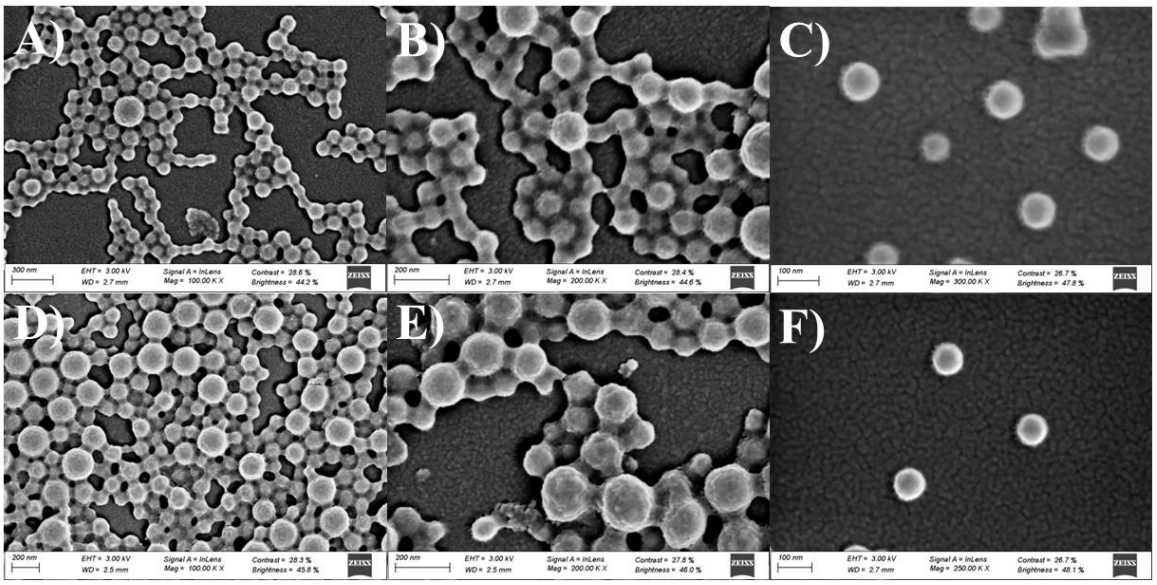


Figura 37. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de: nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escalas de A) 300 nm, B) 200 nm, C) y 100 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de D) 300 nm, E) 200 nm, y F) 100 nm).

Para comprobar que las SPIONS se encapsularon satisfactoriamente dentro de las NPs de PLGA se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se obtuvieron imágenes antes y después del proceso de recubrimiento con la

USC DE COMPOSTELA

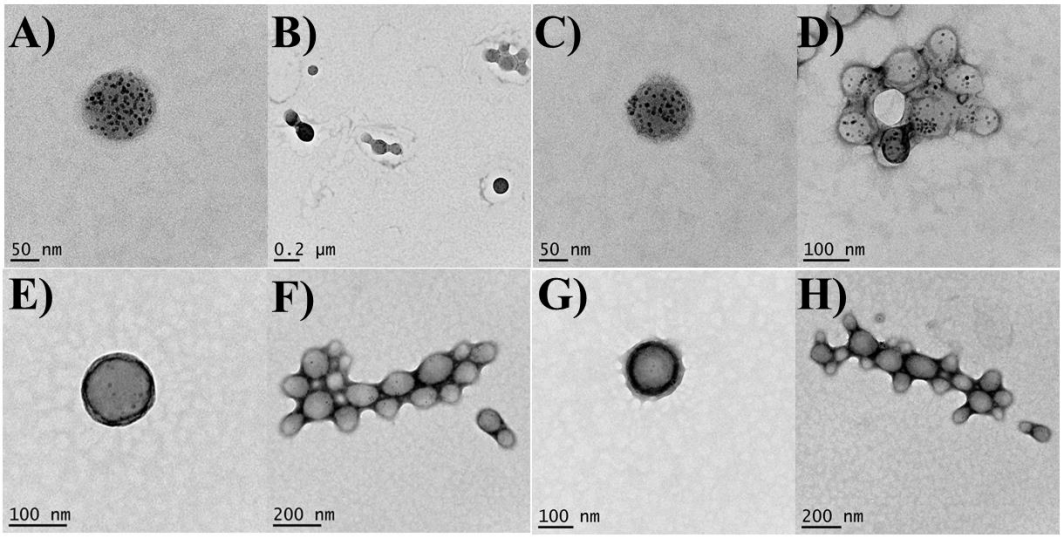


Figura 38. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas. Escala de (A) 50 nm y B) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de (E) 100 nm y (F) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas. Escala de (C) 50 nm y (D) 200 nm. Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. Escala de (G) 100 nm y (H) 200 nm.

membrana celular. Las imágenes se muestran en la Figura 38. La Figura 38 A), B), C) y D) muestran las NPs de PLGA con las SPIONS y el fármaco encapsulado sin recubrimiento celular. En ellas, se pueden observar nanoestructuras esféricas monodispersas de alrededor de ca. 180 nm de tamaño con partículas mucho más pequeñas con alto contraste en su interior de alrededor de 6-7 nm, que se corresponden con los tamaños observados en las imágenes de TEM para las SPIONS, lo que confirma su satisfactoria incorporación en el interior de los núcleos poliméricos. Por otro lado, la Figura 38 E), F), G) y H) muestran las imágenes del nanosistema híbrido biomimético completo, esto es, los núcleos poliméricos de PLGA con el fármaco y las SPIONS en su interior y recubiertos con la membrana celular. De manera similar al sistema sin el recubrimiento de membrana celular, fue posible observar las SPIONS en el interior de las nanoplataformas confirmando que el proceso de recubrimiento no afecta ni a la integridad de las núcleos poliméricos ni a la encapsulación de las SPIONS. Así mismo, fue posible observar un pequeño sombreado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alrededor de las NPs de un espesor de unos 10 nm correspondiente a la doble capa formada por la membrana celular en torno a la NP polimérica (Frallicciardi et al., 2022; Zhihui Zeng et al., 2020), que estaría de acuerdo con el grosor de la membrana celular confirmando, pues, que el recubrimiento de las NPs con la membrana celular se llevó a cabo de manera íntegra.

Una vez comprobado que las SPIONS fueron encapsuladas de manera satisfactoria dentro de las NPs PLGA y realizado el recubrimiento total de estas con las membranas celulares, se realizó un análisis de las propiedades magnéticas de las nanoplataformas biomiméticas con el fin de comprobar si las propiedades superparamagnéticas de las SPIONS se mantenían en la nueva nanoestructura. La Figura 39 muestra los resultados de los ensayos de histéresis magnética realizados, empleando como control las SPIONS no encapsuladas (Figura 39, A)). En la Figura 39 B) y C) se muestran los nanonúcleos de PLGA con PRA o ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7, respectivamente.

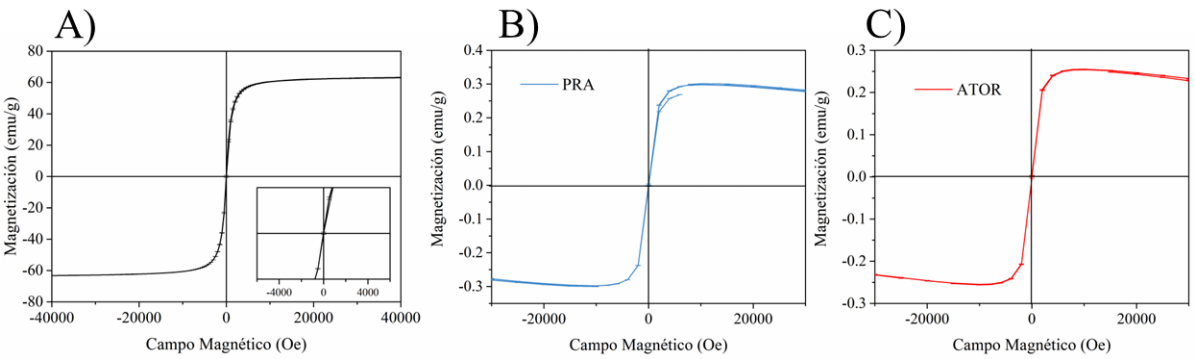


Figura 39. Ciclos de histéresis magnética a 300 K. A) SPIONS. B) Nanonúcleos de PLGA con PRA y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular de macrófagos RAW 264.7. C) Nanonúcleos de PLGA con ATOR y SPIONS incorporadas y recubiertas con membrana celular

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como se puede observar, para ambas nanoplataformas el comportamiento magnético observado fue muy similar al de las SPIONS solas, esto es, una ausencia de la histéresis magnética, dando como resultado valores de magnetización remanente y campo coercitivo prácticamente nulos (Tabla 8), lo que indica un comportamiento superparamagnético. No obstante, los valores de M_S en las nanoplataformas fueron unas 200 veces inferiores que el obtenido para las SPIONs libres, posiblemente consecuencia directa de i) una proporción/concentración de material magnético inferior en las nanoplataformas, y ii) la presencia de los otros materiales que componen la nanoplataforma, el PLGA y los fragmentos de membrana celular, los cuales son diamagnéticos, esto es, presentan una débil repulsión frente a la aplicación de un campo magnético externo.

Tabla 8. Valores de campo coercitivo (HC), magnetización de saturación (MS) y magnetización remanente (MR) a una temperatura de 300 K.

Muestra	H_C (Oe)	M_S (emu·g^{-1})	M_R (emu·g^{-1})
Fe_3O_4	5.03 ± 0.43	62.2 ± 4.3	0.02 ± 0.01
NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs	26.02 ± 1.71	0.30 ± 0.02	0.04 ± 0.01
NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs	22.99 ± 1.89	0.25 ± 0.01	0.01 ± 0.01

Finalmente, también se procedió también a determinar la capacidad como agente de contraste como en el caso de las SPIONs libres, y analizando si la encapsulación de las NPs puede afectar a sus propiedades de relajación magnética Figura 40. La Tabla 9 muestra los valores del ajuste lineal de los datos experimentales obtenidos para las NPs biomiméticas. Como se puede observar se produce una cierta disminución en los coeficientes de relajación r_2 de las nanoplataformas híbridas respecto al obtenido para las SPIONS libres. Este hecho puede atribuirse a que cuando se encapsulan en el seno del núcleo polimérico las NPs están podrían agruparse en clústeres además de encontrarse

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

en el seno de un medio diamagnético, lo que podría alterar su comportamiento magnético (Alonso et al., 2016). No obstante, el hecho de que las plataformas sigan presentando valores de r_2 relativamente altos de ca. 120 $mM^{-1}s^{-1}$, hace que cuenten con un gran potencial para ser utilizados como agentes de diagnóstico mediante imagen de resonancia magnética de la AEs.

Tabla 9. Coeficientes de relajación (r2) de SPIONS y NPs Biomiméticas.

Muestra	Coeficiente de relajación (r_2)
SPIONS	266.8 ± 14.0 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$
NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs	121.9 ± 11.6 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$
NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs	117.9 ± 13.2 $mM^{-1}{\cdot}s^{-1}$

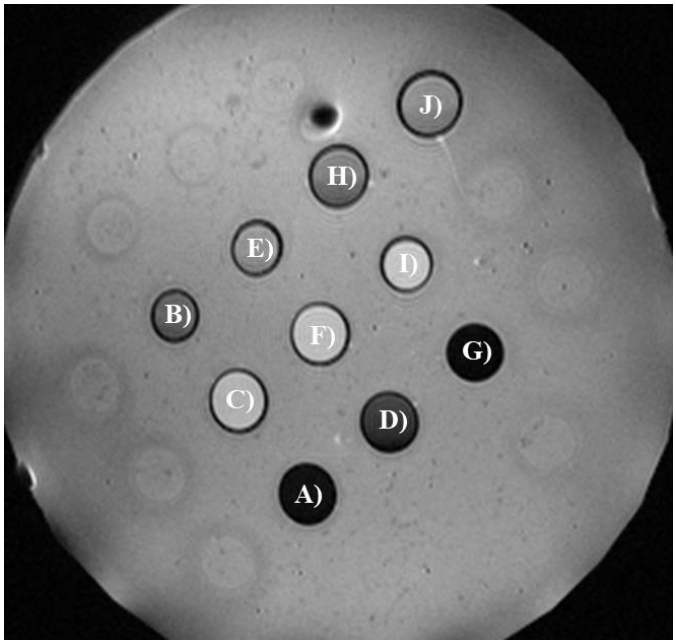


Figura 40. Imagen por resonancia magnética (MRI) de phantoms de agarosa con SPIONS libres A) 0.5 mg/mL, B) 0.25 mg/mL, C) 0.125 mg/mL; NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs D) 0.5 mg/mL, E) 0.25 mg/mL, F) 0.125 mg/mL; NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs G) 0.5 mg/mL, H) 0.25 mg/mL, I) 0.125 mg/mL; Control J).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La concentración de SPIONS encapsulada en las plataformas se determinó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Para ello, se determinó la masa una SPION considerando la densidad de la magnetita (ρ = 5.2 g/cm³) y el volumen de una NP de PLGA determinado mediante el análisis de micrografías TEM. Asumiendo que la SPION adopta una geometría esférica con un radio de 3.8 nm su volumen será de 229.85 nm^3 y con una masa de $1.20x10^{-18}$ g. Considerando que de la masa total de la SPION solo el 72.4% corresponde a Fe, en cada partícula magnética habrá $8.69x10^{-19}$ g de Fe. De esta manera, a partir de los datos experimentales de ICP-MS se estimó una concentración de Fe es de 4.30 mg/L en los núcleos que contienen PRA y 6.68 mg/mL en las que contienen ATOR, dando como resultado concentraciones de SPIONS de $4.95x10^{15}$ y $7.69x10^{15}$ SPIONS/L, respectivamente.

Continuando con la caracterización de los nanosistemas biomiméticos, se procedió a evaluar y comparar los perfiles de liberación del fármaco a partir de las NVs que encapsulan PRA y las plataformas híbridas de estructura corazón@coraza de PLGA biomiméticas. Para ello, se realizaron dos cinéticas de liberación; por un lado, el de las NVs + PRA y por el otro el de las NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs. La

Figura 41, A) muestra que la cinética de liberación de la plataforma híbrida presenta un comportamiento similar al de las NVs simples cargadas, caracterizada por una primera fase de liberación rápida dentro de las primeras 10 h, que alcanza un 50% de liberación del fármaco por el 70% en las NVs. Esta diferencia se debe a una menor difusión de las molécula de fármaco a través de la matriz polimérica más densa. Posteriormente, el proceso de liberación continúa a través de una fase mucho más progresiva hasta alcanzar un plateau alrededor de las 50 h, con un 70 % de la carga liberada tras 72 h (frente a un 90 % de las NVs). Esta diferencia entre los nanosistemas nos ofrece la capacidad de poder escoger entre un sistema de más rápida liberación (NVs + PRA) o uno más controlado y lento (NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs) en función de las necesidades.

Al igual que en el nanosistema de NVs + PRA, se procedió a evaluar el perfil de liberación del fármaco mediante el ajuste matemático de Weibull y compararlos. En este caso, para ambos tipos de NPs se obtuvieron valores de β por debajo de los 0.75, en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concreto, de 0.24 y 0.34 para las NVs y la nanoplataforma híbrida corazón@coraza, respectivamente, indicando así que ambos nanosistemas siguen una difusión Fickiana.

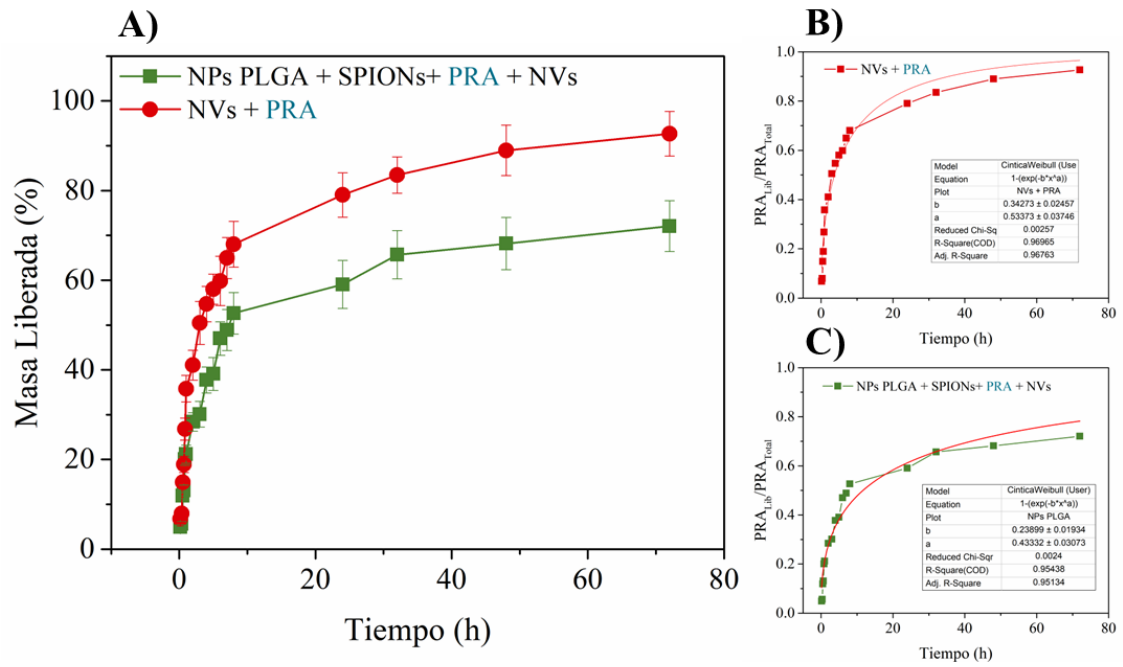


Figura 41. Cinética de liberación de la estatina PRA desde el interior de NVs y NPs corazón@coraza de PLGA + SPIONS recubiertas con membrana celular. A) Perfiles de liberación. B) Ajuste de Weibull del perfil de liberación de NVs + PRA. C) Ajuste de Weibull del perfil de liberación de NPs corazón@coraza de PLGA + SPIONS recubiertas con membrana celular.

De cara a su potencial aplicación como nanosistemas teragnósticos, resulta importante evaluar en primer lugar que ambas nanoplataformas biomiméticas sean biocompatibles. Por este motivo, se realizó un ensayo preliminar de viabilidad celular tras 24 h de incubación en dos líneas celulares modelo, fibroblastos de ratón Balb/c 3t3, que son utilizados en gran medida como modelo de células sanas en el área farmacéutica, y células de cáncer cérvico-uterino humano HeLa, debido a que es una línea celular muy estudiada, por lo cual los resultados obtenidos pueden ser comparados respecto a otros nanosistemas. Además, también se realizó la evaluación en una línea celular endotelial de arteria de ratón, ya que esta se utilizará en ensayos posteriores.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Es necesario comentar, en primer lugar, que diferentes estudios previos han indicado que la concentración necesaria en sangre para que las estatinas generen un efecto terapéutico es de ca. 10 nM (Björkhem-Bergman, Lindh, & Bergman, 2011). Por este motivo, los ensayos de viabilidad celular se realizaron en un rango de concentraciones de 10 nM a 100 nM de estatina encapsulada con el objetivo de evaluar una amplia gama de concentraciones en el rango potencialmente terapéutico. La Figura 42 muestra que para las cinco concentraciones (10 – 100 nM) evaluadas no se observó disminución significativa en la viabilidad celular tras 24 h de exposición de los nanovehículos biomiméticos en ninguna de las tres líneas celulares empleadas, siendo esta siempre superior al 80%, lo que confirma que las nanoplataformas son totalmente biocompatibles. Únicamente a la concentración más elevada de fármaco se observó una muy ligera disminución de la viabilidad celular a niveles por encima del 85%.

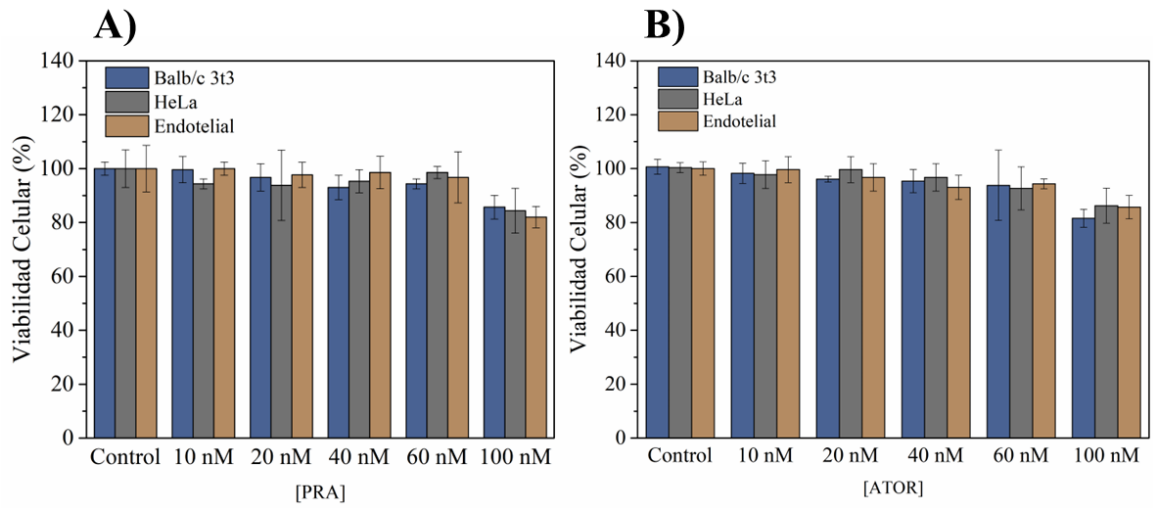


Figura 42. Ensayos de viabilidad celular a 24 h de Exposición. A) NPs PLGA + PRA + SPIONS + NVs. B) NPs PLGA + ATOR + SPIONS + NVs.

Por otra parte, se procedió a analizar la actividad terapéutica de estas plataformas híbridas, que al igual que para las NVs cargadas con PRA, se evaluó su influencia en la capacidad de expulsar colesterol de células espumosas tras la administración de esta estatina y de la ATOR (concentración de 100 nM de fármaco encapsulado), empleando

USC DE COMPOSTELA

como control la administración de la estatina libre. La Figura 43 muestra los resultados obtenidos. Como era de esperar, la administración de la PRA o la ATOR libre generó una liberación considerable de colesterol en comparación al control negativo (células solas), confirmando que cuentan con la capacidad de propiciar la liberación de colesterol desde las células espumosas. Por otro lado, ni las NVs vacías ni las NPs de PLGA vacías presentaron incidencia en la cantidad de colesterol libre, indicando que por sí solas no cuentan con un efecto de liberación de colesterol. En cambio, las nanoplataformas núcleo@coraza biomiméticas mostraron un incremento relevante en la cantidad de colesterol liberado, aunque ligeramente inferior al de las NVs cargadas con PRA probablemente consecuencia de su cinética de liberación más lenta.

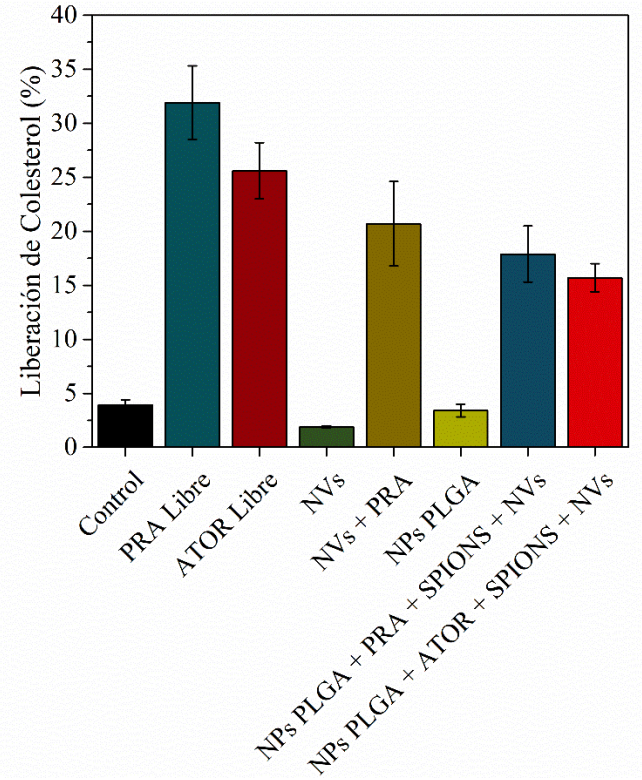


Figura 43. Liberación de colesterol tras 24 h de exposición.

En conclusión, se lograron desarrollar dos sistemas teranósticos basados en NPs de PLGA encapsulando SPIONS y un fármaco de la familia de las estatinas (PRA/ATOR)

como agente bioactivo, todo esto a su vez recubierto con una membrana celular de macrófagos. Ambos sistemas mostraron características propiedades, como dimensiones, morfología, carga superficial y biocompatibilidad que demuestran que los sistemas cuentan con potencial para ser usados como agentes de tratamiento y diagnóstico contra la AEs.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 5

PLATAFORMAS *IN-VITTRO* PARA LA VALIDACIÓN DE LA ACCIÓN TERAPÉUTICA DE NANOPLATAFORMAS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 5

5.1. Plataformas *In-Vitro* Para la Validación de la Acción Terapéutica de Nanoplataformas

En la ciencia y en muchas áreas de la industria como la alimentaria, la cosmética y la farmacéutica se han empleado animales como modelos para comprender cómo se comportarían ciertos compuestos o tecnologías dentro del cuerpo humano tanto para determinar su potencial toxicidad, biodistribución, farmacocinética y farmacodinámica, capacidad de biodegradación, excreción, potencial bioactividad y los mecanismos implicados en esta, entre otras. Sin embargo, los ensayos con animales se enfrentan también a un conjunto de inconvenientes, tanto de carácter técnico como ético. Desde la perspectiva ética, existen importantes preocupaciones sobre salvaguardar del bienestar animal en este tipo de experimentación, así como la propia duda moral de utilizar seres vivos en experimentación. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de la experimentación animal, ya no digamos en cultivos celulares convencionales, muy a menudo no son trasladables/extrapolables a los humanos debido a las diferencias biológicas significativas entre especies, así como la mayor simplicidad tanto en el caso de los experimentos in vitro como *in vivo* (Jalili-Firoozinezhad, Miranda, & Cabral, 2021; Yen Tan et al., 2020). Por consiguiente, esto deriva en evidentes limitaciones científicas, ya que los compuestos bioactivos tratamientos o productos desarrollados basados en los resultados de estudios con animales de mayor o menor complejidad biológica pueden no ser eficaces o, incluso, pueden resultar perjudiciales para los humanos. De igual forma, los ensayos en modelos animales son bastante costosos y pueden llevar mucho tiempo, mientras que alternativas como modelos celulares complejos, simulaciones por computadora, estudios epidemiológicos y modelos órgano-en-un-chip están ganando terreno como métodos más éticos y relevantes para la investigación biomédica con el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

objeto de que puedan sustituir, al menos en parte, la experimentación animal, al menos la de carácter más básico (C. Ma, Peng, Li, & Chen, 2021; Q. Wu et al., 2020).

En este contexto, la microfluídica, específicamente su desarrollo tecnológico y aplicación en los denominados sistema microfisiológico, también llamados órgano-en-un-chip, surge como una posible solución a algunos de estos problemas. Esta tecnología se caracteriza por el desarrollo de órganos o tejidos a una escala reducida dentro de un chip de microfluídica, en el cual se pueden controlar condiciones físicas, biológicas y químicas. El objetivo de estos sistemas es, pues, el de replicar las condiciones fisiológicas del cuerpo humano.

Por ello, en el presente trabajo se inició el desarrollo de un modelo de órgano-en-un-chip que trata de simulas de manera sencilla el endotelio vascular con el objetivo de evaluar los nanosistemas desarrollados en los capítulos anteriores.

5.1.1. Determinación de las Condiciones de Esfuerzos de Cizalla

Para los ensayos de microfluídica se utilizó un dispositivo de la casa comercial Ibidi (Alemania), en concreto el modelo µ-Slide I Luer 3D (Figura 44), el cual consta de un canal principal dividido en tres áreas, en las cuales se coloca una capa de colágeno que actúa como soporte para las células sembrada. Una vez sembradas se espera a la formación de una monocapa celular para la posterior evaluación/validación de los nanosistemas desarrollados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

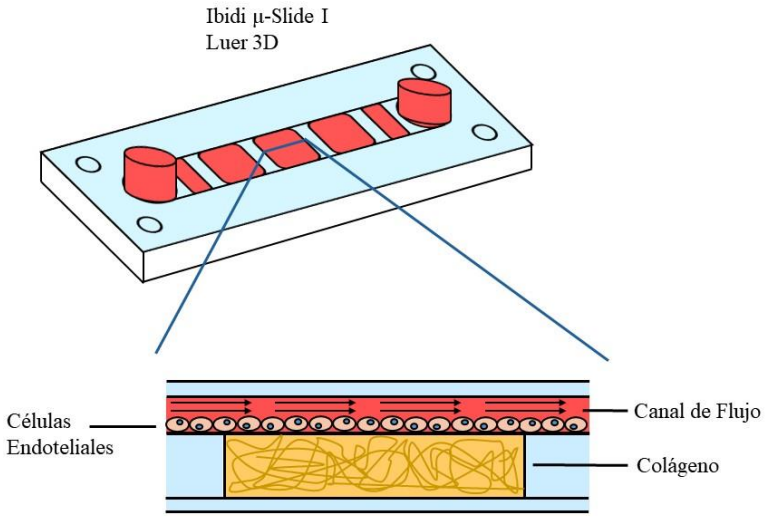


Figura 44. Esquema Representativo del Chip de Microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D.

Previo a la realización de los ensayos empleando los chips de microfluídica es importante determinar en primer lugar las condiciones de esfuerzos/tensiones de cizallas a las que se encontrarán sometidas las células en el microdispositivo, que dependerán del flujo aplicado, de tal manera que estas mimeticen aquellas a las que se encuentran las células endoteliales arteriales por efecto del flujo sanguíneo. El esfuerzo de cizalla se define como el estrés tangencial generado por la fricción del flujo sanguíneo sobre las células del endotelio vascular, y se expresa en unidades de fuerza/unidades de área (N/m^2, Pascal [Pa] o $dinas/cm^2$). Según estudios previos, el esfuerzo/tensión al que se encuentran sometidas las células endoteliales vasculares de un tejido arterial sano en un flujo laminar es de ≈ 1 Pa (10 $dinas/cm^2$) (Chatzizisis et al., 2007)

Para determinar la presión necesaria que hay que aplicar en el microdispositivo para alcanzar tales condiciones se empleó la ecuación (18), la cual relaciona el esfuerzo de cizalla con el flujo y la viscosidad del medio. Sustituyendo los valores de esfuerzo de cizalla de 1 Pa (10 $dinas/cm^2$), viscosidad (0.0072 dinas s/cm^2), y el factor de forma (60.1) dado por la geometría del chip se pudo determinar que el flujo necesario a suministrar al dispositivo es de 23.1 mL/min para obtener esas condiciones de cizalla deseadas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, dado que la ecuación no considera las condiciones experimentales, tales como la adición del colágeno, etc., es necesario realizar una corrección en condiciones similares a las cuales se desarrollarán los experimentos, esto quiere decir, con el chip con colágeno. Dado que la relación entre el flujo y la tensión de cizalla es lineal nos permite predecir el valor de presión necesario para obtener las condiciones de tensión de cizalla deseado en el interior del microdispositivo. Para ello, se realizó una recta de calibrado (Figura 45) que permite relacionar el flujo aplicado (mL/min) con la presión (mbar) de entrada. La pendiente de la recta, que tuvo un valor de 0.63, se empleó como factor de corrección mediante la ecuación (19), con la cual se obtuvo un valor de presión de entrada 37.9 mbar. Este valor de presión obtenido fue el que se empleó para todos los ensayos posteriores.

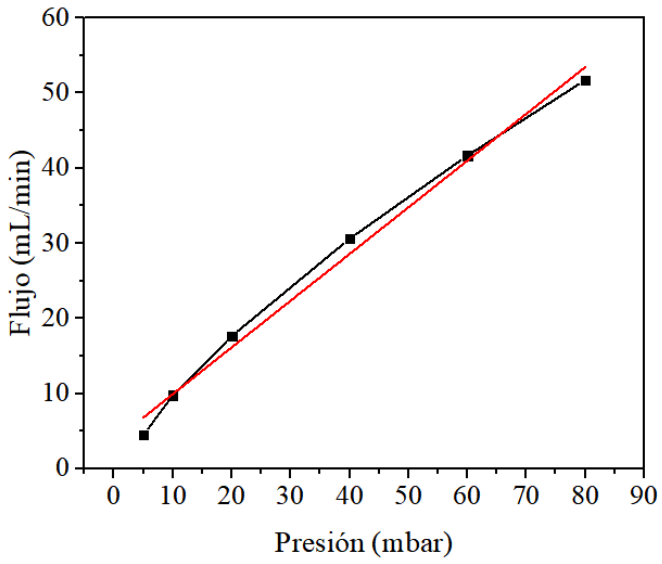


Figura 45. Representación de la presión aplicada (mbar) frente al flujo (mL/ min) en el chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D.

5.1.2. Optimización de la Concentración Inicial Celular

Definidas las condiciones de esfuerzo de cizalla necesarias para la realización de los experimentos se procedió a optimizar la concentración inicial de células introducidas

en el microdispositivo para obtener una monocapa celular en su interior sobre la capa de hidrogel como modelo de endotelio vascular. Para ello, se emplearon células endoteliales de aorta de rata a una concentración inicial de $4x10^5$ células/mL y se realizó un seguimiento de su crecimiento en el dispositivo de microfluídica con el tiempo.

La Figura 46 muestra imágenes de las células sembradas a distintos tiempos de incubación en el interior del microdispositivo, entre 0 y 72 h. Al tiempo cero (Figura 46 A) y F)) se pueden observar células de forma esférica y flotando a lo largo de la superficie. En este punto, las células se dejan sin flujo durante 1 h para permitir su adhesión a la capa de colágeno que recubre la superficie inferior del microchip. Pasada la primera hora, se observa un ligero cambio de morfología celular, pasando de estructuras perfectamente esféricas a estructuras algo más alargadas, lo que indica que las células han comenzado su proceso de adhesión a la superficie del chip. A partir de este punto las células son puestas en condiciones de flujo. En las imágenes siguientes, se puede observar un crecimiento celular y un recubrimiento progresivo de la superficie del microdispositivo hasta alcanzar el recubrimiento total de esta después de 72 h tras haber sembrado las células.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

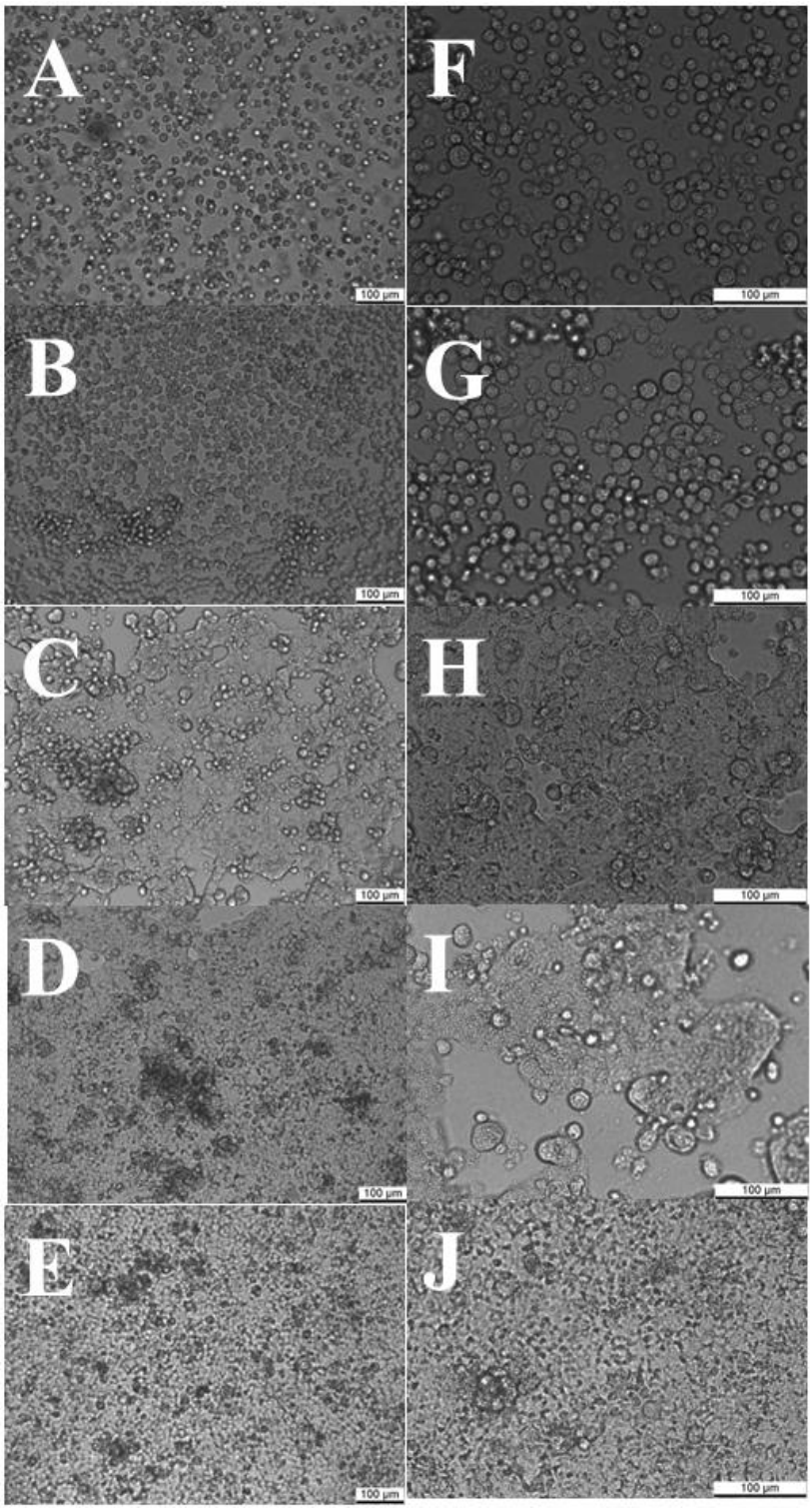


Figura 46. Imágenes de microscopía óptica de células endoteliales de aorta de rata ($4x10^5$ células/mL) sembradas en el seno del chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. Células recién sembradas, A) 10X y F) 20X; después de 1 h, B) 10X y G) 20X; después de 24 h, C) 10X y H) 20X; después de 48 h D) 10X y I) 20X; y después de 72 h E) 10X y J) 20X de incubación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque fue posible lograr el objetivo deseado de conseguir la monocapa celular, resulta poco práctico tener que esperar 72 h para poder realizar ensayos posteriores en el dispositivo. Por este motivo, se procedió a aumentar la concentración celular inicial inyectada en el chip a $8x10^5$ células/mL con el propósito de obtener la monocapa celular en un menor tiempo. En la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos. Así, se puede observar que a esta concentración celular inicial inyectada en el microdispositivo es posible obtener la monocapa celular tras 24 h de incubación, un tiempo mucho más reducido que permite la realización de un mayor número de experimentos. Por este motivo, para ensayos posteriores se emplearon estas condiciones iniciales.

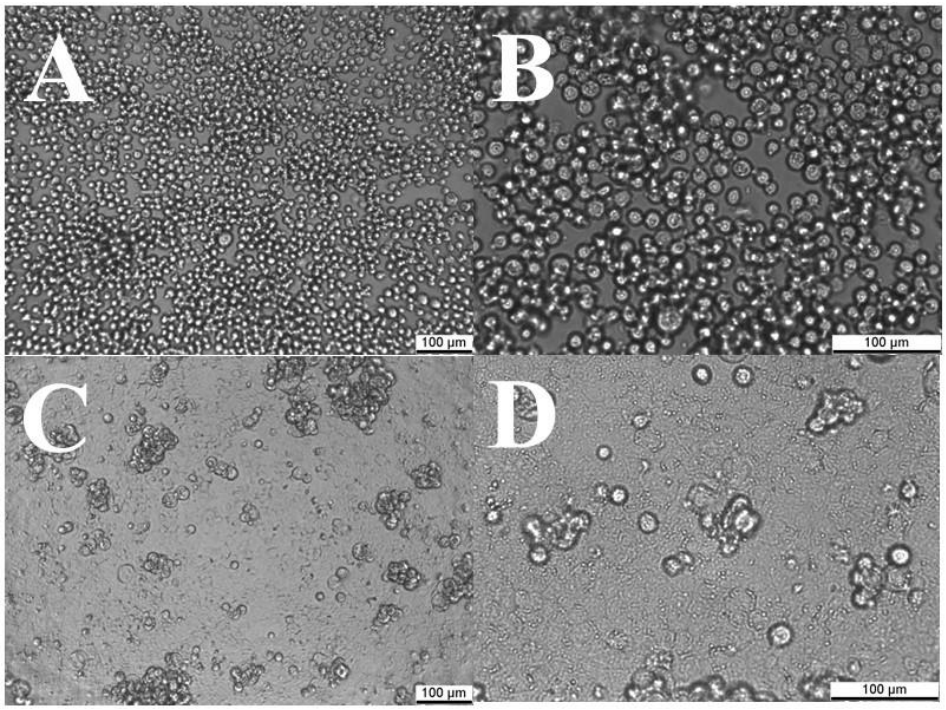


Figura 47. Imágenes de células endoteliales (8x105 células/mL) sembradas en el chip de microfluídica Ibidi µ-Slide I Luer 3D. Células recién sembradas, A) 10X y B) 20X; y tras 24 h de incubación, C) 10X y D) 20X.

Una vez estandarizados y optimizados las condiciones de crecimiento de las células dentro de los chips de microfluídica se procedió a evaluar el efecto antiinflamatorio de los dos tipos de nanoplataforma, esto es, NVs y nanoplataformas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

híbridas corazón@coraza biomiméticas que encapsulan una estatina, en condiciones hemodinámicas. Para ello, se realizaron ensayos para analizar la actividad terapéutica de las nanoformulaciones en la inhibición de la expresión de los receptores VCAM-1, que sobreexpresan en el tejido vascular aórtico inflamado.

El factor de adhesión vascular 1 o VCAM-1 (CD106), por sus siglas en inglés, es una glicoproteína de 110 kDa que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas de moléculas de adhesión celular o CAM, por sus siglas en inglés. Estas moléculas juegan un papel importante en la mediación de la adhesión y del flujo a través del endotelio vascular de células del sistema inmune como los leucocitos y macrófagos en proceso inflamatorios agudos o crónicos (Distasio et al., 2021; Singh, Kaur, Kumari, Pasricha, & Singh, 2023). Una vez sobreexpresados los receptores VCAM-1 en el endotelio vascular, estos permiten la unión de ligandos presentes en las células inmunes, como la integrina α4β1, α4β7, αdβ2, galectina-3 y la osteonectina (Lou et al., 2021). En el caso particular de la AEs, los receptores VCAM-1 son las moléculas de adhesión presentes en mayor medida, alrededor del 82% (Pickett, Wu, Zacchi, & Ta, 2023) y juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad, en comparación a los ICAM-1 o a la E-selectina (Thayse, Kindt, Laurent, & Carlier, 2020). ICAM-1 es una proteína en la superficie celular clave para la adhesión de leucocitos al endotelio vascular durante la inflamación. Interactúa con integrinas en leucocitos, facilitando su migración hacia tejidos inflamados. Implicada en enfermedades autoinmunes e infecciones virales, su expresión es inducida por citoquinas proinflamatorias (Bui, Wiesolek, & Sumagin, 2020). Por otro lado, la E-selectina es una molécula de adhesión celular que pertenece a la familia de las selectinas. Su nombre proviene del hecho de que se encuentra expresada en células endoteliales activadas y también puede ser inducida en células endoteliales y plaquetas por citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina 1 (IL-1). La función principal de la E-selectina es mediar la adhesión de leucocitos, particularmente de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y monocitos, a las células endoteliales activadas durante la inflamación (Ales & Sackstein, 2023).

Por otro lado, la sobreexpresión de las VCAM-1 se ha relacionado con la presencia de citocinas proinflamatorias como el TNF-α, la IL-6, o IL-1β colesterol, lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), niveles altos de glucosa, estrés oxidativo, o esfuerzos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cizalla elevados debidos al flujo sanguíneo, todos ellos factores subyacentes para la aterogénesis y desarrollo de la enfermedad (Vekic et al., 2022). Por este motivo, los receptores VCAM-1 resultan ser un buen objetivo molecular para el tratamiento y diagnóstico de esta enfermedad.

Con esto en mente, se procedió a la evaluación de la expresión de VCAM-1 en el microdispositivo microfisiológico desarrollado con células endoteliales arteriales inflamadas. Para ello, las células sembradas en el chip de microfluídica se expusieron a lipolisacaridos bacterianos (LPS) a una concentración de 100 ng/mL, para generar inflamación en esta monocapa de endotelio celular y, en consecuencia, conseguir una sobrexpresión de los receptores VCAM-1. Posteriormente, las células fueron fijadas y sus núcleos teñidos con DAPI y los receptores VCAM-1 con anticuerpos anti-CD106-PE (anti-VCAM).

La Figura 48 y Figura 49 muestran las imágenes de inmunotinción obtenidas mediante microscopía confocal a resoluciones de 20X y 93X y el análisis de MFI. En ellas, se observa la densa monocapa celular formada, los núcleos celulares en color azul, y en tono verde los receptores VCAM-1. De manera visual y cualitativa, se puede observar que las células sanas (Figura 48, A) y B)) mostraron una baja intensidad de fluorescencia, como era por otra parte de esperar, debido a que las células por sí solas cuentan con los receptores VCAM-1. Sin embargo, al ser estas expuestas a un agente inflamatorio (Figura 48, C) y D)) se observa un incremento en la fluorescencia directamente relacionado con el aumento de los receptores VCAM-1 expresados en su superficie (Ismawati, Romus, Mukhyarjon, & Muthya, 2022). Con estos resultados se comprueba que el arreglo experimental de microfluídica desarrollado puede funcionar como modelo de endotelio vascular inflamado.

Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad terapéutica de los nanosistemas desarrollados. Así, como control negativo se observó que las NVs vacías (Figura 48, E) y F)) obtenidas a partir de la membrana celular de macrófagos no presentan *per se* un efecto antiinflamatorio. A continuación, se evaluaron los dos fármacos utilizados, PRA y ATOR (Figura 48, I), J) y K), L) respectivamente) a una concentración de 100 nM administrados de forma libre. En este caso, en ambos casos se observó una importante disminución de la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos que se unen

USC DE COMPOSTELA

a los receptores VCAM-1 atribuido a una disminución de la actividad/respuesta inflamatoria consecuencia de la actividad antiinflamatoria del fármaco (Kadoglou et al., 2022), y como también se puede apreciar en el caso de las NVs + PRA (Figura 48, G) y H)). Comparando la intensidad de fluorescencia media de las imágenes obtenidas para cada fármaco, se observó una menor intensidad en las células expuestas a la PRA (100 nM), que puede ser atribuido a su naturaleza hidrofílica lo que puede provocar que se distribuya de mejor manera a través de la células, traduciéndose en un mayor efecto terapéutico (Shaker, Elbadawy, Al Thagfan, & Shaker, 2021).

Por último, para las dos nanoplataformas biomiméticas corazón@coraza sistemas más complejos (NPs de PLGA + PRA/ATOR + SPIONS + NVs), y al igual que se observa para los fármacos libres y la PRA encapsulada en las NVs, se observó un claro efecto antiinflamatorio, confirmando que aun estando el fármaco dentro de las NPs y siendo liberado de manera mucho más progresiva este es capaz de llevar a cabo su efecto terapéutico en la escala de tiempo del experimento. Comparando los resultados entre estos dos últimos nanosistemas, se logra observar que la intensidad de fluorescencia media es ligeramente superior en el nanosistema que cuenta con la PRA, lo que concuerda con los resultados observados en la evaluación de los fármacos libres. No obstante, se observó que la intensidad de fluorescencia fue mayor en el caso de los fármacos libres o las NVs cargadas, ya que el nanosistema corazón@coraza cuenta con un mecanismo de liberación contralado debido a que el fármaco se va liberando conforme las NPs se van degradando, por lo que la liberación del fármaco es más lenta en comparación con las NVs, como se observó de las cinéticas de liberación, permitiendo una actividad terapéutica mucho más sostenida en el tiempo, lo cual será analizado en futuros trabajos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

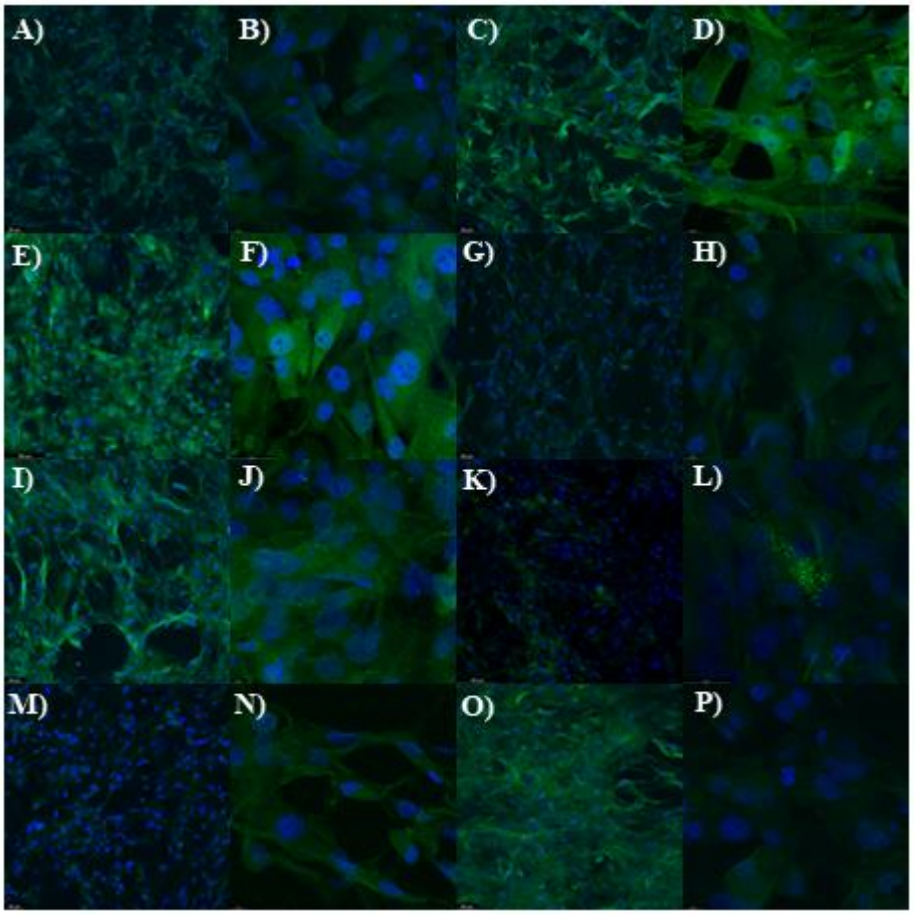


Figura 48. Imágenes de microscopía confocal de: Células endoteliales sanas, A) 20X, B) 93X; células inflamadas con LPS en ausencia de NVs, C) 20X, D) 93X; en presencia de NVs vacías, E) 20X, F) 93X; células con PRA libre (100 nM), G) 20X, H) 93X; células con ATOR libre (100 nM), I) 20X, J) 93X; células con NVs + PRA (100 nM), K) 20X, L) 93X; células con NPs PLGA + SPIONS + PRA + NVs, M) 20X, N) 93X; células con NPs PLGA + SPIONS + ATOR + NVs, O) 20x, P)93X.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

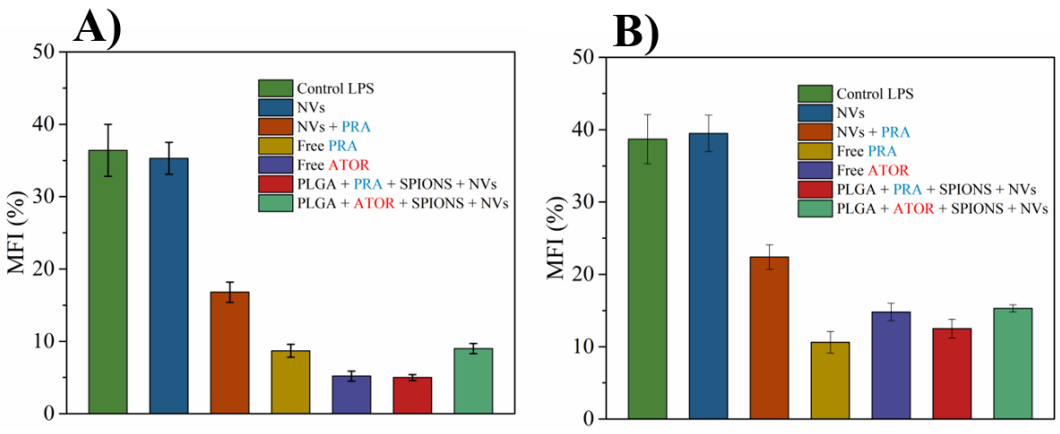


Figura 49. Intensidad de fluorescencia media de las Imágenes de confocal. A) 20X, B) 93X.

En resumen, se puede concluir que se lograron desarrollar dos sistemas teragnósticos basados en NPs de PLGA + PRA/ATOR + SPIONS + NVs biocompatibles y con la capacidad de mantener de las propiedades de cada uno de los componentes que los constituyen, o sea, el mecanismo de liberación controlado que ofrece la matriz polimérica de PLGA, la propiedad superparamagnética que pueden actuar como método de diagnóstico mediante MRI ofrecido por las SPIONS, la actividad antiinflamatoria y de disminución de los niveles de colesterol en sangre por parte de las estatinas y por último, el direccionamiento activo y biocompatibilidad atribuida al recubrimiento con la membrana celular. Por todo esto, se puede comentar que ambos sistemas cuentan con potencial para ser empleados como sistemas teragnósticos contra la AEs.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

The experimental research conducted in this doctoral thesis has demonstrated the potential of cell membrane-derived nanosystems, in the form of NVs and biomimetic coating of NPs, in the treatment and diagnosis of atherosclerosis. The processes of their production and optimization, along with the characterization of these nanosystems and the biological assays performed on their potential application, have resulted in the following conclusions, organized according to the different chapters of this thesis.

Thus, a methodology was developed and standardized to obtain NVs from the membranes of murine macrophages RAW 264.7 through a relatively simple process with potential scalability. These NVs were able to encapsulate a hydrophilic drug from the statin family, specifically PRA. The physicochemical characterization using a wide range of experimental techniques and the *in vitro* biological evaluation demonstrated that this nanosystem exhibits suitable characteristics and properties in terms of size, morphology, surface charge, colloidal stability, encapsulation efficiency, biocompatibility, and cellular internalization, suggesting its possible application as a controlled drug delivery system with active targeting to combat atherosclerosis. This was corroborated by analyzing its therapeutic capacity, demonstrating its ability to reduce oxidative stress levels and pro-inflammatory cytokines in cell cultures.

On the other hand, two theragnostic nanosystems were developed, consisting of nanocores based on PLGA polymer NPs, which allow the co-encapsulation of the statin drug PRA/ATOR and SPIONS as contrast agents, and a coating formed from the cell membrane extracted from RAW264.7 macrophages. These biomimetic nanosystems were shown to be biocompatible and capable of maintaining the properties of each of their components, that is, providing a controlled release mechanism of the bioactive load provided by the PLGA polymer matrix, the superparamagnetic properties of the SPIONS that allow their activity as a contrast agent for magnetic resonance imaging, the anti-inflammatory activity and reduction of cholesterol accumulation in foam cells of the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

statins, and the active targeting and biocompatibility attributed to the cell membrane coating.

Additionally, using a dynamic cellular model employing a microfluidic device that simulates the hemodynamic conditions to which arterial endothelial cells are subjected, the therapeutic effectiveness of each nanosystem was corroborated, causing a decrease in the overexpression of pro-inflammatory receptors in arterial endothelial cells. Therefore, both nanosystems show great potential to be used as theragnostic agents against atherosclerosis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

REFERENCIAS

Abdelkader, D. H., Abosalha, A. K., Khattab, M. A., Aldosari, B. N., & Almurshedi, A. S. (2021). A novel sustained anti-inflammatory effect of atorvastatin— calcium plga nanoparticles: In vitro optimization and in vivo evaluation. Pharmaceutics, 13(10). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101658

Adepu, S., Ramakrishna, S., Costa-Pinto, R., & Oliveira, A. L. (2021a). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. Molecules 2021, Vol. 26, Page 5905, 26(19), 5905. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195905

Adepu, S., Ramakrishna, S., Costa-Pinto, R., & Oliveira, A. L. (2021b). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. Molecules 2021, Vol. 26, Page 5905, 26(19), 5905. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195905

Agrahari, V., Agrahari, V., Burnouf, P. A., Chew, C. H., & Burnouf, T. (2019). Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers. Trends in Biotechnology, 37(7), 707–729. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.012

Ahamed, M. K., Wang, H., & Hazell, P. J. (2022). From biology to biomimicry: Using nature to build better structures – A review. Construction and Building Materials, 320(January), 126195. https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.126195

Ahmad, Z., Shah, A., Siddiq, M., & Kraatz, H. B. (2014). Polymeric micelles as drug delivery vehicles. RSC Advances, 4(33), 17028–17038. https://doi.org/10.1039/C3RA47370H

Ai, X., Wang, S., Duan, Y., Zhang, Q., Chen, M. S., Gao, W., & Zhang, L. (2021). Emerging Approaches to Functionalizing Cell Membrane-Coated Nanoparticles. Biochemistry, 60(13), 941–955. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00343

Ales, E., & Sackstein, R. (2023). The biology of E-selectin ligands in leukemogenesis. Advances in Cancer Research, 157, 229–250. https://doi.org/10.1016/BS.ACR.2022.07.001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Almada, M., Leal-Martínez, B. H., Hassan, N., Kogan, M. J., Burboa, M. G., Topete, A., … Juárez, J. (2017). Photothermal conversion efficiency and cytotoxic effect of gold nanorods stabilized with chitosan, alginate and poly(vinyl alcohol). Materials Science and Engineering C, 77, 583–593. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.218

Almeida, S. O., & Budoff, M. (2019). Effect of statins on atherosclerotic plaque. Trends in Cardiovascular Medicine, 29(8), 451–455. https://doi.org/10.1016/J.TCM.2019.01.001

Alonso, J., Khurshid, H., Devkota, J., Nemati, Z., Khadka, N. K., Srikanth, H., … Phan, M. H. (2016). Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in lipid vesicles for advanced magnetic hyperthermia and biodetection. Journal of Applied Physics, 119(8), 83904. https://doi.org/10.1063/1.4942618/15174765/083904_1_ACCEPTED_MANUSCRIPT.PDF

Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., … Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. Antioxidants, 10(5), 1–28. https://doi.org/10.3390/antiox10050642

Aryal, S., Hu, C. M. J., Fang, R. H., Dehaini, D., Carpenter, C., Zhang, D. E., & Zhang, L. (2013). Erythrocyte Membrane-Cloaked Polymeric Nanoparticles for Controlled Drug Loading and Release. Nanomedicine, 8(8), 1271–1280. https://doi.org/10.2217/NNM.12.153

Atanase, L. I. (2021). Micellar Drug Delivery Systems Based on Natural Biopolymers. Polymers 2021, Vol. 13, Page 477, 13(3), 477. https://doi.org/10.3390/POLYM13030477

Banquy, X., Suarez, F., Argaw, A., Rabanel, J. M., Grutter, P., Bouchard, J. F., … Giasson, S. (2009). Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake. Soft Matter, 5(20), 3984–3991. https://doi.org/10.1039/B821583A

Barrett, T. J. (2020). Macrophages in Atherosclerosis Regression. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 40(1), 20–33. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312802

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Beach, M. A., Nayanathara, U., Gao, Y., Zhang, C., Xiong, Y., Wang, Y., & Such, G. K. (2024).

Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. Chemical Reviews, 124(9), 5505–5616. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00705

Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. Nanomaterials, 10(7), 1–41. https://doi.org/10.3390/nano10071403

Beh, C. Y., Prajnamitra, R. P., Chen, L. L., & Hsieh, P. C. H. (2021). Advances in biomimetic nanoparticles for targeted cancer therapy and diagnosis. Molecules, 26(16). https://doi.org/10.3390/molecules26165052

Bergheanu, S. C., Bodde, M. C., & Jukema, J. W. (2017). Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. Netherlands Heart Journal, 25(4), 231–242. https://doi.org/10.1007/s12471-017-0959-2

Bharti, C., Gulati, N., Nagaich, U., & Pal, A. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 5(3), 124. https://doi.org/10.4103/2230-973X.160844/

Björkhem-Bergman, L., Lindh, J. D., & Bergman, P. (2011). What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? British Journal of Clinical Pharmacology, 72(1), 164–165. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03907.x

Borén, J., John Chapman, M., Krauss, R. M., Packard, C. J., Bentzon, J. F., Binder, C. J., … Ginsberg, H. N. (2020). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. European Heart Journal, 41(24), 2313–2330. https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHZ962

Boulaftali, Y., Hess, P. R., Kahn, M. L., & Bergmeier, W. (2014). Platelet Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) signaling and vascular integrity. Circulation Research, 114(7), 1174–1184. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301611

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Breznica, P., Koliqi, R., & Daka, A. (2020). A review of the current understanding of nanoparticles protein corona composition. Medicine and Pharmacy Reports, 93(4), 342. https://doi.org/10.15386/MPR-1756

Bui, T. M., Wiesolek, H. L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. Journal of Leukocyte Biology, 108(3), 787–799. https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R

Bunzen, H. (2021). Chemical Stability of Metal-organic Frameworks for Applications in Drug Delivery. ChemNanoMat, 7(9), 998–1007. https://doi.org/10.1002/cnma.202100226

Cao, H., Dan, Z., He, X., Zhang, Z., Yu, H., Yin, Q., & Li, Y. (2016). Liposomes Coated with Isolated Macrophage Membrane Can Target Lung Metastasis of Breast Cancer. ACS Nano, 10(8), 7738–7748. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.6B03148

Cardoso, M. B., Da Cruz Schneid, A., Silveira, C. P., Galdino, F. E., Ferreira, L. F., & Bouchmella, K. (2020). Colloidal stability and redispersibility of mesoporous silica nanoparticles in biological media. Langmuir, 36(39), 11442–11449. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01571

Castro, K. C. de, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2022). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 71(1), 1–13. https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436

Cerda, A., Hirata, M. H., & Hirata, R. D. C. (2012). Molecular mechanisms underlying statin effects on genes involved in the reverse cholesterol transport. Drug Metabolism and Drug Interactions, 27(2), 101–111. https://doi.org/10.1515/DMDI-2012-0007/MACHINEREADABLECITATION/RIS

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary

Atherosclerosis and Vascular Remodeling. Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. Journal of the American College of Cardiology, 49(25), 2379–2393. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059

Chen, B., Zhang, Z., Kim, S., Baek, M., Kim, D., & Yong, K. (2019). A biomimetic nanoleaf electrocatalyst for robust oxygen evolution reaction. Applied Catalysis B: Environmental, 259(July), 118017. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118017

Chen, H. Y., Deng, J., Wang, Y., Wu, C. Q., Li, X., & Dai, H. W. (2020). Hybrid cell membrane-coated nanoparticles: A multifunctional biomimetic platform for cancer diagnosis and therapy. Acta Biomaterialia, 112, 1–13. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.05.028

Chen, J., Zhang, X., Millican, R., Sherwood, J., Martin, S., Jo, H., … Jun, H. W. (2021). Recent advances in nanomaterials for therapy and diagnosis for atherosclerosis. Advanced Drug Delivery Reviews, 170, 142–199. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.005

Chen, L., Hong, W., Ren, W., Xu, T., Qian, Z., & He, Z. (2021). Recent progress in targeted delivery vectors based on biomimetic nanoparticles. Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1). https://doi.org/10.1038/s41392-021-00631-2

Chen, P. Y., Qin, L., Li, G., Wang, Z., Dahlman, J. E., Malagon-Lopez, J., … Simons, M. (2019). Endothelial TGF-β signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis. Nature Metabolism, 1(9), 912–926. https://doi.org/10.1038/S42255-019-0102-3

Choi, B., Park, W., Park, S. Bin, Rhim, W. K., & Han, D. K. (2020). Recent trends in cell membrane-cloaked nanoparticles for therapeutic applications. Methods, 177(December 2019), 2–14. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.12.004

Ciccarese, F., Raimondi, V., Sharova, E., Silic-Benussi, M., & Ciminale, V. (2020). Nanoparticles as tools to target redox homeostasis in cancer cells. Antioxidants, 9(3), 1–11. https://doi.org/10.3390/antiox9030211

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., … Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. Pharmaceutics, 10(2), 1–17. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de Oliveira Gonçalves, K., Vieira, D. P., & Courrol, L. C. (2018). Synthesis and characterization of aminolevulinic acid gold nanoparticles: Photo and sonosensitizer agent for atherosclerosis. Journal of Luminescence, 197, 317–323. https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2018.01.057

Dingjan, T., & Futerman, A. H. (2021). The fine-tuning of cell membrane lipid bilayers accentuates their compositional complexity. BioEssays, 43(5), 1–15. https://doi.org/10.1002/bies.202100021

Distasio, N., Salmon, H., Dierick, F., Ebrahimian, T., Tabrizian, M., & Lehoux, S. (2021). VCAM-1-Targeted Gene Delivery Nanoparticles Localize to Inflamed Endothelial Cells and Atherosclerotic Plaques. Advanced Therapeutics, 4(2), 1–11. https://doi.org/10.1002/adtp.202000196

Dolai, J., Mandal, K., & Jana, N. R. (2021). Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. ACS Applied Nano Materials, 4(7), 6471–6496. https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00987

Dong, P., Zhang, T., Xiang, H., Xu, X., Lv, Y., Wang, Y., & Lu, C. (2021). Controllable synthesis of exceptionally small-sized superparamagnetic magnetite nanoparticles for ultrasensitive MR imaging and angiography. Journal of Materials Chemistry B, 9(4), 958–968. https://doi.org/10.1039/D0TB02337J

Dong, X., Gao, J., Zhang, C. Y., Hayworth, C., Frank, M., & Wang, Z. (2019). Neutrophil Membrane-Derived Nanovesicles Alleviate Inflammation to Protect Mouse Brain Injury from Ischemic Stroke. ACS Nano, 13(2), 1272–1283. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.8B06572/SUPPL_FILE/NN8B06572_SI_011.AVI

Duivenvoorden, R., Tang, J., Cormode, D. P., Mieszawska, A. J., Izquierdo-Garcia, D., Ozcan, C., … Mulder, W. J. M. (2014). A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. Nature Communications, 5. https://doi.org/10.1038/NCOMMS4065

El-Say, K. M., & El-Sawy, H. S. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 528(1–2), 675–691. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.06.052

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Elahi, N., & Rizwan, M. (2021). Progress and prospects of magnetic iron oxide nanoparticles in biomedical applications: A review. Artificial Organs, 45(11), 1272–1299. https://doi.org/10.1111/AOR.14027

Elmowafy, M., Shalaby, K., Elkomy, M. H., Alsaidan, O. A., Gomaa, H. A. M., Abdelgawad, M. A., & Mostafa, E. M. (2023). Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges. Polymers 2023, Vol. 15, Page 1123, 15(5), 1123. https://doi.org/10.3390/POLYM15051123

Elsayed, S. I., Girgis, G. N. S., & El-Dahan, M. S. (2023). Formulation and Evaluation of Pravastatin Sodium-Loaded PLGA Nanoparticles: In vitro–in vivo Studies Assessment. International Journal of Nanomedicine, 18, 721–742. https://doi.org/10.2147/IJN.S394701

Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. Clínica e Investigación En Arteriosclerosis, 25(2), 98–103. https://doi.org/10.1016/J.ARTERI.2013.05.003

Eshghjoo, S., Kim, D. M., Jayaraman, A., Sun, Y., & Alaniz, R. C. (2022). Macrophage Polarization in Atherosclerosis. Genes, 13(5), 1–10. https://doi.org/10.3390/genes13050756

Fam, S. Y., Chee, C. F., Yong, C. Y., Ho, K. L., Mariatulqabtiah, A. R., & Tan, W. S. (2020). Stealth Coating of Nanoparticles in Drug-Delivery Systems. Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 787, 10(4), 787. https://doi.org/10.3390/NANO10040787

Fan, J., Cheng, Y., & Sun, M. (2020). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. The Chemical Record, 20(12), 1474–1504. https://doi.org/10.1002/TCR.202000087

Farinha, P., Coelho, J. M. P., Reis, C. P., & Gaspar, M. M. (2021). A comprehensive updated review on magnetic nanoparticles in diagnostics. Nanomaterials, 11(12), 3432. https://doi.org/10.3390/NANO11123432/S1

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Feijoó, I., Cabeza, M., Merino, P., Pena, G., Pérez, M. C., Cruz, S., & Rey, P. (2017). Evaluación del tamaño de cristalito y la micro-deformación durante el proceso de

molienda mecánica del material compuesto AA6005A+ 10 % nano-TiC. Materiales Compuestos, 2(1), 117–121.

Ferri, N., & Corsini, A. (2020). Clinical Pharmacology of Statins: an Update. Current Atherosclerosis Reports, 22(7). https://doi.org/10.1007/s11883-020-00844-w

Frallicciardi, J., Melcr, J., Siginou, P., Marrink, S. J., & Poolman, B. (2022). Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. Nature Communications, 13(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29272-x

Fredman, G., Hellmann, J., Proto, J. D., Kuriakose, G., Colas, R. A., Dorweiler, B., … Tabas, I. (2016). An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. Nature Communications, 7. https://doi.org/10.1038/NCOMMS12859

Frias, J. C., Williams, K. J., Fisher, E. A., & Fayad, Z. A. (2004). Recombinant HDL-like nanoparticles: a specific contrast agent for MRI of atherosclerotic plaques. Journal of the American Chemical Society, 126(50), 16316–16317. https://doi.org/10.1021/JA044911A

Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. Frontiers in Pharmacology, 12, 601626. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.601626/BIBTEX

Ganapathe, L. S., Mohamed, M. A., Yunus, R. M., & Berhanuddin, D. D. (2020). Magnetite (Fe3O4) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. Magnetochemistry 2020, Vol. 6, Page 68, 6(4), 68. https://doi.org/10.3390/MAGNETOCHEMISTRY6040068

Gao, C., Huang, Q., Liu, C., Kwong, C. H. T., Yue, L., Wan, J. B., … Wang, R. (2020a). Treatment of atherosclerosis by macrophage-biomimetic nanoparticles via targeted pharmacotherapy and sequestration of proinflammatory cytokines. Nature Communications 2020 11:1, 11(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16439-7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gao, C., Huang, Q., Liu, C., Kwong, C. H. T., Yue, L., Wan, J. B., … Wang, R. (2020b). Treatment of atherosclerosis by macrophage-biomimetic nanoparticles via targeted pharmacotherapy and sequestration of proinflammatory cytokines. Nature Communications 2020 11:1, 11(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16439-7

Gao, W., & Zhang, L. (2015). Engineering red-blood-cell-membrane-coated nanoparticles for broad biomedical applications. AIChE Journal, 61(3), 738–746. https://doi.org/10.1002/aic.14735

Genito, C. J., Batty, C. J., Bachelder, E. M., & Ainslie, K. M. (2021). Considerations for Size, Surface Charge, Polymer Degradation, Co-Delivery, and Manufacturability in the Development of Polymeric Particle Vaccines for Infectious Diseases. Advanced NanoBiomed Research, 1(3). https://doi.org/10.1002/anbr.202000041

Ghitman, J., Biru, E. I., Stan, R., & Iovu, H. (2020). Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. Materials and Design, 193, 108805. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108805

Gong, C., Yu, X., You, B., Wu, Y., Wang, R., Han, L., … Yuan, Y. (2020). Macrophage-cancer hybrid membrane-coated nanoparticles for targeting lung metastasis in breast cancer therapy. Journal of Nanobiotechnology, 18(1), 92. https://doi.org/10.1186/S12951-020-00649-8

Green, C., Jost, G., Frenzel, T., Boyken, J., Schwenke, C., & Pietsch, H. (2022). The Effect of Gadolinium-Based Contrast Agents on Longitudinal Changes of Magnetic Resonance Imaging Signal Intensities and Relaxation Times in the Aging Rat Brain. Investigative Radiology, 57(7). Retrieved from https://journals.lww.com/investigativeradiology/fulltext/2022/07000/the_effect_of_gadolinium_based_contrast_agents_on.4.aspx

Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. International Journal of Pharmaceutics, 601, 120571. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., … Reshi, M. S.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

(2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. Cells, 11(3). https://doi.org/10.3390/cells11030552

Hamblin, M. R. (2021). Carbon Nanotubes : Smart Drug / Gene Delivery Carriers. 1681–1706.

Han, H., Bártolo, R., Li, J., Shahbazi, M. A., & Santos, H. A. (2022). Biomimetic platelet membrane-coated nanoparticles for targeted therapy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 172(January), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.01.004

Han, Y., Gao, C., Wang, H., Sun, J., Liang, M., Feng, Y., … Sun, B. (2021). Macrophage membrane-coated nanocarriers Co-Modified by RVG29 and TPP improve brain neuronal mitochondria-targeting and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease mice. Bioactive Materials, 6(2), 529–542. https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2020.08.017

Hao, X., Zhang, H., Liu, R., Che, J., Zhang, D., Liang, J., & Sun, L. (2022). Red blood cell membrane functionalized biomimetic nanoparticles for systemic lupus erythematosus treatment. Materials Today Advances, 16, 100294. https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100294

Hapsari, F. N., Purwaningsih, R., Azzahra, F., & Sari, D. P. (2022). Velcro Product Design with Biomimicry Approaches. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1111(1). https://doi.org/10.1088/1755-1315/1111/1/012057

Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. Cancer Cell, 38(2), 167–197. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001

He, Z., Zhang, Y., & Feng, N. (2020a). Cell membrane-coated nanosized active targeted drug delivery systems homing to tumor cells: A review. Materials Science and Engineering C, 106(October 2019), 110298. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110298

He, Z., Zhang, Y., & Feng, N. (2020b). Cell membrane-coated nanosized active targeted drug delivery systems homing to tumor cells: A review. Materials Science and Engineering: C, 106, 110298. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110298

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Himel, M. H., Sikder, B., Ahmed, T., & Choudhury, S. M. (2022). Biomimicry in nanotechnology: a comprehensive review. Nanoscale Advances, 5(3), 596–614. https://doi.org/10.1039/d2na00571a

Horie, M., & Tabei, Y. (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. Free Radical Research, 55(4), 331–342. https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108

Hou, L., Shan, X., Hao, L., Feng, Q., & Zhang, Z. (2017). Copper sulfide nanoparticle-based localized drug delivery system as an effective cancer synergistic treatment and theranostic platform. Acta Biomaterialia, 54, 307–320. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.03.005

Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nature Reviews Materials, 6(12), 1078–1094. https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0

Hu, C. M. J., Fang, R. H., Wang, K. C., Luk, B. T., Thamphiwatana, S., Dehaini, D., … Zhang, L. (2015). Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. Nature, 526(7571), 118–121. https://doi.org/10.1038/nature15373

Huang, D., Cai, | Lijun, Li, N., & Zhao, Y. (2023). Ultrasound-trigged micro/nanorobots for biomedical applications. Smart Medicine, 2(2), e20230003. https://doi.org/10.1002/SMMD.20230003

Huang, H., Feng, W., Chen, Y., & Shi, J. (2020). Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations. Nano Today, 35, 100972. https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2020.100972

Huang, X., He, D., Pan, Z., Luo, G., & Deng, J. (2021). Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation. Materials Today Bio, 11(June). https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100124

Huang, Xiaohua, & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. Journal of Advanced Research, 1(1), 13–28. https://doi.org/10.1016/J.JARE.2010.02.002

Ibarra, J., Melendres, J., Almada, M., Burboa, M. G., Taboada, P., Juárez, J., & Valdez, M.

USC UNIVERSIDADE

A. (2015). Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. Materials Research Express, 2(9). https://doi.org/10.1088/2053-1591/2/9/095010

Ismawati, I., Romus, I., Mukhyarjon, M., & Muthya, A. (2022). Effect of Proteasome Inhibitor on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Expressions in Rat Model of Atherosclerosis. Reports of Biochemistry & Molecular Biology, 10(4), 633. https://doi.org/10.52547/RBMB.10.4.633

Jalili-Firoozinezhad, S., Miranda, C. C., & Cabral, J. M. S. (2021). Modeling the Human Body on Microfluidic Chips. Trends in Biotechnology, 39(8), 838–852. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.004

Jamei, E., & Vrcelj, Z. (2021). Biomimicry and the built environment, learning from nature's solutions. Applied Sciences (Switzerland), 11(16). https://doi.org/10.3390/app11167514

Jan, N., Madni, A., Khan, S., Shah, H., Akram, F., Khan, A., … Ertas, Y. N. (2023). Biomimetic cell membrane-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for biomedical applications. Bioengineering & Translational Medicine, 8(2), e10441. https://doi.org/10.1002/BTM2.10441

Janjua, T. I., Cao, Y., Kleitz, F., Linden, M., Yu, C., & Popat, A. (2023a). Silica nanoparticles: A review of their safety and current strategies to overcome biological barriers. Advanced Drug Delivery Reviews, 203(October), 115115. https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.115115

Janjua, T. I., Cao, Y., Kleitz, F., Linden, M., Yu, C., & Popat, A. (2023b). Silica nanoparticles: A review of their safety and current strategies to overcome biological barriers. Advanced Drug Delivery Reviews, 203, 115115. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2023.115115

Jeong, W. Y., Kwon, M., Choi, H. E., & Kim, K. S. (2021). Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review. Biomaterials Research, 25(1). https://doi.org/10.1186/S40824-021-00226-6/ASSET/985EEC22-DE59-46AB-BB1E-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AD6EC4F6621C/ASSETS/GRAPHIC/S40824-021-00226-6.FIG.006.PNG

Jha, R., Singh, A., Sharma, P. K., & Fuloria, N. K. (2020). Smart carbon nanotubes for drug delivery system: A comprehensive study. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 58, 101811. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101811

Jian, W., Hui, D., & Lau, D. (2020). Nanoengineering in biomedicine: Current development and future perspectives. Nanotechnology Reviews, 9(1), 700–715. https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0053

Jiang, Q., Liu, Y., Guo, R., Yao, X., Sung, S., Pang, Z., & Yang, W. (2019). Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing photothermal therapy efficacy in tumors. Biomaterials, 192, 292–308. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.11.021

Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A., & Hu, J. (2020). Application of nanotechnology in cancer diagnosis and therapy - A mini-review. International Journal of Medical Sciences, 17(18), 2964–2973. https://doi.org/10.7150/ijms.49801

Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. Journal of Nanobiotechnology 2022 20:1, 20(1), 1–29. https://doi.org/10.1186/S12951-022-01477-8

Jun, Y. W., Huh, Y. M., Choi, J. S., Lee, J. H., Song, H. T., Kim, S., … Cheon, J. (2005). Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. Journal of the American Chemical Society, 127(16), 5732–5733. https://doi.org/10.1021/JA0422155/SUPPL_FILE/JA0422155SI20050216_072238.PDF

Ka Wing Chan, C., Zhang, L., Kwong Cheng, C., Yang, H., Huang, Y., Yu Tian, X., … Tian, X. Y. (2017). review 1702793 (1 of 16) Recent Advances in Managing Atherosclerosis via Nanomedicine. https://doi.org/10.1002/smll.201702793

Kadoglou, N. P. E., Khattab, E., Velidakis, N., Patsourakos, N., & Lambadiari, V. (2022). A new approach to statin therapy in carotid atherosclerosis: Targeting indices of

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

plaque vulnerability in addition to lipid-lowering. A narrative review. Kardiologia Polska, 80(9), 880–890. https://doi.org/10.33963/KP.a2022.0155

Kang, H., Rho, S., Stiles, W. R., Hu, S., Baek, Y., Hwang, D. W., … Choi, H. S. (2020). Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting. Advanced Healthcare Materials, 9(1), 1–8. https://doi.org/10.1002/adhm.201901223

Kelley, W. J., Safari, H., Lopez-Cazares, G., & Eniola-Adefeso, O. (2016). Vascular-targeted nanocarriers: design considerations and strategies for successful treatment of atherosclerosis and other vascular diseases. Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology, 8(6), 909–926. https://doi.org/10.1002/WNAN.1414

Kennedy, E. B. (2017). Biomimicry: Design by Analogy to Biology. Research Technology Management, 60(6), 51–56. https://doi.org/10.1080/08956308.2017.1373052

Khan, A. U., Khan, M., Cho, M. H., & Khan, M. M. (2020). Selected nanotechnologies and nanostructures for drug delivery, nanomedicine and cure. Bioprocess and Biosystems Engineering, 43(8), 1339–1357. https://doi.org/10.1007/s00449-020-02330-8

Kim, D., Park, S., Jae, H. L., Yong, Y. J., & Jon, S. (2007). Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. Journal of the American Chemical Society, 129(24), 7661–7665. https://doi.org/10.1021/JA071471P

Kim, H., Kim, Y., Kim, I. H., Kim, K., & Choi, Y. (2014). ROS-Responsive Activatable Photosensitizing Agent for Imaging and Photodynamic Therapy of Activated Macrophages. Theranostics, 4(1), 1. https://doi.org/10.7150/THNO.7101

Kim, K., Huang, S. W., Ashkenazi, S., O'Donnell, M., Agarwal, A., Kotov, N. A., … Kaplan, M. J. (2007). Photoacoustic imaging of early inflammatory response using gold nanorods. Applied Physics Letters, 90(22), 223901. https://doi.org/10.1063/1.2743752/333663

Korin, N., Kanapathipillai, M., Matthews, B. D., Crescente, M., Brill, A., Mammoto, T., … Ingber, D. E. (2012). Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

obstructed blood vessels. Science (New York, N.Y.), 337(6095), 738–742. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1217815

Koushki, K., Shahbaz, S. K., Mashayekhi, K., Sadeghi, M., Zayeri, Z. D., Taba, M. Y., … Sahebkar, A. (2021). Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways. Clinical Reviews in Allergy and Immunology, 60(2), 175–199. https://doi.org/10.1007/s12016-020-08791-9

Kumar, A., Ajay, G. S., & Reddy, K. (2014). Analyzing the Results of Renewable Energy Source of Solar Botonic Trees Using Nano Piezo Electric Elements. 2, 424–430.

Kunde, S. S., & Wairkar, S. (2021). Platelet membrane camouflaged nanoparticles: Biomimetic architecture for targeted therapy. International Journal of Pharmaceutics, 598(January), 120395. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120395

Kus-liśkiewicz, M., Fickers, P., & Ben Tahar, I. (2021). Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 10952, 22(20), 10952. https://doi.org/10.3390/IJMS222010952

Kushwaha, P., & Chauhan, P. (2021). Microstructural evaluation of iron oxide nanoparticles at different calcination temperature by Scherrer, Williamson-Hall, Size-Strain Plot and Halder-Wagner methods. Phase Transitions, 94(10), 731–753. https://doi.org/10.1080/01411594.2021.1969396

Laffleur, F., & Keckeis, V. (2020). Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? International Journal of Pharmaceutics, 590, 119912. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119912

Le, Q. V., Lee, J., Lee, H., Shim, G., & Oh, Y. K. (2021). Cell membrane-derived vesicles for delivery of therapeutic agents. Acta Pharmaceutica Sinica B, 11(8), 2096–2113. https://doi.org/10.1016/J.APSB.2021.01.020

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lemal, P., Balog, S., Ackermann-Hirschi, L., Taladriz-Blanco, P., Hirt, A. M., Rothen-Rutishauser, B., … Petri-Fink, A. (2020). Simple and fast evaluation of relaxation

parameters of magnetic nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 499, 166176. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.166176

Lemes, M. A., Godinho, M. S., Rabelo, D., Martins, F. T., Mesquita, A., De, F. N., … De Oliveira, A. E. (2014). Estimating Mean Crystallite Size of Magnetite using Multivariate Calibration and Powder X-ray Diffraction Analysis. In Acta Chim. Slov (Vol. 61).

Lewis, N. S., & Nocera, D. G. (2006). Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(43), 15729–15735. https://doi.org/10.1073/pnas.0603395103

Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., … Peng, Q. (2021). The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. Acta Biomaterialia, 129, 57–72. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.05.019

Li, J., Wang, X., Zheng, D., Lin, X., Wei, Z., Zhang, D., … Liu, X. (2018). Cancer cell membrane-coated magnetic nanoparticles for MR/NIR fluorescence dual-modal imaging and photodynamic therapy. Biomaterials Science, 6(7), 1834–1845. https://doi.org/10.1039/c8bm00343b

Li, P. Y., Bearoff, F., Zhu, P., Fan, Z., Zhu, Y., Fan, M., … Cheng, H. (2021). PEGylation enables subcutaneously administered nanoparticles to induce antigen-specific immune tolerance. Journal of Controlled Release, 331, 164–175. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.01.013

Li, Q., Huang, Z., Pang, Z., Wang, Q., Gao, J., Chen, J., … Ge, J. (2023). Targeted delivery of platelet membrane modified extracellular vesicles into atherosclerotic plaque to regress atherosclerosis. Chemical Engineering Journal, 452, 138992. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.138992

Li, Y., Liu, Y., Ren, Y., Su, L., Li, A., An, Y., … Busscher, H. J. (2020). Coating of a Novel Antimicrobial Nanoparticle with a Macrophage Membrane for the Selective Entry into Infected Macrophages and Killing of Intracellular Staphylococci. Advanced

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Functional Materials, 30(48), 2004942. https://doi.org/10.1002/ADFM.202004942

Li, Z., Tao, W., Zhang, D., Wu, C., Song, B., Wang, S., … Sun, J. (2017). The studies of PLGA nanoparticles loading atorvastatin calcium for oral administration in vitro and in vivo. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(3), 285–291. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.08.006

Lima, T., Bernfur, K., Vilanova, M., & Cedervall, T. (2020). Understanding the Lipid and Protein Corona Formation on Different Sized Polymeric Nanoparticles. Scientific Reports 2020 10:1, 10(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57943-6

Liu, G., Yang, L., Chen, G., Xu, F., Yang, F., Yu, H., … Li, B. (2021). A Review on Drug Delivery System for Tumor Therapy. Frontiers in Pharmacology, 12(October), 1–22. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.735446

Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., … He, N. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Bone Research, 5(November 2016). https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14

Liu, R., Luo, C., Pang, Z., Zhang, J., Ruan, S., Wu, M., … Gao, H. (2023). Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment. Chinese Chemical Letters, 34(2), 107518. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2022.05.032

Liu, W. L., Zou, M. Z., Qin, S. Y., Cheng, Y. J., Ma, Y. H., Sun, Y. X., & Zhang, X. Z. (2020). Recent Advances of Cell Membrane-Coated Nanomaterials for Biomedical Applications. Advanced Functional Materials, 30(39), 1–23. https://doi.org/10.1002/adfm.202003559

Liu, Y., Yang, G., Jin, S., Xu, L., & Zhao, C. X. (2020). Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. ChemPlusChem, 85(9), 2143–2157. https://doi.org/10.1002/cplu.202000496

Liu, Z., Wang, F., Liu, X., Sang, Y., Zhang, L., Ren, J., & Qu, X. (2021). Cell membrane–camouflaged liposomes for tumor cell–selective glycans engineering and imaging in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(30). https://doi.org/10.1073/pnas.2022769118

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lombardo, D., Calandra, P., Barreca, D., Magazù, S., & Kiselev, M. A. (2016). Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. Nanomaterials 2016, Vol. 6, Page 125, 6(7), 125. https://doi.org/10.3390/NANO6070125

Long, Y., Xiang, Y., Liu, S., Zhang, Y., Wan, J., Ci, Z., … Guan, Y. (2022). Macrophage membrane modified baicalin liposomes improve brain targeting for alleviating cerebral ischemia reperfusion injury. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 43, 102547. https://doi.org/10.1016/J.NANO.2022.102547

Lotfi, S., Ghaderi, F., Bahari, A., & Mahjoub, S. (2017). Preparation and Characterization of Magnetite–Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Cytotoxicity Effects on MCF7 and Fibroblast Cells. Journal of Superconductivity and Novel Magnetism, 30(12), 3431–3438. https://doi.org/10.1007/s10948-017-4094-5

Lou, H. Y., Yan, H. P., Yang, L. G., Fan, J. H., Cho, W. C., Xiao, Z. H., & Li, S. J. (2021). Integrin α4β1/VCAM-1 Interaction Evokes Dynamic Cell Aggregation Between Immune Cells and Human Lung Microvascular Endothelial Cells at Infectious Hemolysis. Frontiers in Pharmacology, 12(April), 1–13. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.653143

Ma, C., Peng, Y., Li, H., & Chen, W. (2021). Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development. Trends in Pharmacological Sciences, 42(2), 119–133. https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2020.11.009

Ma, S., Feng, X., Liu, F., Wang, B., Zhang, H., & Niu, X. (2021). The pro-inflammatory response of macrophages regulated by acid degradation products of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. Engineering in Life Sciences, 21(10), 709–720. https://doi.org/10.1002/ELSC.202100040

Ma, Y., Hong, J., & Ding, Y. (2020). Biological Behavior Regulation of Gold Nanoparticles via the Protein Corona. Advanced Healthcare Materials, 9(6), 1901448. https://doi.org/10.1002/ADHM.201901448

Madani, F., Esnaashari, S. S., Mujokoro, B., Dorkoosh, F., Khosravani, M., & Adabi, M. (2018). Investigation of effective parameters on size of paclitaxel loaded PLGA nanoparticles. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 8(1), 77–84. https://doi.org/10.15171/apb.2018.010

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Manzano, M., Vallet-Regí, M., Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. Advanced Functional Materials, 30(2), 1902634. https://doi.org/10.1002/ADFM.201902634

Manzari, M. T., Shamay, Y., Kiguchi, H., Rosen, N., Scaltriti, M., & Heller, D. A. (2021). Targeted drug delivery strategies for precision medicines. Nature Reviews Materials 2021 6:4, 6(4), 351–370. https://doi.org/10.1038/s41578-020-00269-6

Marques, A. C., Costa, P. J., Velho, S., & Amaral, M. H. (2020). Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. Journal of Controlled Release, 320, 180–200. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.01.035

Matoba, T., Koga, J. ichiro, Nakano, K., Egashira, K., & Tsutsui, H. (2017). Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. Journal of Cardiology, 70(3), 206–211. https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2017.03.005

Mc Namara, K., Alzubaidi, H., & Jackson, J. K. (2019). Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? . Integrated Pharmacy Research and Practice, Volume 8, 1–11. https://doi.org/10.2147/iprp.s133088

McCarthy, J. R., Jaffer, F. A., & Weissleder, R. (2006). A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications. Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany), 2(8–9), 983–987. https://doi.org/10.1002/SMLL.200600139

Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., … Fazeli, A. (2020). Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. ACS Omega, 5(27), 16701–16710. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01582

Mirkin, C. A. (2020). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. 55–90. https://doi.org/10.1201/9780429200151-4

Misra, R., Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2010). Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discovery Today, 15(19–20), 842–850. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2020). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Nature Reviews Drug Discovery 2020 20:2, 20(2), 101–124. https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8

Mlinar, L. B., Chung, E. J., Wonder, E. A., & Tirrell, M. (2014). Active targeting of early and mid-stage atherosclerotic plaques using self-assembled peptide amphiphile micelles. Biomaterials, 35(30), 8678–8686. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.06.054

Morofuji, Y., Nakagawa, S., Ujifuku, K., Fujimoto, T., Otsuka, K., Niwa, M., & Tsutsumi, K. (2022). Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer. Pharmaceuticals, 15(2), 1–26. https://doi.org/10.3390/ph15020151

Mortensen, M. B., Dzaye, O., Bøtker, H. E., Jensen, J. M., Maeng, M., Bentzon, J. F., … Nørgaard, B. L. (2023). Low-Density Lipoprotein Cholesterol Is Predominantly Associated With Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events in Patients With Evidence of Coronary Atherosclerosis: The Western Denmark Heart Registry. Circulation, 147(14), 1053–1063. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061010

Mortensen, M. B., & Nordestgaard, B. G. (2020). Elevated LDL cholesterol and increased risk of myocardial infarction and atherosclerotic cardiovascular disease in individuals aged 70–100 years: a contemporary primary prevention cohort. The Lancet, 396(10263), 1644–1652. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32233-9

Moyer, T. J., Kassam, H. A., Bahnson, E. S. M., Morgan, C. E., Tantakitti, F., Chew, T. L., … Stupp, S. I. (2015). Shape-Dependent Targeting of Injured Blood Vessels by Peptide Amphiphile Supramolecular Nanostructures. Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany), 11(23), 2750–2755. https://doi.org/10.1002/SMLL.201403429

Mu, W., Chu, Q., Liu, Y., & Zhang, N. (2020). A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy. Nano-Micro Letters, 12(1), 1–24. https://doi.org/10.1007/s40820-020-00482-6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Munawar, A., Ong, Y., Schirhagl, R., Tahir, M. A., Khan, W. S., & Bajwa, S. Z. (2019). Nanosensors for diagnosis with optical, electric and mechanical transducers. RSC Advances, 9(12), 6793–6803. https://doi.org/10.1039/c8ra10144b

Nicol, J. R., Dixon, D., & Coulter, J. A. (2015). Gold Nanoparticle Surface Functionalization: A Necessary Requirement in the Development of Novel Nanotherapeutics. Nanomedicine, 10(8), 1315–1326. https://doi.org/10.2217/NNM.14.219

Niculescu, A. G., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2022). Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. Methods, 199(March 2021), 16–27. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018

Nikezić, A. V. V., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2020). Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 151, 105412. https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2020.105412

Nikzamir, M., Akbarzadeh, A., & Panahi, Y. (2021). An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61(December 2020), 102316. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102316

Nunes, D., Andrade, S., Ramalho, M. J., Loureiro, J. A., & Pereira, M. C. (2022). Polymeric Nanoparticles-Loaded Hydrogels for Biomedical Applications: A Systematic Review on In Vivo Findings. Polymers 2022, Vol. 14, Page 1010, 14(5), 1010. https://doi.org/10.3390/POLYM14051010

Oh, J. Y., Yang, G., Choi, E., & Ryu, J. H. (2022). Mesoporous silica nanoparticle-supported nanocarriers with enhanced drug loading, encapsulation stability, and targeting efficiency. Biomaterials Science, 10(6), 1448–1455. https://doi.org/10.1039/D2BM00010E

Oltolina, F., Peigneux, A., Colangelo, D., Clemente, N., D'urso, A., Valente, G., … Prat, M. (2020). Biomimetic Magnetite Nanoparticles as Targeted Drug Nanocarriers and Mediators of Hyperthermia in an Experimental Cancer Model. Cancers 2020, Vol. 12, Page 2564, 12(9), 2564. https://doi.org/10.3390/CANCERS12092564

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Oroojalian, F., Beygi, M., Baradaran, B., Mokhtarzadeh, A., & Shahbazi, M. A. (2021). Immune Cell Membrane-Coated Biomimetic Nanoparticles for Targeted Cancer

Therapy. In Small (Vol. 17). https://doi.org/10.1002/smll.202006484

Othmani, N. I., Mohamed, S. A., Abdul Hamid, N. H., Ramlee, N., Yeo, L. B., & Mohd Yunos, M. Y. (2022). Reviewing biomimicry design case studies as a solution to sustainable design. Environmental Science and Pollution Research, 29(46), 69327–69340. https://doi.org/10.1007/s11356-022-22342-z

Papademetriou, I., Tsinas, Z., Hsu, J., & Muro, S. (2014). Combination-targeting to multiple endothelial cell adhesion molecules modulates binding, endocytosis, and in vivo biodistribution of drug nanocarriers and their therapeutic cargoes. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 188, 87–98. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.06.008

Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. International Journal of Pharmaceutics, 309(1–2), 44–50. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044

Pardo, A., Bakht, S. M., Gomez-Florit, M., Rial, R., Monteiro, R. F., Teixeira, S. P. B., … Gomes, M. E. (2022). Magnetically-Assisted 3D Bioprinting of Anisotropic Tissue-Mimetic Constructs. Advanced Functional Materials, 32(50), 1–18. https://doi.org/10.1002/adfm.202208940

Pardo, A., Gómez-Florit, M., Barbosa, S., Taboada, P., Domingues, R. M. A., & Gomes, M. E. (2021). Magnetic Nanocomposite Hydrogels for Tissue Engineering: Design Concepts and Remote Actuation Strategies to Control Cell Fate. ACS Nano, 15(1), 175–209. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08253

Pardo, A., Pelaz, B., Gallo, J., Bañobre-López, M., Parak, W. J., Barbosa, S., … Taboada, P. (2020a). Synthesis, Characterization, and Evaluation of Superparamagnetic Doped Ferrites as Potential Therapeutic Nanotools. Chemistry of Materials, 32(6), 2220–2231. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b04848

Pardo, A., Pelaz, B., Gallo, J., Bañobre-López, M., Parak, W. J., Barbosa, S., … Taboada, P. (2020b). Synthesis, Characterization, and Evaluation of Superparamagnetic Doped Ferrites as Potential Therapeutic Nanotools. Chemistry of Materials, 32(6), 2220–

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2231. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b04848

Park, J., Lee, Y., Hong, J., Lee, Y., Ha, M., Jung, Y., … Ko, H. (2014). Tactile-direction-sensitive and stretchable electronic skins based on human-skin-inspired interlocked microstructures. ACS Nano, 8(12), 12020–12029. https://doi.org/10.1021/nn505953t

Pearce, A. K., Wilks, T. R., Arno, M. C., & O'Reilly, R. K. (2021). Synthesis and applications of anisotropic nanoparticles with precisely defined dimensions. Nature Reviews Chemistry, 5(1), 21–45. https://doi.org/10.1038/s41570-020-00232-7

Petcharoen, K., & Sirivat, A. (2012). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. Materials Science and Engineering: B, 177(5), 421–427. https://doi.org/10.1016/J.MSEB.2012.01.003

Pickett, J. R., Wu, Y., Zacchi, L. F., & Ta, H. T. (2023). Targeting endothelial vascular cell adhesion molecule-1 in atherosclerosis: drug discovery and development of vascular cell adhesion molecule-1-directed novel therapeutics. Cardiovascular Research, 119(13), 2278–2293. https://doi.org/10.1093/cvr/cvad130

Pourtalebi Jahromi, L., Ghazali, M., Ashrafi, H., & Azadi, A. (2020a). A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. Heliyon, 6(2), e03451. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E03451

Pourtalebi Jahromi, L., Ghazali, M., Ashrafi, H., & Azadi, A. (2020b). A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. Heliyon, 6(2). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03451

Pownall, H. J., Rosales, C., Gillard, B. K., & Gotto, A. M. (2021). High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis. Nature Reviews Cardiology, 18(10), 712–723. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00538-z

Poznyak, A. V., Kashirskikh, D. A., Sukhorukov, V. N., Kalmykov, V., Omelchenko, A. V., & Orekhov, A. N. (2022). Cholesterol Transport Dysfunction and Its Involvement in Atherogenesis. International Journal of Molecular Sciences, 23(3). https://doi.org/10.3390/ijms23031332

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Qu, D., Wang, L., Huo, M., Song, W., Lau, C. W., Xu, J., … Huang, Y. (2020). Focal TLR4 activation mediates disturbed flow-induced endothelial inflammation. Cardiovascular Research, 116(1), 226–236. https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ046

Rampado, R., Caliceti, P., & Agostini, M. (2022). Latest Advances in Biomimetic Cell Membrane-Coated and Membrane-Derived Nanovectors for Biomedical Applications. Nanomaterials 2022, Vol. 12, Page 1543, 12(9), 1543. https://doi.org/10.3390/NANO12091543

Rao, L., Zhao, S. K., Wen, C., Tian, R., Lin, L., Cai, B., … Chen, X. (2020). Activating Macrophage-Mediated Cancer Immunotherapy by Genetically Edited Nanoparticles. Advanced Materials, 32(47), 2004853. https://doi.org/10.1002/ADMA.202004853

Rasson, J., Poncelet, O., Mouchet, S. R., Deparis, O., & Francis, L. A. (2017). Vapor sensing using a bio-inspired porous silicon photonic crystal. Materials Today: Proceedings, 4(4), 5006–5012. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.04.107

Raza, F., Zafar, H., Zhang, S., Kamal, Z., Su, J., Yuan, W. E., & Mingfeng, Q. (2021). Recent Advances in Cell Membrane-Derived Biomimetic Nanotechnology for Cancer Immunotherapy. Advanced Healthcare Materials, 10(6), 1–27. https://doi.org/10.1002/adhm.202002081

Razavi, A. C., Mehta, A., & Sperling, L. S. (2022). Statin therapy for the primary prevention of cardiovascular disease: Pros. Atherosclerosis, 356(July), 41–45. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.07.004

Ren, X., Zheng, R., Fang, X., Wang, X., Zhang, X., Yang, W., & Sha, X. (2016). Red blood cell membrane camouflaged magnetic nanoclusters for imaging-guided photothermal therapy. Biomaterials, 92, 13–24. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.03.026

Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., & Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. Nature Nanotechnology 2021 16:3, 16(3), 266–276. https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rezanezhad, A., Hajalilou, A., Eslami, F., Parvini, E., Abouzari-Lotf, E., & Aslibeiki, B. (2021).

Superparamagnetic magnetite nanoparticles for cancer cells treatment via magnetic hyperthermia: effect of natural capping agent, particle size and concentration. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 32(19), 24026–24040. https://doi.org/10.1007/S10854-021-06865-8/FIGURES/8

Ridolfi, A., Cardellini, J., Gashi, F., van Herwijnen, M. J. C., Trulsson, M., Campos-Terán, J., … Stenhammar, J. (2023). Electrostatic interactions control the adsorption of extracellular vesicles onto supported lipid bilayers. Journal of Colloid and Interface Science, 650, 883–891. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.07.018

Saboor, M., Ayub, Q., Ilyas, S., & Moinuddin. (2013). Platelet receptors: An instrumental of platelet physiology. Pakistan Journal of Medical Sciences, 29(3). https://doi.org/10.12669/pjms.293.3497

Sahu, S. S., Cavallaro, S., Hååg, P., Nagy, Á., Karlström, A. E., Lewensohn, R., … Dev, A. (2021). Exploiting Electrostatic Interaction for Highly Sensitive Detection of Tumor-Derived Extracellular Vesicles by an Electrokinetic Sensor. ACS Applied Materials & Interfaces, 13(36), 42513–42521. https://doi.org/10.1021/acsami.1c13192

Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., & Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 63(January), 102487. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487

Saleh, M. I., Rühle, B., Wang, S., Radnik, J., You, Y., & Resch-Genger, U. (2020). Assessing the protective effects of different surface coatings on NaYF4:Yb3+, Er3+ upconverting nanoparticles in buffer and DMEM. Scientific Reports, 10(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76116-z

Sangaiya, P., & Jayaprakash, R. (2018). A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. Journal of Superconductivity and Novel Magnetism, 31(11), 3397–3413. https://doi.org/10.1007/S10948-018-4841-2/TABLES/1

Satny, M., Hubacek, J. A., & Vrablik, M. (2021). Statins and Inflammation. Current Atherosclerosis Reports, 23(12), 1–8. https://doi.org/10.1007/s11883-021-00977-6

Schneider, M. G. M., Martín, M. J., Otarola, J., Vakarelska, E., Simeonov, V., Lassalle, V., &

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nedyalkova, M. (2022). Biomedical Applications of Iron Oxide Nanoparticles: Current Insights Progress and Perspectives. Pharmaceutics 2022, Vol. 14, Page 204, 14(1), 204. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14010204

Shah, S., Rangaraj, N., Singh, S. B., & Srivastava, S. (2021). Exploring the unexplored avenues of surface charge in nano-medicine. Colloids and Interface Science Communications, 42(January), 100406. https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100406

Shaker, M. A., Elbadawy, H. M., Al Thagfan, S. S., & Shaker, M. A. (2021). Enhancement of atorvastatin oral bioavailability via encapsulation in polymeric nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 592, 120077. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.120077

Shanti Bheemidi, V. (2011). An Imperative Note on Novel Drug Delivery Systems. https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000125

Shegokar, R., & Nakach, M. (2020). Chapter 4 - Large-scale manufacturing of nanoparticles—An industrial outlook (R. B. T.-D. D. A. Shegokar, ed.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821222-6.00004-X

Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., … Wang, Q. (2021). Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. Nanoscale, 13(24), 10748–10764. https://doi.org/10.1039/D1NR02065J

Simpson, D. S. A., & Oliver, P. L. (2020). Ros generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. Antioxidants, 9(8), 1–27. https://doi.org/10.3390/antiox9080743

Sindhwani, S., Syed, A. M., Ngai, J., Kingston, B. R., Maiorino, L., Rothschild, J., … Chan, W. C. W. (2020). The entry of nanoparticles into solid tumours. Nature Materials 2020 19:5, 19(5), 566–575. https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2

Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C., & Singh, R. (2023). ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. Clinica Chimica Acta, 548(May), 117487. https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117487

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., … Chen, Q. (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 69(2), 445–453. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.01.013

Soprano, E., Alvarez, A., Pelaz, B., del Pino, P., & Polo, E. (2020). Plasmonic Cell-Derived Nanocomposites for Light-Controlled Cargo Release inside Living Cells. Advanced Biosystems, 4(3), 1–11. https://doi.org/10.1002/adbi.201900260

Sreeramagiri, S. V. S. (2021). Biomimetics: Applications in structural design. Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.(IJIRSET), 10(July), 8899–8908. https://doi.org/10.15680/IJIRSET.2021.1007055

Steel, A., Robertson, C. E., & Taube, J. S. (2021). Current Promises and Limitations of Combined Virtual Reality and Functional Magnetic Resonance Imaging Research in Humans: A Commentary on Huffman and Ekstrom (2019). Journal of Cognitive Neuroscience, 33(2), 159–166. https://doi.org/10.1162/jocn_a_01635

Sucharski, H. C., & Koenig, S. N. (2022). Mechanisms of Lipoproteins and Reverse Cholesterol Transport in Atherosclerotic Cardiovascular Disease BT - Cardiovascular Signaling in Health and Disease (N. L. Parinandi & T. J. Hund, eds.). https://doi.org/10.1007/978-3-031-08309-9_12

Sultan, S., D'Souza, A., Zabetakis, I., Lordan, R., Tsoupras, A., Kavanagh, E. P., & Hynes, N. (2019). Statins: Rationale, Mode of Action, and Side Effects. The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases, 171–200. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813792-5.00006-9

Sun, S. Ben, Liu, P., Shao, F. M., & Miao, Q. L. (2015). Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(10), 19670–19681.

Sun, H., Su, J., Meng, Q., Yin, Q., Chen, L., Gu, W., … Li, Y. (2017). Cancer Cell Membrane-Coated Gold Nanocages with Hyperthermia-Triggered Drug Release and Homotypic Target Inhibit Growth and Metastasis of Breast Cancer. Advanced Functional Materials, 27(3). https://doi.org/10.1002/adfm.201604300

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. Biomaterials Research, 24(1). https://doi.org/10.1186/S40824-020-00190-7/ASSET/598F1C75-A170-4681-A3D0-94FF4706EA5E/ASSETS/GRAPHIC/40824_2020_190_FIG8_HTML.PNG

Tagde, P., Kulkarni, G. T., Mishra, D. K., & Kesharwani, P. (2020). Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 56, 101613. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101613

Thayse, K., Kindt, N., Laurent, S., & Carlier, S. (2020). Vcam-1 target in non-invasive imaging for the detection of atherosclerotic plaques. Biology, 9(11), 1–21. https://doi.org/10.3390/biology9110368

Tiwari, P., Yadav, K., Shukla, R. P., Gautam, S., Marwaha, D., Sharma, M., & Mishra, P. R. (2023). Surface modification strategies in translocating nano-vesicles across different barriers and the role of bio-vesicles in improving anticancer therapy. Journal of Controlled Release, 363, 290–348. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.09.016

Tosi, G., Duskey, J. T., & Kreuter, J. (2020). Nanoparticles as carriers for drug delivery of macromolecules across the blood-brain barrier. Expert Opinion on Drug Delivery, 17(1), 23–32. https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1698544

Trenkenschuh, E., & Friess, W. (2021). Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 165(May), 345–360. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024

Troncoso, M. F., Ortiz-Quintero, J., Garrido-Moreno, V., Sanhueza-Olivares, F., Guerrero-Moncayo, A., Chiong, M., … Lavandero, S. (2021). VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1867(9). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166170

Trzeciak, K., Chotera-ouda, A., Bak-sypien, I. I., & Potrzebowski, M. J. (2021). Mesoporous Silica Particles as Drug Delivery Systems—The State of the Art in Loading Methods

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and the Recent Progress in Analytical Techniques for Monitoring These Processes. Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 950, 13(7), 950. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13070950

Vekic, J., Zeljkovic, A., Cicero, A. F. G., Janez, A., Stoian, A. P., Sonmez, A., & Rizzo, M. (2022). Atherosclerosis Development and Progression: The Role of Atherogenic Small, Dense LDL. Medicina 2022, Vol. 58, Page 299, 58(2), 299. https://doi.org/10.3390/MEDICINA58020299

Von Eckardstein, A. (2020). LDL Contributes to Reverse Cholesterol Transport. Circulation Research, 127(6), 793–795. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317721

Wang, D., Wang, S., Zhou, Z., Bai, D., Zhang, Q., Ai, X., … Zhang, L. (2022). White Blood Cell Membrane-Coated Nanoparticles: Recent Development and Medical Applications. Advanced Healthcare Materials, 11(7), 1–16. https://doi.org/10.1002/adhm.202101349

Wang, H., Liu, Y., He, R., Xu, D., Zang, J., Weeranoppanant, N., … Li, Y. (2020). Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery. Biomaterials Science, 8(2), 552–568. https://doi.org/10.1039/C9BM01392J

Wang, Y., Zhang, K., Li, T., Maruf, A., Qin, X., Luo, L., … Wang, G. (2021). Macrophage membrane functionalized biomimetic nanoparticles for targeted anti-atherosclerosis applications. Theranostics, 11(1), 164. https://doi.org/10.7150/THNO.47841

Watcharadulyarat, N., Rattanatayarom, M., Ruangsawasdi, N., & Patikarnmonthon, N. (2023). PEG–PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin. Scientific Reports, 13(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-023-27500-y

Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C. A., Bengele, H. H., & Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. Radiology, 175(2), 489–493. https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.175.2.2326474

Wiśniewski, J. R., Hein, M. Y., Cox, J., & Mann, M. (2014). A “Proteomic Ruler” for Protein Copy Number and Concentration Estimation without Spike-in Standards. Molecular

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

& Cellular Proteomics, 13(12), 3497–3506. https://doi.org/10.1074/MCP.M113.037309

Wu, G., Wei, W., Zhang, J., Nie, W., Yuan, L., Huang, Y., … Xie, H. Y. (2020). A self-driven bioinspired nanovehicle by leukocyte membrane-hitchhiking for early detection and treatment of atherosclerosis. Biomaterials, 250. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.119963

Wu, Q., Liu, J., Wang, X., Feng, L., Wu, J., Zhu, X., … Gong, X. (2020). Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. BioMedical Engineering OnLine 2020 19:1, 19(1), 1–19. https://doi.org/10.1186/S12938-020-0752-0

Xu, C. H., Ye, P. J., Zhou, Y. C., He, D. X., Wei, H., & Yu, C. Y. (2020). Cell membrane-camouflaged nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. Acta Biomaterialia, 105, 1–14. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.01.036

Xu, L., Wang, X., Liu, Y., Yang, G., Falconer, R. J., & Zhao, C. X. (2022). Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. Advanced NanoBiomed Research, 2(2). https://doi.org/10.1002/anbr.202100109

Yaghmur, A., & Mu, H. (2021). Recent advances in drug delivery applications of cubosomes, hexosomes, and solid lipid nanoparticles. Acta Pharmaceutica Sinica B, 11(4), 871–885. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.013

Yan, L., Shen, J., Wang, J., Yang, X., Dong, S., & Lu, S. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology. Dose-Response, 18(3). https://doi.org/10.1177/1559325820936161/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1559325820936161-FIG6.JPEG

Yang, H., Song, Y., Chen, J., Pang, Z., Zhang, N., Cao, J., … Ge, J. (2020). Platelet membrane-coated nanoparticles target sclerotic aortic valves in apoe−/− mice by multiple binding mechanisms under pathological shear stress. International Journal of Nanomedicine, 15, 901–912. https://doi.org/10.2147/IJN.S224024

Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., … Shao, A. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Frontiers in Molecular Biosciences, 7(August), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193

Yen Tan, S., Leung, Z., Ruohao Wu, A., Tan, S. Y., Wu, A. R., & Leung, Z. (2020). Recreating Physiological Environments In Vitro: Design Rules for Microfluidic-Based Vascularized Tissue Constructs. Small, 16(9), 1905055. https://doi.org/10.1002/SMLL.201905055

Zeng, Y., Li, S., Zhang, S., Wang, L., Yuan, H., & Hu, F. (2022). Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy. Acta Pharmaceutica Sinica B, 12(8), 3233–3254. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.023

Zeng, Zhihui, Jiang, F., Yue, Y., Han, D., Lin, L., Zhao, S., … Wang, J. (2020). Flexible and Ultrathin Waterproof Cellular Membranes Based on High-Conjunction Metal-Wrapped Polymer Nanofibers for Electromagnetic Interference Shielding. Advanced Materials, 32(19), 1–7. https://doi.org/10.1002/adma.201908496

Zeng, Ziling, & Pu, K. (2020). Improving Cancer Immunotherapy by Cell Membrane-Camouflaged Nanoparticles. Advanced Functional Materials, 30(43), 1–18. https://doi.org/10.1002/adfm.202004397

Zhang, D., Liu, L., Wang, J., Zhang, H., Zhang, Z., Xing, G., … Liu, M. (2022). Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment. Frontiers in Pharmacology, 13(August), 1–12. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.990505

Zhang, J., Sheng, X., & Jiang, L. (2009). The dewetting properties of Lotus leaves. Langmuir, 25(3), 1371–1376. https://doi.org/10.1021/la8024233

Zhang, Lei, Cao, Z., Li, Y., Ella-Menye, J. R., Bai, T., & Jiang, S. (2012). Softer zwitterionic nanogels for longer circulation and lower splenic accumulation. ACS Nano, 6(8), 6681–6686. https://doi.org/10.1021/NN301159A

Zhang, Ling, He, R., & Gu, H. C. (2006). Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. Applied Surface Science, 253(5), 2611–2617. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023

Zhang, W., Zhang, Z., & Zhang, Y. (2011). The application of carbon nanotubes in target

USC UNIVERSIDADE

drug delivery systems for cancer therapies. Nanoscale Research Letters, 6(1), 1–22. https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-555/FIGURES/6

Zhao, H., Song, S., Ma, J., Yan, Z., Xie, H., Feng, Y., & Che, S. (2022). CD47 as a promising therapeutic target in oncology. Frontiers in Immunology, 13(August), 1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.757480

Zhao, L., Ma, D., Wang, L. J., Su, X. Q., Feng, L. S., Zhu, L. C., … Feng, J. C. (2023). Metabolic changes with the occurrence of atherosclerotic plaques and the effects of statins. Frontiers in Immunology, 14(December), 1–23. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1301051

Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. Coordination Chemistry Reviews, 257(3–4), 638–665. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.09.002

Zhuang, J., Gong, H., Zhou, J., Zhang, Q., Gao, W., Fang, R. H., & Zhang, L. (2020). Targeted gene silencing in vivo by platelet membrane-coated metal-organic framework nanoparticles. Science Advances, 6(13). https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAZ6108/ASSET/DB962131-8D71-40A6-AC99-6F18BA3AD294/ASSETS/GRAPHIC/AAZ6108-F6.JPEG

Zou, S., Wang, B., Wang, C., Wang, Q., & Zhang, L. (2020). Cell Membrane-Coated Nanoparticles: Research Advances. Nanomedicine, 15(6), 625–641. https://doi.org/10.2217/NNM-2019-0388

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PERMISOS DE REPRODUCCIÓN DE FIGURAS

Figura 2. Sensores electrónicos basados en piel humana (Park et al., 2014).



CCC RightsLink

Sign In/Register

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Tactile-Direction-Sensitive and Stretchable Electronic Skins Based on Human-Skin-Inspired Interlocked Microstructures

Author: Jonghwa Park, Youngoh Lee, Jaehyung Hong, et al
Publication: ACS Nano
Publisher: American Chemical Society
Date: Dec 1, 2014

Copyright © 2014, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

© 2024 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3. Nanohojas biomiméticas para la obtención de energía (B. Chen et al., 2019).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 16, 2024
Order Number:	5710701465230
Publication:	Applied Catalysis B: Environment and Energy
Title:	A biomimetic nanoleaf electrocatalyst for robust oxygen evolution reaction
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

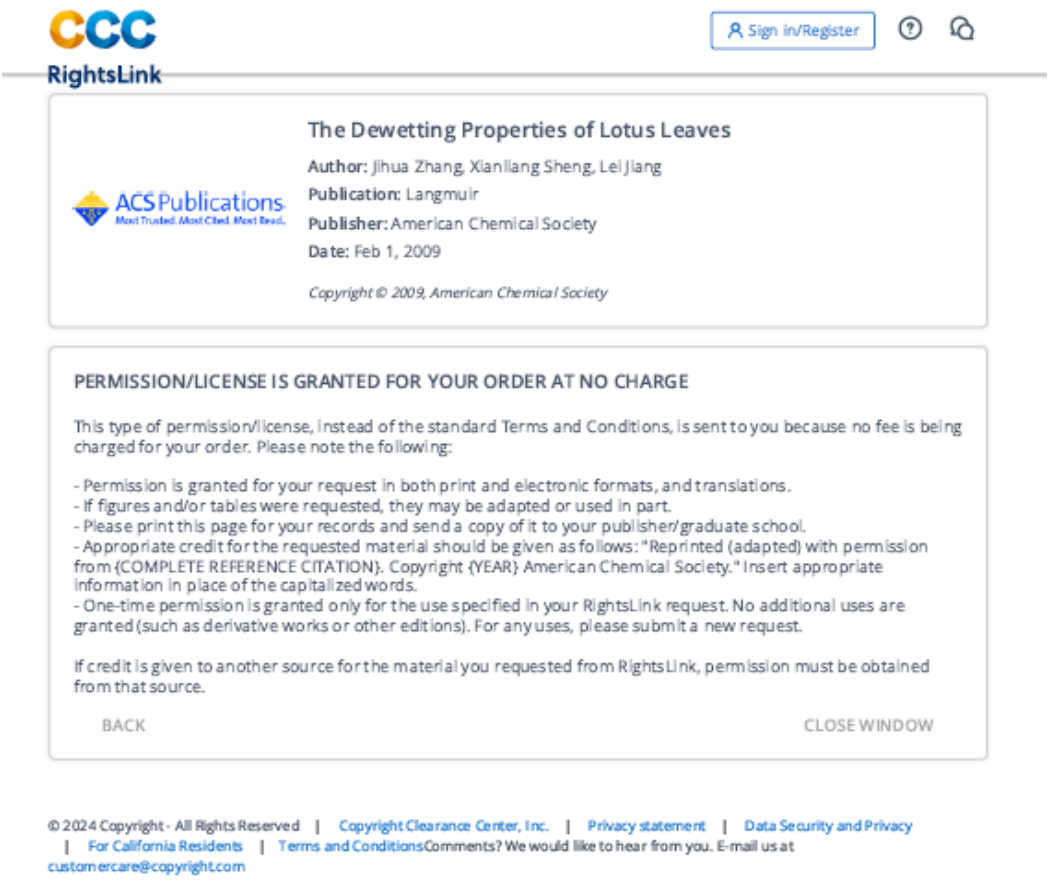
Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

CCC RightsLink

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 4. Imágenes de la superficie de la hoja de la flor de loto (J. Zhang et al., 2009).



CCC RightsLink

Sign in/Register

The Dewetting Properties of Lotus Leaves

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Author: Jihua Zhang, Xianliang Sheng, Lei Jiang
Publication: Langmuir
Publisher: American Chemical Society
Date: Feb 1, 2009

Copyright © 2009, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

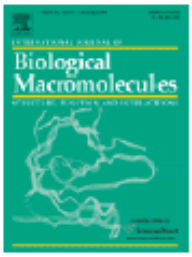
If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

© 2024 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and ConditionsComments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 5. Hidrogeles inyectables para la regeneración de tejido (M. Liu et al., 2017).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Mar 19, 2024
Order Number:	5752430610778
Publication:	International Journal of Biological Macromolecules
Title:	Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue regeneration: A review
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 6. Nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos (R. Liu et al., 2023).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 11, 2024
Order Number:	5705850142986
Publication:	Chinese Chemical Letters
Title:	Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

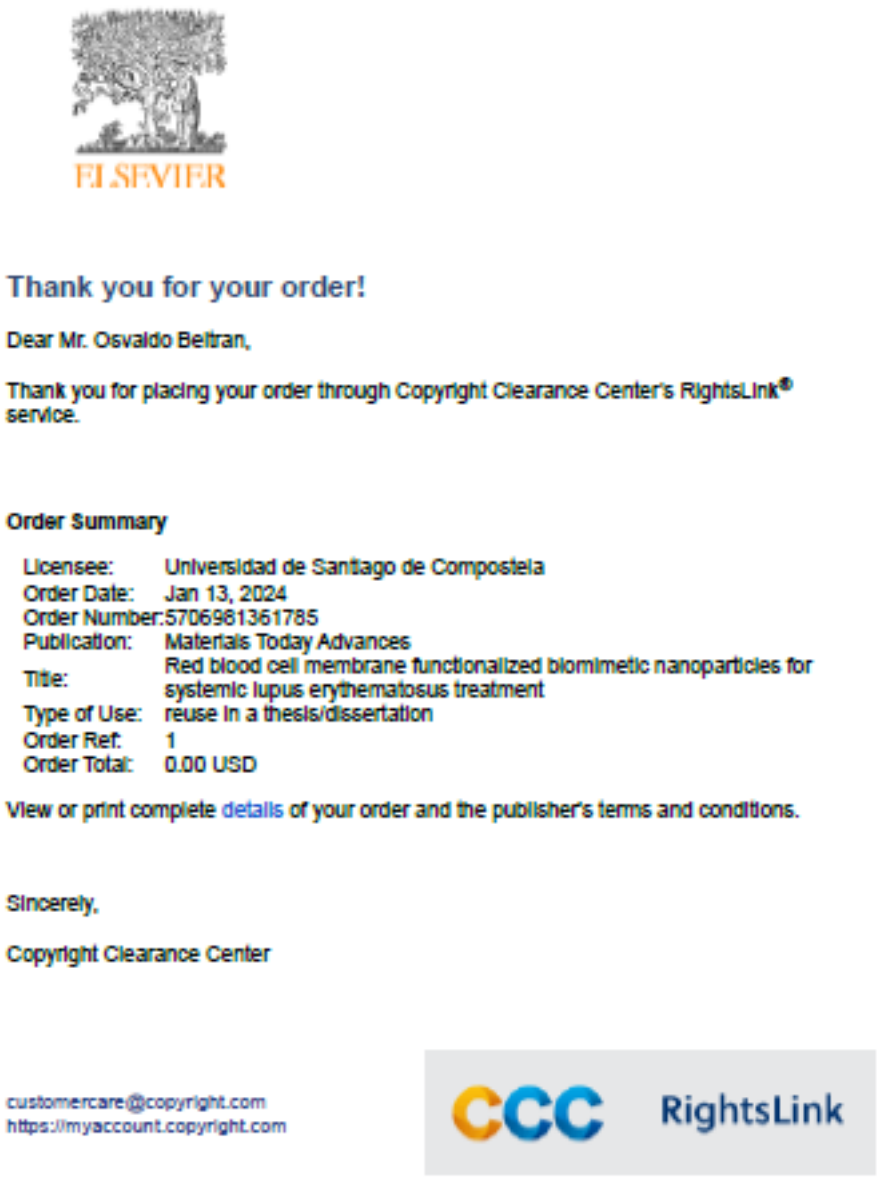
View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

Figura 8. Preparación y aplicación de nanopartículas cubiertas con membrana celular de eritrocito (Hao et al., 2022).



ELSEVIER

Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 13, 2024
Order Number:	5706961361785
Publication:	Materials Today Advances
Title:	Red blood cell membrane functionalized biomimetic nanoparticles for systemic lupus erythematosus treatment
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

CCC RightsLink

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 9. Nanopartículas cubiertas con membrana celular de células cancerosas (Raza et al., 2021).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 13, 2024
Order Number:	5706980561379
Publication:	Advanced Healthcare Materials
Title:	Recent Advances in Cell Membrane-Derived Biomimetic Nanotechnology for Cancer Immunotherapy
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

Figura 10. Preparación de nanopartículas cubiertas con membrana de plaquetas (Kunde & Wairkar, 2021).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 11, 2024
Order Number:	5705891287151
Publication:	International Journal of Pharmaceutics
Title:	Platelet membrane camouflaged nanoparticles: Biomimetic architecture for targeted therapy
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 12. Mecanismo de acción de las estatinas (Sultan et al., 2019).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jan 28, 2024
Order Number:	5717660453695
Publication:	Elsevier Books
Title:	The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 13. Nanomateriales para el tratamiento y diagnóstico de la aterosclerosis (J. Chen et al., 2021).



Thank you for your order!

Dear Mr. Osvaldo Beltran,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Universidad de Santiago de Compostela
Order Date:	Jun 21, 2024
Order Number:	5813590460927
Publication:	Advanced Drug Delivery Reviews
Title:	Recent advances in nanomaterials for therapy and diagnosis for atherosclerosis
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Ref:	1
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customercare@copyright.com
https://myaccount.copyright.com

Esta tesis doctoral desarrolla dos tipos de nanosistemas biomiméticos basados en extractos de membranas de macrófagos murinos (RAW 264.7), con el propósito de ser empleados en el tratamiento de la aterosclerosis. El primer nanosistema consiste en una nanovesícula que encapsula pravastatina, aprovechando la protección del nanotransportador biomimético y la capacidad de orientación de los receptores de membrana celular. El segundo, más complejo, incluye nanopartículas superparamagnéticas como agente de contraste para imagenología por resonancia magnética y consiste en nanonúcleos de PLGA cargados con nanopartículas de magnetita y un fármaco de la familia de las estatinas (pravastatina/atorvastatina), recubiertos con una corona de membrana celular, creando una plataforma teragnóstica para diagnóstico y tratamiento simultá