



MEMORIA TRABAJO FIN GRADO
GRADO EN FARMACIA



ADMINISTRACIÓN DIRIGIDA DE FÁRMACOS EN
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES MEDIANTE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

JUNIO 2017

ALUMNO: ENRIQUE MORA FERRÁNDIZ

TUTOR/ES: MARTA GONZÁLEZ ÁLVAREZ

ISABEL GONZÁLEZ ÁLVAREZ

ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACEUTICA

ÍNDICE

1.	Resumen.....	3
2.	Introducción.....	4
	2.1. Enfermedades cardiovasculares.....	4
	2.2. Tratamiento.....	4
	2.3. Nanopartículas magnéticas.....	5
	2.3.1. Propiedades fisicoquímicas	5
	2.3.2. Síntesis y composición	8
	2.3.3. Cobertura de las partículas.....	11
	2.3.4. Aplicaciones.....	13
3.	Objetivos.....	15
4.	Materiales y Métodos.....	16
5.	Resultados y discusiones.....	16
	5.1. Estudios de diagnóstico cardiovascular.....	18
	5.2. Estudios de tratamiento	27
6.	Valoración crítica.....	33
7.	Conclusiones.....	34
8.	Bibliografía.....	35

1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son hoy en día una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A pesar de la gran cantidad de estudios y fármacos desarrollados durante las últimas décadas siguen teniendo una gran prevalencia en nuestra sociedad. El principal problema que presentan estas patologías son los escasos síntomas que presentan durante el transcurso de la enfermedad, siendo en la mayoría de veces tratados cuando el daño ya está hecho.

El desarrollo de la nanomedicina resulta de gran interés para la prevención y tratamiento de dichas patologías. Mediante partículas magnéticas se pretende guiar y retener intencionadamente partículas hacia el sitio diana, como puede ser el corazón. Algunos materiales como el óxido de hierro presentan un comportamiento magnético que permite esta vectorización. Los métodos de síntesis actuales y los diferentes materiales de cobertura permiten su utilización en diferentes campos.

Las aplicaciones más relevantes relacionadas con enfermedades cardiovasculares se centran en métodos de diagnóstico por imagen y en su tratamiento. La resonancia magnética emplea agentes de contraste basados en nanopartículas de óxido de hierro que han demostrado una mejora en el diagnóstico. Las investigaciones referidas al tratamiento de enfermedades cardiovasculares se centran en el infarto de miocardio y la posterior recuperación del tejido afectado, que no se regenera por sí solo. A pesar de que se han conseguido algunos resultados positivos, aún son necesarias futuras investigaciones para solventar algunas limitaciones y poder ser empleadas como tratamientos eficaces. El uso de nanopartículas magnéticas son una prometedora herramienta que puede aportar beneficios en dichas patologías.

2. INTRODUCCIÓN

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo, según recoge *World Health Organisation* (WHO) en su base de datos¹. Se entiende por enfermedad cardiovascular toda aquella relacionada con el corazón y/o los vasos sanguíneos, arterias y venas. Las enfermedades más características de este extenso grupo son el infarto de miocardio y la cardiopatía isquémica causada por el estrechamiento y endurecimiento de las arterias coronarias. Este proceso que tiene lugar en las arterias se denomina arterioesclerosis y se caracteriza por ser de formación lenta y asintomático. Se produce por la formación de colágeno y depósito e infiltración de lípidos y células inflamatorias en las paredes de las arterias².

La mayoría de enfermedades cardiovasculares son prevenibles. Los factores de riesgo que aumentan las posibilidades de sufrir una enfermedad cardiovascular son: dieta inadecuada, inactividad física, estrés, consumo de tabaco y consumo nocivo de alcohol.

Una continua exposición a estos factores puede derivar en comorbilidades asociadas, las cuales se dan antes de la propia enfermedad cardiovascular. Las manifestaciones más comunes se presentan en forma de hipertensión arterial, hiperglucemia, hiperlipidemia, sobrepeso y obesidad, los cuales también son indicativos de un aumento del riesgo de sufrir ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca u otras patologías cardiovasculares³.

Tratamientos

Las enfermedades cardiovasculares se suelen diagnosticar a raíz de un episodio violento como puede ser un infarto de miocardio o a través de las comorbilidades anteriormente nombradas. Es decir, son enfermedades que se suelen diagnosticar posteriormente a la lesión. El gran problema que presentan para su diagnóstico es que no se refieren síntomas durante el transcurso de la patología. Es por ello, que un diagnóstico temprano puede ser decisivo en el tratamiento de la patología. Cuanto antes se detecte el problema antes se pueden buscar

soluciones. Esto es importante ya que, como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de enfermedades cardiovasculares son prevenibles.

El tratamiento de las patologías cardiovasculares no suele ser sencillo. En muchas ocasiones se precisan de métodos tremendamente invasivos como cirugías o de tratamientos farmacológicos que afectan a la totalidad del sistema cardiovascular y que presentan multitud de complicaciones. Un ejemplo de ello es la terapia farmacológica con anticoagulantes.

La nanomedicina abre un abanico de posibilidades para el diagnóstico precoz y el tratamiento de estas patologías. Entre ellas parece que destacan por su aplicabilidad en este sector las nanopartículas magnéticas. Se pretende reducir las complicaciones actuales usando sistemas de administración dirigida que pueden ayudar a realizar un diagnóstico temprano, así como evitar cirugías o estados avanzados de la enfermedad.

Nanopartículas magnéticas.

Las nanopartículas magnéticas son partículas de tamaño comprendido entre 1 y 100 nanómetros que presentan propiedades magnéticas. Esto quiere decir que pueden ser controladas mediante un campo magnético externo. Esta característica se debe fundamentalmente a la naturaleza del material que forma el núcleo de la partícula, siendo los más habituales óxidos de hierro.

Propiedades fisicoquímicas.

El comportamiento magnético de un material depende de los electrones de los átomos que contiene, en concreto de los electrones desapareados y del orbital en el que se encuentren. Una partícula cargada eléctricamente, como lo son los electrones, cuando gira crea un dipolo magnético. Al aplicar un campo magnético externo, los dipolos se ordenan con el campo. Según la respuesta al campo externo, se distinguen varios tipos de comportamiento: diamagnetismo (repele el campo magnético), paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo y ferrimagnetismo⁴.

La diferencia entre estos comportamientos se basa en el sumatorio de todos los momentos de los electrones representado en la figura 1. Si todos los momentos

se cancelan entre sí, dando un sumatorio nulo, no existe un momento magnético total. Este comportamiento se conoce como antiferromagnetismo. Si la cancelación es solo parcial, el material puede ser para-, ferro- o ferrimagnético⁵.

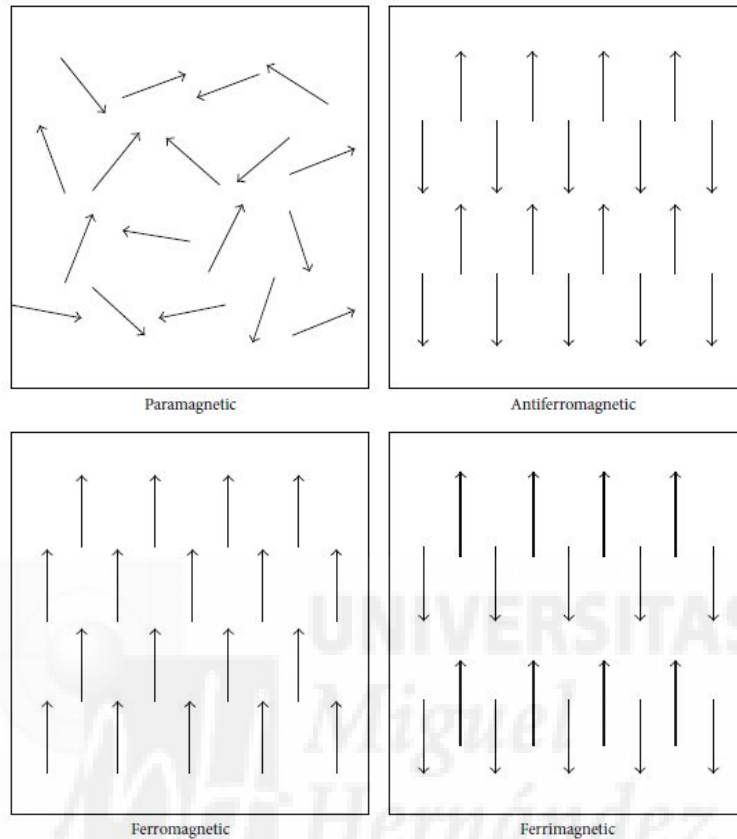


Figura 1. Representación de la alineación de los momentos de los electrones en presencia de un campo magnético externo⁶.

Se conocen dieciséis óxidos de hierro, de los cuales tres presentan propiedades interesantes para generar nanopartículas magnéticas con potencial para ser biocompatibles y generar aplicaciones. Estos son; la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)⁷. Todos ellos presentan estructuras y propiedades magnéticas diferentes, que les hacen interesantes para sintetizar nanopartículas magnéticas. La figura 2 muestra las distintas estructuras cristalinas de la hematita, magnetita y maghemita.

La hematita presenta una buena estabilidad en condiciones ambientales, es semiconductor y antiferromagnética a temperatura ambiente. Los momentos magnéticos se cancelan entre sí y no se observa magnetismo de manera obvia. Puede ser utilizada como precursor para la síntesis de magnetita y maghemita.

La magnetita es ferromagnética. Es decir, presenta todos los momentos magnéticos pareados y alineados paralelamente al campo magnético externo aplicado. Mantienen el posicionamiento paralelo aun cuando el campo cesa y el sumatorio de los momentos es el responsable del magnetismo o efecto imán.

La maghemita, es ferrimagnética. Aunque también presenta un alineamiento paralelo al campo externo aplicado, el sumatorio de los momentos no es cero.

Sin embargo, cuando el diámetro de las estructuras cristalinas se reduce a la escala nanométrica pueden presentar en ocasiones comportamiento superparamagnético. Este fenómeno se observa en diámetros menores de 35 nm y se basa en el cambio continuo y aleatorio de la orientación del momento magnético debido a la temperatura⁸.

A diferencia del ferri o ferromagnético, únicamente retienen el momento magnético en presencia de un campo magnético externo. Cuando cesa el campo magnético externo, vuelven a su estado no magnético.

Existe una relación entre las propiedades de las nanopartículas con la estructura cristalina y el tamaño de la misma. La elección de un método particular de síntesis puede determinar el tamaño y la estructura cristalina, alterando por lo tanto las propiedades de la nanopartícula magnética. La figura 2 representa las diferentes estructuras de la hematita, magnetita y maghemita.

Tras la síntesis, las nanopartículas de hierro forman capas de óxido de hierro en su superficie. Estas capas no penetran en la partícula y forman un escudo alrededor del núcleo.

Los óxidos de hierro son muy reactivos frente a cualquier agente oxidante, especialmente al aire ya que las partículas en condiciones ambientales no son estables, y se oxidan. Para evitar esta oxidación, se debe trabajar en ambiente anaerobio. Al ser oxidadas pierden las propiedades magnéticas y de no aglomeración. Para protegerlas de la oxidación se recubren con materiales que no alteren sus propiedades magnéticas. Materiales como el oro o la sílice (dióxido de silicio) alteran las propiedades magnéticas. Por el contrario, materiales como el magnesio alteran muy poco las propiedades magnéticas y obtienen buenos resultados, aunque no ideales⁹.

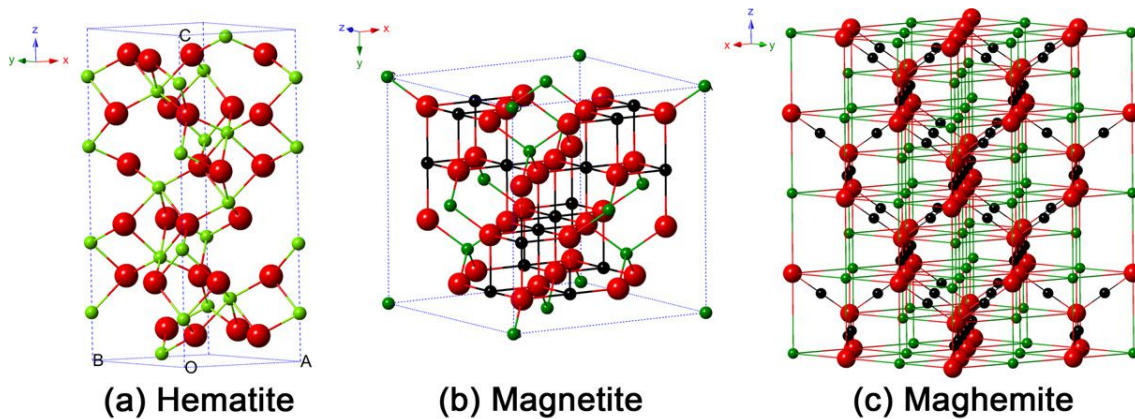


Figura 2. Estructura cristalina de hematita, magnetita y maghemita. (Color negro es Fe^{2+} , color verde es Fe^{3+} y color rojo es O^{2-})¹⁰.

Síntesis y composición.

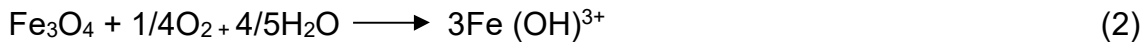
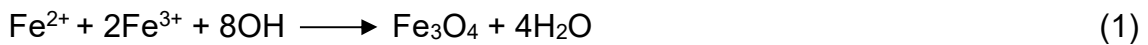
Las nanopartículas magnéticas se caracterizan por poseer un núcleo de óxido de hierro. Este núcleo posteriormente se puede recubrir con diversos materiales lo que determina su aplicación. Existen diferentes métodos de síntesis y preparación de estos núcleos para la posterior formación de nanopartículas magnéticas. En la tabla 1 se comparan las características de los métodos de síntesis principales. Éstos pueden clasificarse según su naturaleza en⁵:

1. Métodos físicos. Son procedimientos complicados que no ofrecen la posibilidad de controlar el tamaño en la escala nanométrica.
2. Métodos químicos. Son procedimientos sencillos, factibles y eficientes que permiten el control del tamaño, forma y composición. Suelen ser los mejores adaptados, teniendo un coste de producción bajo y un alto rendimiento.
3. Métodos biológicos. Son procedimientos microbiológicos, se obtienen costes bajos y alta reproducibilidad, pero consumen mucho tiempo.

Los métodos de síntesis más utilizados son los siguientes:

- Coprecipitación. Se basa en la coprecipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} junto a una base para sintetizar óxido de hierro. El tamaño, la forma y la composición depende del tipo de base, estado de oxidación del hierro, pH y fuerza iónica. En general, se sintetiza añadiendo una sal a una mezcla acuosa de clorhidrato de Fe^{2+} y Fe^{3+} con una relación molar de 1:2¹¹. Se produce la precipitación de Fe_3O_4 como

muestra la ecuación 1 y su posterior oxidación en presencia de oxígeno como muestra la ecuación 2¹².



Para prevenir la oxidación completa del Fe_3O_4 y su aglomeración se suele recubrir con moléculas orgánicas e inorgánicas, además de trabajar en un ambiente sin oxígeno. La estrategia consiste en realizar la síntesis mientras se inyecta N_2 , ya que a la vez que protege de la oxidación, reduce el tamaño de la partícula.

En un ambiente sin oxígeno la precipitación del Fe_3O_4 se puede producir a pH entre 9 y 14, manteniendo la relación molar (de Fe^{2+} y Fe^{3+})⁵.

- Microemulsión. El método de microemulsión de micela inversa (agua en aceite) es el de elección para la formación de nanopartículas magnéticas debido a que se consigue gran área interfacial, baja tensión interfacial, estabilidad termodinámica y propiedades únicas⁶. Las nanopartículas se estabilizan mediante moléculas emulgentes. Se emplean emulgentes de tipo catiónico, aniónico o no iónico. La versatilidad en el proceso de síntesis es la principal ventaja de este método. Sin embargo, como principal desventaja los residuos de tensioactivo presentan efectos adversos y dificultades para escalar los procedimientos a nivel industrial⁵.
- Método sol-gel. Se basa en la hidroxilación y condensación de precursores moleculares en solución. En primer lugar se obtiene una solución, que posteriormente se seca o se hace gel mediante solventes o reacciones químicas, obteniendo finalmente la red tridimensional del óxido¹⁰. El solvente usado es el agua pero los precursores son hidrolizados usando un ácido o una base. Al emplear una base se obtiene un gel coloidal, mientras que si se utiliza un ácido se obtiene un gel polimérico. La reacción transcurre a temperatura ambiente, pero se necesita calor para obtener el estado cristalino⁵.

- Método fase gas/aerosol. Es el método adecuado si se desea una producción elevada, continua, directa y definida de nanopartículas. Se distinguen dos tipos, el método por atomizador y por láser de pirolisis, siendo las dos técnicas eficientes⁵. En el atomizador se rocía una solución de sales de hierro en un reactor junto con la presencia de agentes reductores. El soluto se condensa y el solvente se evapora¹⁰. Posteriormente se seca el soluto. Según qué precursores de hierro se empleen se obtienen partículas de magnetita de entre 5 y 60nm con diversas formas. En el láser de pirolisis se excita un sensibilizador mediante radiación laser de CO₂, que transmite la energía a los reactantes. Se produce la reacción química y la posterior nucleación de partículas. Ambos métodos producen partículas de alta calidad, pero el rendimiento es bajo⁵.
- Método polioles. Se obtienen partículas de forma y tamaño bien controlados, alrededor de 100nm mediante hidróxido ferroso en medio orgánico. Se emplean solventes como polioles y polietilenglicol, que otorgan propiedades interesantes como poder disolver compuestos inorgánicos o trabajar en amplios rangos de temperatura debido a su alto punto de ebullición⁵. El tipo de polioles, la sal, la concentración, y otras condiciones fisiológicas afectan al tamaño, forma, crecimiento y rendimiento. El rendimiento y tamaño es dependiente a su vez de la reducción de los polioles¹⁰.
- Reacción hidrotermal. Se llevan a cabo en medio acuoso en un reactor o en un autoclave a una temperatura de más de 200°C⁶. Se deshidrata la sal de metal y debido a la baja solubilidad de los óxidos en medio acuoso se satura el medio. Se obtienen partículas con una distribución de tamaño muy estrecha, aunque requieren de un elevado tiempo para la correcta obtención y presentan un bajo rendimiento⁵. Para superar estos inconvenientes se pueden emplear radiación por microondas, la cual produce una nucleación homogénea, del mismo modo que la reacción hidrotermal. La diferencia radica en un tiempo de cristalización muy corto debido al calor uniforme de las ondas de un horno microondas¹⁰.

- **Sonolisis.** Se basa en la descomposición de precursores organometálicos. Se emplean polímeros, agentes orgánicos u otras estructuras para limitar el crecimiento. En primer lugar se mezcla una base con cloruro férrico hidratado. A continuación, se irradia con ultrasonidos y se producen alteraciones en el medio acuoso, formando burbujas⁵. Se puede llegar a 5000°C favoreciendo reacciones químicas. Con la inducción termal se obtienen nanopartículas de estructura cristalina¹⁰ mientras que con ultrasonidos se obtienen nanopartículas de estructura amorfa⁵.

Método	Síntesis	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción	Solvente	Distribución de tamaños	Control de la forma	Rendimiento
Coprecipitación	Muy simple	20-90	Minutos	Agua	Estrecha	No bueno	Alto
Microemulsión	Complicada	20-50	Horas	Agentes orgánicos	Estrecha	Bueno	Bajo
Sol/Gel	Complicada	20-200	Horas	Agua	Estrecha	Bueno	Medio
Gas/aerosol	Complicada	>100	Minutos	Agua	Estrecha	Medio	Alto
Polióles	Complicada	20-200	Horas	Agua	Estrecha	Bueno	Medio
Hidrotermal	Simple	200-250	Horas/Días	Agua/etanol	Muy estrecha	Muy bueno	Medio
Sonolisis	Muy simple	20-50	Minutos	Agua/Agentes orgánicos	Estrecha	Malo	Medio

Tabla 1. Métodos de síntesis de los principales métodos de síntesis^{5,6,10}.

Cobertura

Para dotar a los núcleos magnéticos de la necesaria biocompatibilidad y así lograr aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas se deben cumplir dos puntos importantes; la estabilidad de las partículas de magnetita en disolución y la no aglomeración. Para alcanzar estas premisas, es importante la utilización de una apropiada cobertura.

Hay dos modelos de aplicación de coberturas. La que se realiza durante la síntesis, y la que se realiza en una etapa posterior a la síntesis del núcleo. Aunque más complicada, la cobertura durante la síntesis proporciona una mayor estabilización en el tiempo y conserva mejor las propiedades magnéticas.

Las coberturas se pueden clasificar en dos grandes grupos, atendiendo a su naturaleza; orgánicas e inorgánicas.

- Cobertura orgánica. Presentan biocompatibilidad, y previenen de la aglomeración de partículas al modificar la superficie a un estado hidrofílico mediante grupos funcionales como hidroxil, carboxil, amino y aldehídos. Tres aspectos son importantes en la cobertura orgánica; las propiedades magnéticas, la biocompatibilidad y la capacidad de unión a otras estructuras como fármacos, anticuerpos, proteínas, enzimas y ADN. Las propiedades magnéticas suelen ser el factor limitante en la cobertura por tanto se buscan moléculas que alteren al mínimo esta propiedad. A su vez, las coberturas que alteran dicha propiedad suelen tener buena capacidad de unión a otras estructuras y biocompatibilidad. La figura 3 muestra estructuras posibles de las coberturas orgánicas. De acuerdo con la literatura, las coberturas orgánicas se categorizan en emulgentes, polímeros y moléculas biológicas^{6,10}.
 - Emulgentes. Son agentes activadores de superficie, permiten mejorar la biocompatibilidad, estabilidad y aseguran la no aglomeración de partículas al reducir la tensión superficial del líquido. Según su naturaleza se distinguen tensioactivos solubles en lípidos o en agua⁶.
 - Polímeros. Estabilizan las nanopartículas creando altas fuerzas de repulsión entre partículas. Se distinguen entre polímeros naturales como el dextrano o sintéticos como el polietilenglicol PEG. Ambos tipos son biocompatibles, aunque los naturales son más adecuados⁵.
 - Moléculas biológicas. Proteínas, anticuerpos y polipéptidos pueden funcionar como coberturas debido a su gran biocompatibilidad⁵. En concreto, la albumina se selecciona, con frecuencia, debido a sus excelentes propiedades¹³. El principal inconveniente que presentan en general es el notable incremento de tamaño.
- Cobertura inorgánica. Estos materiales suelen tener buena estabilidad química y propiedades multifuncionales. Sin embargo, no tienen la capacidad de unión que pueden presentar las coberturas orgánicas⁶.

- Metálica. El oro, la plata, el cobre, el platino, el paladio o el hierro son los principales materiales de cobertura que protegen y mejoran las propiedades magnéticas de las partículas de óxido de hierro. A diferencia de otros materiales, el material metálico no aumenta mucho el diámetro tras la cobertura^{6,10}.
- Cerámica. Poseen excelentes cualidades en cuanto a estabilidad térmica, química y funcionalidad. Además, son biocompatibles y no se aglomeran. Se emplea el carbón o la sílice. La cobertura con sílice es relativamente fácil de realizar y tiene un coste bajo, pero incrementa el tamaño y aumenta la distribución de tamaño de las estructuras⁶.

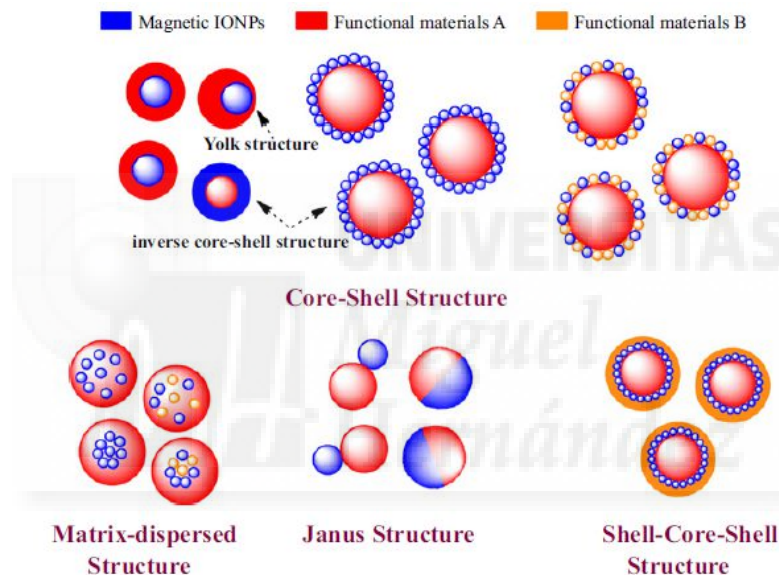


Figura 3. Posibles estructuras resultantes de diferentes coberturas de nanopartículas magnéticas¹⁰.

Aplicaciones

Debido a las interesantes propiedades magnéticas de los óxidos de hierro y la funcionalidad de las coberturas, las nanopartículas magnéticas son objeto de estudio e interés debido a su potencial para ser aplicadas en diferentes campos. En la agricultura, se están desarrollando productos a escala nanométrica como nanofertilizantes, nanofungicidas, o nanotubos de carbón para incrementar la producción de la cosecha. Se emplean nanopartículas de hierro como agente profertilizante para las semillas. Son procedimientos seguros, que permiten reducir la dosis utilizada en comparación con productos químicos y no dejan residuos en el suelo^{14,15}.

Asimismo, se están utilizando nanopartículas magnéticas en control medioambiental, siendo útiles en la detección y monitorización de la polución¹⁶. También es interesante la producción de agua potable mediante el tratamiento con las nanopartículas magnéticas. En este caso se utilizan para crear una barrera permeable con capacidad de adsorción que permite la eliminación de los contaminantes¹⁷.

En otros campos como la construcción, la automoción, defensa o aeronáutica, las nanopartículas magnéticas tienen un gran abanico de posibilidades trabajando como sensores, aditivos, coberturas¹⁸, o formando parte de láminas fotovoltaicas generadoras de electricidad o energía térmica¹⁹.

Las aplicaciones biomédicas están siendo muy productivas y tienen gran potencial debida a sus propiedades de biocompatibilidad, y no aglomeración que permiten su aplicación en multitud de situaciones clínicas. Algunas de las más destacadas son: el marcado, identificación y separación celular, la reparación de tejidos, y soluciones contra enfermedades del sistema muscular u otras que cursan con inflamación. También se están intentando emplear para el tratamiento del cáncer, el virus de la hepatitis B, el virus de la gripe, agentes antirretrovirales o para prevenir el envejecimiento de la piel^{5,20}.

Una de las aplicaciones más relevantes relacionada con la terapéutica es la hipertermia en el tratamiento de tumores. En este método, el tejido afectado o las células tumorosas se calientan localmente hasta su destrucción. Dependiendo de la fuente que genera el calor, se pueden diferenciar técnicas eléctricas, ópticas o magnéticas. La intensidad del calor generado y la precisión donde actúa son los factores clave a tener en cuenta en este proceso. La técnica magnética es la más adecuada debido a estos dos factores. Durante el proceso, las partículas son inyectadas en el torrente sanguíneo, y posteriormente dirigidas a la localización del tumor mediante campos magnéticos de corriente continua. Posteriormente se aplican campos magnéticos de corriente alterna para generar calor hasta los 42°C aproximadamente, donde los procesos enzimáticos que mantienen las células vivas se destruyen²¹.

Para poder comparar y determinar que materiales son más apropiados para la generación de calor, se creó una unidad de medida por volumen llamada

“specific loss power” (SLP). Cuanto más SLP genera una partícula más adecuada es. SLP depende de varios factores como el tamaño de partícula, distribución, anisotropía y superficie. Las partículas más pequeñas generan menos calor. Como en otros métodos anteriormente mencionados, la biocompatibilidad juega un papel muy importante en esta aplicación. Existen materiales como CoFe_2O_4 con una alta SLP, pero debido a su incompatibilidad biológica no son aptos. De nuevo, los óxidos de hierro y especialmente las nanopartículas de magnetita son excelentes candidatas por su biocompatibilidad, propiedades magnéticas y estabilidad química. Además, la utilización de diferentes coberturas como cerámica, polímeros, emulgentes y biomoléculas modifican su superficie y mejoran sus propiedades^{22,23}.

Es un método que está relacionado con los sistemas de administración dirigida de fármacos, ya que se requiere de esa selectividad para su finalidad y se puede complementar con técnicas de diagnóstico por imagen. La presencia de nanopartículas magnéticas es la responsable, por tanto, de causar hipertermia dirigida, y los efectos adversos utilizando esta estrategia se reducen considerablemente. Estudios *in vivo* avalan el efecto de la hipertermia magnética en la disminución del volumen de tejido tumoral, en concreto, el realizado mediante liposomas magnéticos catiónicos en hámster con osteosarcoma²⁴.

Las aplicaciones biomédicas que más han progresado y también son más interesantes están relacionadas con la mejora de técnicas de diagnóstico por imagen como la resonancia magnética o su uso como sistemas de administración dirigida de fármacos. La información sobre dichas aplicaciones se detalla en el apartado de resultados.

3. OBJETIVOS

La administración dirigida de fármacos pretende liberar el fármaco selectivamente a un tejido o célula deseada. Las nanopartículas de magnetita en concreto presentan cualidades idóneas como biocompatibilidad, dispersabilidad y capacidad de unión a otras estructuras. Estas partículas se utilizan como portadores o vectores y pueden ser movilizadas mediante campos magnéticos

externos. De esta manera existe una menor pérdida de fármaco, una mayor concentración del mismo en el sitio de acción y una disminución de los efectos adversos en el organismo.

El trabajo de fin de grado pretende cumplir con los objetivos de:

-Realizar una revisión bibliográfica sobre la administración dirigida de fármacos mediante nanopartículas magnéticas y su impacto en las enfermedades cardiovasculares.

-Analizar las posibilidades que ofrecen las nanopartículas magnéticas frente a las limitaciones de las actuales técnicas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

4. MATERIALES Y MÉTODO

La revisión bibliográfica se ha realizado empleando la base de datos Medline, mediante el buscador PubMed.

La ecuación de búsqueda se ha generado mediante múltiples combinaciones de los siguientes descriptores: “cardiovascular disease”, “drug delivery system”, “magnetite nanoparticle”, “nanoparticle”,

Los filtros utilizados han sido: “free full text”, y en ocasiones “humans” y “review” para acotar la búsqueda, ya que existe un gran número de artículos relacionados con el tema.

A través de los artículos más relevantes, se ha accedido a otros artículos citados en las referencias de éstos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años el número de artículos relacionados con las nanopartículas magnéticas y sus aplicaciones está aumentando de manera exponencial. La figura 4 muestra el crecimiento del número de publicaciones en esta área según la base de datos PubMed. Se entiende, por tanto, que es un tema de interés e impacto en la actualidad científica.

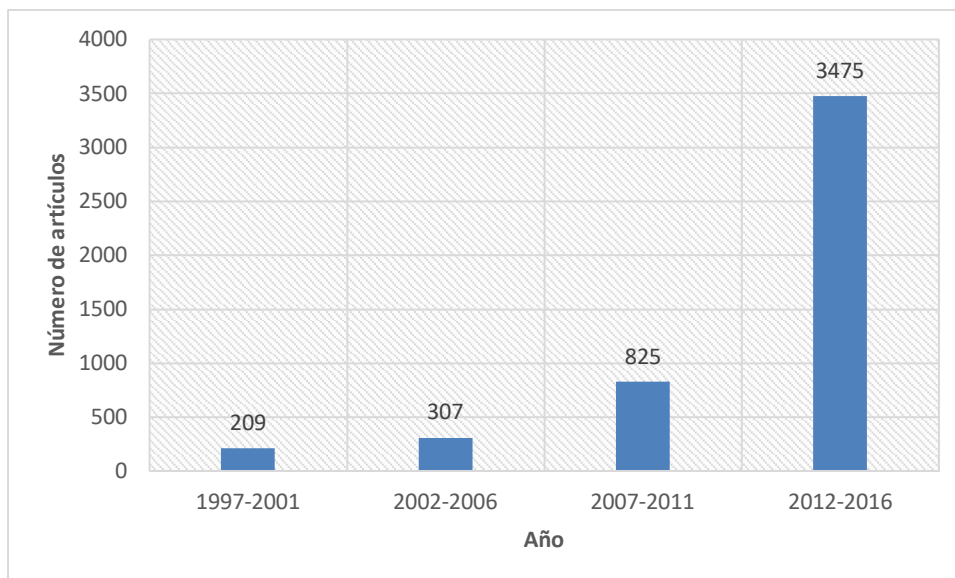


Figura 4. Número de artículos relacionados con las nanopartículas magnéticas basado en la base de datos PubMed²⁵.

Las características imprescindibles para las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas son la ausencia de toxicidad y la biocompatibilidad. A partir de estas premisas básicas, son muchos los factores que pueden afectar a la funcionalidad y efecto de las estructuras en sí mismas y en el organismo vivo. La toxicidad depende de la propia naturaleza tanto del material responsable del magnetismo, óxidos de hierro generalmente, como del tamaño final de la estructura incluyendo las coberturas. También es importante que los materiales presenten una adecuada magnetización que les permita ser controlados a través del torrente sanguíneo mediante campos magnéticos externos. En situaciones donde el tiempo de retención en sangre es elevado, la biodistribución y biodegradación adquiere una gran relevancia. El tamaño, la forma y las coberturas determinan la distribución biológica en el organismo y la interacción, deseada o no, con otros tejidos o células²⁶.

Estudios en farmacocinética, biocompatibilidad y biodistribución en animales sugieren el bazo, hígado y riñón como localización más probable de encontrar nanopartículas de hierro, siendo el bazo e hígado los tejidos que presentan mayor acumulación²⁷. Tras ejercer su función la opsonización a través de los macrófagos del hígado es una de las vías más importantes de eliminación de las nanopartículas magnéticas. Se ha probado que, tras 6 horas de una inyección

con nanopartículas de hierro, más del 50% se concentra en el hígado. La alta permeabilidad de las partículas de hierro y la vascularización son responsables de su absorción por el sistema reticuloendotelial y los macrófagos²⁸.

La degradación de partículas de hierro puede aumentar los niveles de hierro en los órganos, los cuales están regulados por la ferritina y la transferrina. El contenido promedio de hierro en un hombre adulto es de unos 5 gramos de hierro, y se presenta en forma de hemoglobina (65%), mioglobina (4%), transferrina (0.1%) y ferritina (15-30%). La hemoglobina y la mioglobina forman complejos proteicos encargados del transporte del oxígeno. La semivida de estos es de unos 120 días. Tras ese tiempo, se degradan en el bazo, aumentando el contenido de hierro. Los macrófagos metabolizan la hemoglobina en ferritina que se almacena en los hepatocitos o bien, se transforma en transferrina, la cual es útil en la síntesis de nueva hemoglobina en la médula ósea. La capacidad de excreción de hierro del organismo es muy limitada. Las pérdidas diarias de hierro son de 0,9-1,5 mg/día (0,013 mg/kg/día) en los hombres adultos. De éstos, 0,35 mg se pierden en la materia fecal, 0,10 mg a través de la mucosa intestinal (ferritina), 0,20 mg en la bilis, 0,08 mg por vía urinaria y 0,20 mg por descamación cutánea²⁹.

Se cree que la degradación de partículas de óxido de hierro ocurre, a nivel molecular, de manera similar a la ferritina la cual actúa como depósito de hierro. El sistema reticuloendotelial degrada las partículas de hierro administradas que tengan un tamaño mayor de 15 nm³⁰. Nissim y Robson³¹ y Richter³² relacionaron la biodegradación de partículas de óxido de hierro junto con el papel de la ferritina y transferrina en la biodistribución de los productos de degradación al observar un notable incremento de la ferritina en los macrófagos del bazo tras la inyección de partículas de hierro.

5.1. Diagnóstico Cardiovascular

Muchas enfermedades cardiovasculares se caracterizan por presentar una respuesta inflamatoria que pone en marcha complejos mecanismos de reparación tisular. Algunos ejemplos pueden ser: aterosclerosis, infarto de miocardio o paro cardíaco. Los macrófagos son los mediadores de este proceso

de inflamación, iniciando tanto la destrucción como el proceso de regeneración³³. Cuantificar y caracterizar la actividad de los macrófagos puede ayudar a entender la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y la eficacia de posibles futuras intervenciones. Un diagnóstico preciso y la toma de decisiones posterior es crucial en la estratificación del riesgo, la terapéutica y la monitorización. Para poder diagnosticar, la medicina se apoya en técnicas de imagen. La resonancia magnética, en concreto, proporciona información morfológica y funcional de los tejidos para el diagnóstico y validación de enfermedades cardiovasculares³⁴.

Imagen por resonancia magnética. En comparación con otras técnicas como la tomografía computerizada, la tomografía de emisión de positrones o radiografía, la resonancia magnética es el dispositivo más adecuado para la investigación de tejidos diferentes entre sí. La principal ventaja que ofrece la resonancia magnética es la diferenciación de tejidos blandos como músculo, sangre o venas y la detección de densidad de cada tejido.

Su mecanismo de detección se basa en la alineación de los spines no pareados en los tejidos cuando se exponen a un campo magnético. Los spines se miden a través de átomos de hidrógeno presentes en las moléculas de agua del tejido. Esto es posible porque la mayoría de los tejidos del cuerpo humano contienen más de un 70% de agua. De esta manera obtenemos un gran número de átomos de hidrogeno que reaccionan alineando el spin al aplicar un campo magnético. Cuando el campo cesa, los spines vuelven a la posición inicial. Mediante esta diferencia de alineación, llamada tiempo de relajación, se forman las imágenes. Existen dos tiempos de relación, uno asociado a la relajación longitudinal del spin, y otro asociado a la relajación transversal. Para mejorar y realzar la imagen, se añaden habitualmente agentes de contraste. Estos agentes están formados por materiales con propiedades magnéticas, generalmente compuestos de gadolinio, y aumentan el número de spines que reaccionan al campo externo, aumentando el contraste en la imagen, reduciendo el tiempo de relajación y por tanto, mejorando la calidad del diagnóstico por imagen.

Los agentes de contraste se pueden clasificar en dos tipos, los positivos y los negativos. Los positivos aumentan la intensidad del tiempo de relajación longitudinal como por ejemplo materiales que contienen gadolinio. Los negativos en cambio reducen el tiempo de relajación transversal como las nanopartículas de óxido de hierro⁶.

Los agentes de contraste basados en gadolinio se emplean habitualmente. En términos generales son seguros, no obstante, las reacciones adversas pueden ser graves si no se tratan inmediatamente cuando aparecen, dando lugar a nefrotoxicidad y/o fibrosis sistémica. Son paramagnéticos, no se unen a proteínas plasmáticas y no son lipófilos, lo cual hace que tras una inyección en el torrente sanguíneo haya una buena distribución y equilibrio en el espacio extracelular. Son moléculas pequeñas y pueden atravesar rápidamente el espacio vascular, pero no pueden atravesar ni la barrera hematoencefálica ni la membrana celular. Por lo que cuando atraviesan el espacio vascular se quedan en el espacio intersticial. Su eliminación del organismo se basa en el filtrado glomerular, no se metabolizan. En pacientes con función renal normal, se elimina cerca del 98% por orina en las primeras 24 horas⁴⁰.

La extravasación y redistribución posterior se utiliza para identificar espacios extracelulares mediante la resonancia magnética. Estos agentes de contraste son comúnmente utilizados en el infarto de miocardio para identificar fibrosis y las zonas de tejido infartado. El gadolinio difunde inter e intracelularmente tras el edema y la rotura de la membrana celular³⁵. Los agentes de gadolinio aprobados y disponibles en Europa a fecha de 2014 clasificados según su patrón de distribución tras la inyección se recogen en la tabla 2.

<p><u>Extracelulares</u> (no específicos)</p>	<p>Gadopentetato de dimeglumina (Gd-DTPA), Gadoteridol(Gd-HP-DO3A), Gadodiamida (Gd-DTPA-BMA), Gadoterato meglumina (Gd-DOTA), Gadobutrol (Gd-BT-DO3A), Gadoversetamida</p>
<p><u>Mixtos</u> (extracelular/hepatobiliar)</p>	<p>Gadoxetato disódico (Gd-EOB-DTPA), Gadobenato de dimeglumina (Gd-BOPTA)</p>

<u>Intravascular</u>	Gadofosveset trisódico
----------------------	------------------------

Tabla 2. Clasificación de los distintos contrastes de gadolinio según su distribución. (Gd: gadolinio)⁴⁰.

En cambio, los agentes de contraste basados en nanopartículas de óxido de hierro, y en concreto, con un diámetro menor a 50 nm pueden ser absorbidas por las células inflamatorias antes de la rotura de la membrana, es decir son capaces de atravesar la membrana celular. Tienen especial interés para poder diagnosticar precozmente, ya que como se ha mencionado anteriormente, numerosas enfermedades cardiovasculares comienzan con mecanismos iniciales de inflamación. Estas propiedades permiten detectar y señalar la inflamación tisular desde dentro del propio tejido, no desde el espacio intersticial, empleando la resonancia magnética³⁶. Algunos ejemplos de este tipo de nanopartículas se recogen en la tabla 3.

Cobertura	Ejemplos	Tamaño (nm)	Observaciones
Carboximetil-dextrano	Ferumoxytol (Feraheme™)	17-31	FDA, aprobado para anemia y uso clínico
carboxidextrano	Ferucarbotran (SHU 555 A, Resovist®)	45-60	Aprobado por FDA. Suspendido en uso clínico desde 2009
Dextrano	Ferumoxtran (USPIO, AMI-227, NC100150, BMS-180549)	17-21	Suspendido tras 37 ensayos clínicos fase I-III en 2010
Dextrano	Ferumoxides (Feridex™)	100	Suspendido en uso clínico desde 2008
Dextrano (Crosslinked)	CLIO-Cy5.5	30-35	Uso experimental
Citrato	VSOP-C184	4-7	Uso experimental, estudio clínico fase I en 2004

Tabla 3. Ejemplos representativos de agentes de contraste basados en óxidos de hierro. (CLIO: Cross linked iron oxide/ VSOP: Very small oxide particle)⁴⁶.

La comparación entre compuestos con gadolinio y nanopartículas basadas en óxido de hierro puede realizarse a simple vista en las imágenes obtenidas por resonancia magnética.

En un estudio publicado por Moon et al⁴⁷, se compararon distintos procedimientos de imagen por resonancia magnética para diagnosticar de forma no invasiva miocarditis autoinmune inducida en modelos de roedores. Se emplearon diversas técnicas como análisis de histopatología del tejido miocárdico, microscopia fluorescente, hematoxilina y eosilina e inmunoquímicas tanto en el grupo control como en el grupo de miocarditis inducida con el fin de asegurar la inflamación. Se tomaron varios grupos de animales con el fin de explorar diversos aspectos. En uno de los ensayos se comparó el uso de gadolinio frente a nanopartículas de óxido de hierro con cobertura de sílice y rodamina-isotiocianato que otorga fluorescencia. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 5. Cabe mencionar que las imágenes de óxido de hierro tienen contraste negativo si se compara con las de gadolinio, es decir, aparecerán como manchas oscuras. Los resultados mostraron que las imágenes tomadas con resonancia magnética junto con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro detectaron nuevas zonas inflamadas del miocardio que no eran evidentes en las imágenes obtenidas con compuestos de gadolinio. La inflamación de estas zonas se corroboró mediante estudios histológicos. Se encontraron áreas de contraste negativo en el grupo de nanopartículas de óxido de hierro en el análisis de hematoxilina y eosina, mostrando focos de inflamación, áreas con macrófagos en pruebas inmunoquímicas y señales derivadas de nanopartículas en microscopia fluorescente, lo que demuestra que el empleo de nanopartículas magnéticas aumenta la precisión del diagnóstico por imagen.

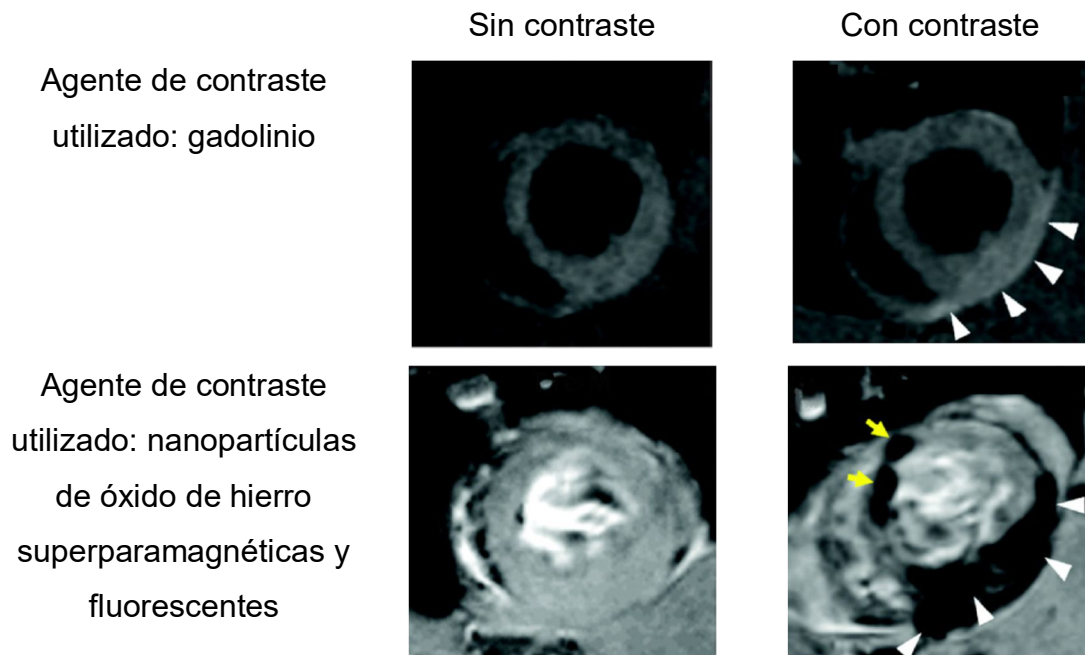


Figura 5. Comparativa de imagen de resonancia magnética entre agentes de contraste basados en gadolinio u óxido de hierro. Imágenes de miocarditis inducida en roedor. Las flechas blancas muestran lesiones inflamatorias que ambos contrastes revelan. Las flechas amarillas muestra lesiones inflamatorias que no revela el gadolinio.

En estudios como el de Martín-Giménez et al⁵¹, se concluye que la etiología de la enfermedad aterosclerótica estaría determinada por factores como el estrés oxidativo, la inflamación, el daño del ADN mitocondrial y de las células endoteliales vasculares. Pero, además, este trabajo también ha sugerido que la exposición a nanopartículas podría potenciar estos factores desencadenantes y acelerar la progresión de la enfermedad al aumentar la agregación plaquetaria y la trombosis vascular. Por tanto, aunque dichas partículas resultan ser herramientas prometedoras como vehículos de administración de fármacos dirigidos a tratar la aterosclerosis, también se debe prestar atención a sus efectos adversos. No obstante, la mayoría de polímeros utilizados en el campo de la medicina son biocompatibles.

Diagnóstico dirigido

El proceso de absorción celular se produce por varios mecanismos. La fagocitosis y endocitosis mediada por receptores son importantes en partículas grandes, mientras que la pinocitosis lo es para partículas pequeñas. La

capacidad de absorción de los macrófagos también depende del tamaño, además de la superficie de la partícula. Las nanopartículas de hierro pueden jugar con ambas premisas. Cuanto más pequeñas sean las partículas, menos reconocidas son por las células fagocíticas y pueden permanecer en circulación durante más tiempo. El gadolinio tiene una semivida de 1.5 horas aproximadamente, la cual es insuficiente para situaciones que requieran una larga retención de agentes de contraste. Las nanopartículas de óxido de hierro pueden llegar a tener una semivida de meses, abriendo nuevas posibilidades. El hecho de que los agentes de contraste negativos, basados en partículas de óxido de hierro, puedan ser absorbidas por macrófagos antes de una rotura celular, brinda la oportunidad de poder utilizarlos como localizadores o marcadores de diferentes células o partículas con el fin de poder realizar un seguimiento de las mismas antes de presentar lesión y obtener más información que con los agentes de contraste habituales, basados en compuestos de gadolinio.

Las arterias con riesgo de acumular placas de ateroma, que se pueden desprender de la pared del vaso, contienen un gran número de células inflamatorias entre las que se incluyen macrófagos. Por tanto, poder cuantificar estos macrófagos tiene una gran importancia como marcador. En un estudio reciente⁵⁰, se confirmó que la combinación de partículas de óxido de hierro superparamagnéticas unidas a células endoteliales, y con la ayuda de la resonancia magnética pueden ser utilizadas para detectar placas de ateroma. En concreto, este método es igualmente apropiado tanto para detectar placas de ateroma inestables como para identificar las de nueva formación debido a que en ambas es común la presencia de macrófagos activos en la lesión del endotelio. Con la resonancia magnética se consigue un seguimiento sensible de detección y cuantificación de partículas de óxido de hierro en el interior de la placa tras ser inyectadas en el torrente sanguíneo. Cuando las partículas de óxido de hierro son absorbidas por los macrófagos, el superparamagnetismo produce una falta de homogeneidad al aplicar el campo magnético, y por ello los diferentes componentes de la placa de ateroma (colesterol, calcificación, tejido

fibroso y trombosis) se pueden identificar debido a sus características señales específicas en resonancia magnética.

Al inyectarse en el torrente sanguíneo, las nanopartículas se pueden absorber en cualquier zona irrigada del cuerpo. Según un estudio realizado por Weissleder et al⁴⁶, las nanopartículas de óxido de hierro con cobertura de dextrano son principalmente absorbidas por monocitos circulantes o macrófagos residentes en el hígado, bazo, médula ósea o nódulos linfoides. La figura 6 muestra la absorción de nanopartículas de óxido de hierro por células mononucleares en sangre periférica. Además de ello, Weissleder concluyó que el patrón de biodistribución de las partículas en los diferentes órganos está determinado por el tamaño de las mismas.

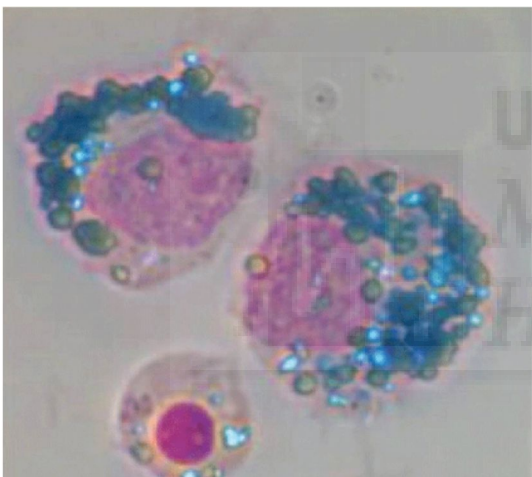


Figura 6.
Ejemplo de absorción de nanopartículas de óxido de hierro por células mononucleares. Coloración en rojo de macrófagos y azul prusiano de las nanopartículas⁴⁶.

Como se ha comentado anteriormente la semivida de las partículas de óxido de hierro es mucho mayor que la de los compuestos de gadolinio. Blocki et al³⁷ utilizaron nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro unidas a células madre del mesénquima, todo ello encapsulado en microcápsulas de colágeno, para hacer un seguimiento de las células mediante resonancia magnética tras una inyección intramiocárdica. Las células presentaron una liberación progresiva de las microcápsulas, y éstas continuaron emitiendo una señal visible mediante resonancia, durante semanas. En otro estudio³⁸, se encapsularon células adiposas derivadas de células madre en magnetocápsulas. Con este término se denominan las microcápsulas de membrana semipermeable marcadas con Endorem (suspensión de nanopartículas de óxido de hierro

superparamagnéticas). El resultado obtenido en los ensayos fue un gran aumento del tiempo de retención y una gran viabilidad de estas células localizadas en el miocardio.

Otro grupo de trabajo investigó la posibilidad de utilizar agentes de contraste biológicamente vivos. Santoso et al⁵², propusieron el uso de “Magnelle, Bell Biosystem, SF,CA”, un derivado de bacteria magnética para el marcado de células madre. Los datos preliminares mostraron que este nuevo método de contraste es robusto y seguro para la viabilidad de las células. El nuevo agente de contraste se elimina en una semana tras la muerte celular, mientras que el control (óxido de hierro) permanece hasta más de dos semanas tras la muerte celular, pudiendo tener más posibilidades de provocar estrés oxidativo y lesiones.

La carga superficial de las nanopartículas magnéticas tiene también una gran influencia en el tiempo de circulación sanguíneo. Las coberturas de polímeros están cargados positivamente y tienden a unirse de forma inespecífica a las membranas celulares, mientras que coberturas con carga negativa o sin carga, poseen, en comparación, tiempos de circulación en sangre mucho mayores. Esta variación de la carga en la superficie de la nanopartícula magnética hace capaz su manipulación con tiempos de circulación que varían desde 1 minuto hasta 3 horas⁵⁵.

Las nuevas investigaciones se centran en el uso de células marcadas con *reporter* genes. La idea es que mediante la recombinación del ADN, se puedan intercalar genes que son bien controlados y que expresan una característica que puede aportar alguna ventaja para el marcado, como por ejemplo genes que codifican para una proteína fluorescente. Las aproximaciones más utilizadas se centran en la integración y subsecuente expresión de genes controladores del hierro, como por ejemplo los receptores de la transferrina o la ferritina. Estos péptidos o antígenos de membrana se unen de manera específica a nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas y el cambio químico de

saturación del *reporter* a la magnetización produce contraste que puede medirse⁵³.

Campan et al⁵⁴, usaron la cadena pesada de la ferritina humana como *reporter* gen para hacer seguimiento de células madre en ratones con infarto de miocardio. La imagen por resonancia magnética demostró que este sistema es capaz de seguir la replicación y diferenciación de estas células, así como posibles alteraciones que puedan surgir en el músculo cardiaco.

Además de las anteriormente mencionadas, las partículas magnéticas presentan como ventaja una gran compatibilidad biológica en comparación con los otros agentes, ya que pueden estar cubiertas con materiales que les confieran mejores propiedades. Las nanopartículas que actúan como agentes de contraste actualmente están cubiertas de polímeros y macromoléculas como el dextrano, ácido cítrico y cadenas de carbohidratos, las cuales presentan un alto grado de biocompatibilidad⁶.

5.2. Tratamientos

La aplicación de nanopartículas magnéticas en el tratamiento de patologías cardiovasculares ofrece nuevas posibilidades en la terapia dirigida.

Los sistemas de administración dirigida de fármacos son dispositivos que permiten el movimiento y distribución del fármaco en el cuerpo de forma controlada para dirigirlo a localizaciones concretas.

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas de administración que modifican la permeabilidad y retención del fármaco en los tejidos en función de la diferencia de tamaño con la partícula. Esta estrategia denominada vectorización pasiva, aunque prometedora tiene algunos inconvenientes y limitaciones. Algunas de éstas son por ejemplo el gran tiempo de espera para que el fármaco llegue a la diana o que la concentración de fármaco es relativamente baja.

Como alternativa, la vectorización activa de fármacos mediante nanopartículas magnéticas puede mejorar estos inconvenientes. Cuando las nanopartículas magnéticas actúan de portadores, se inyectan en la circulación sanguínea, y

posteriormente se aplica un campo magnético externo, que crea un gradiente magnético en los sitios diana, permitiendo que se alcancen elevadas concentraciones de fármaco en localizaciones puntuales. La figura 7 esquematiza el procedimiento. Las aplicaciones de esta técnica están relacionadas tanto con la movilización de fármacos como células madre o genes, con el objetivo de intentar dar solución a patologías como el cáncer o recuperar tejidos dañados.

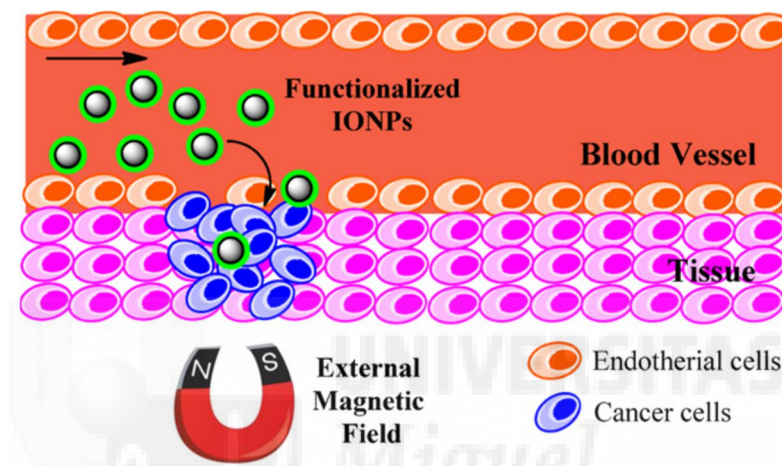


Figura 7. Esquema de retención de nanopartículas. (IONPs: Iron Oxide Nanoparticles)¹⁰.

El tamaño es un parámetro fundamental para el uso de nanopartículas magnéticas. Cuanto más pequeña sea la partícula, mejor se puede mover por el torrente sanguíneo y es menos probable que las detecte el sistema inmune, por lo tanto, su tiempo de retención en sangre aumenta. Además, el tamaño debe ser el adecuado para que presenten un adecuado comportamiento magnético y puedan ser dirigidas. Si el diámetro es menor de 10 nm extravasan rápidamente y se eliminan vía renal. Por tanto, las nanopartículas de óxido de hierro entre 10 y 100 nm presentan el tamaño óptimo para inyectarlas en el torrente sanguíneo ya que poseen un mayor tiempo de circulación en sangre para poder ejercer su función¹⁰.

Las principales ventajas de los sistemas de administración dirigida de fármacos incluyen: disminución de los efectos adversos, incremento de la eficacia terapéutica debido a la reducción de la pérdida de fármaco, posibilidad de poder trabajar junto otros métodos complementarios como la resonancia magnética o

la hipertermia y presentar nuevas capacidades de modificación como mecanismos de liberación termal. Las nanopartículas de hierro son excelentes candidatas para este método al cumplir con todas las características descritas. La formulación es fundamental para adaptar las nanopartículas magnéticas en función del sitio requerido de actuación. Además, se pueden emplear otros portadores que engloben el complejo fármaco-partícula magnética como pueden ser cápsulas o liposomas. Estos sistemas encapsulados presentan beneficios como mayor capacidad de carga de fármaco, mejor biocompatibilidad y una más adecuada estabilidad química y biológica.

Una de las aplicaciones que más llama la atención de cara al futuro es el uso de estos sistemas de administración dirigida con formulaciones de genes o células madre para conseguir, por ejemplo, la recuperación del tejido cardíaco tras un infarto. Lo que se pretende es crear una retención de células madre donde se necesite. Mediante las partículas magnéticas se dirigen y se produce la acumulación en el tejido diana.

Zhang et al⁴² comprobaron la capacidad del campo magnético para la traslación y administración localizada de formulaciones con genes. Se realizó un experimento parecido al de Cheng, induciendo isquemia en ratones. La formulación se componía de vectores virales cargados con genes humanos del factor de crecimiento endotelial vascular o con partículas fluorescentes y conjugados con partículas superparamagnéticas. Los resultados obtenidos indicaron que la atracción magnética se podía realizar con éxito. Además 7 días después del infarto de miocardio se observó un aumento en la expresión génica, indicando que el sistema de administración dirigida con genes es capaz de alterar la distribución de genes en vivo y su expresión en todas las partes del cuerpo.

La terapia trombolítica que se utiliza tras el infarto de miocardio utiliza estreptoquinasa y activador del tejido plasminógeno como medicamentos para disolver los trombos sanguíneos. Un estudio publicado en la revista internacional de farmacéuticos⁵⁶ estudió el uso de nanopartículas magnéticas como vectores

para estas moléculas en sistemas de liberación dirigida. Se utilizó sílice como cobertura de los núcleos de óxido de hierro y métodos de síntesis de precipitación e hidrotermal. Las dos moléculas se encapsularon por medio de agentes estabilizantes ricos en 3-aminopropiltrimetoxisilano alrededor de la nanopartícula ya formada. Inicialmente se determinaron *in vitro* las condiciones ideales para la utilización de estas nanopartículas y posteriormente se compararon los resultados de la técnica habitual con los resultados de la nueva formulación con y sin aplicar un campo magnético, también *in vitro* con sangre humana. Mediante dicha formulación se redujo el tiempo de lisis de coágulos en un 38% cuando se aplicaba un campo magnético. Como conclusión a este estudio, los autores aportan que el desarrollo de estos vectores podría estar ya preparado para su utilización en la medicina y se espera que mejore el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Recientemente, Cheng et al⁴⁴ ensayaron una nueva formulación, nombrada “activador magnético celular biespecífico”. Se trata de dos anticuerpos diferentes unidos a la cobertura de partículas de ferumoxitol para unirse al tejido dañado y a su vez captar las células madre endógenas que están en circulación. El estudio se planteó también para la reparación del tejido del miocardio tras infarto inducido en roedores. De este modo se asegura una retención de células madre en el sitio requerido y a su vez se pueden obtener imágenes con marcadores fluorescentes. La figura 8 muestra un esquema de las interacciones entre las partículas. Se utilizó un campo magnético de 1.3T durante 10 minutos tras la inyección intravenosa de la formulación. Tras 24 horas se realizaron imágenes de resonancia magnética que revelaron un aumento significativo en la pared anterior izquierda del ventrículo. Cuatro semanas después se volvieron a analizar mediante microscopía y se constató que el número de células madre endógenas había aumentado casi el doble tras el marcado magnético.

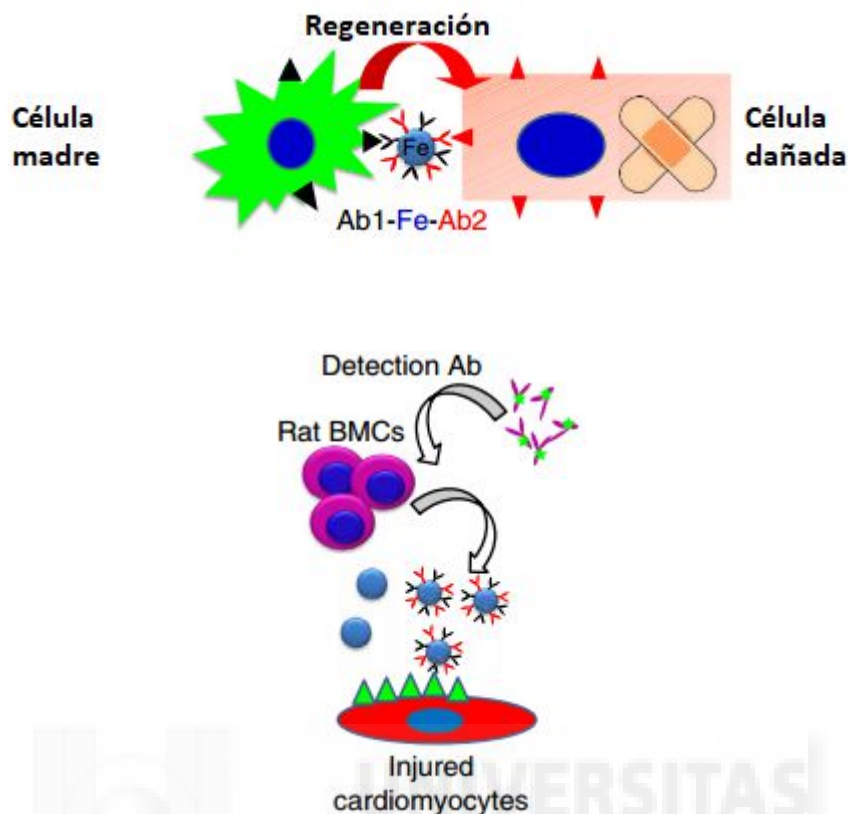


Figura 8. Esquema del mecanismo de acción del “activador magnético celular biespecífico” (Ab1: anticuerpo 1/ Fe: hierro/ Ab2: anticuerpo 2/ BMC: células mononucleares medula ósea/ isotiocianato fluorescente para la detección.

Aunque se han estudiado muchas rutas y compuestos, el uso de nanopartículas magnéticas para el tratamiento del infarto de miocardio es aun limitado, debido a que no se ha conseguido determinar las condiciones óptimas para conseguir la máxima acumulación de células madre en el sitio marcado como diana. Cheng et al ⁴¹ fueron los primeros en observar y describir este fenómeno. En su estudio utilizaron células cardíacas a partir de células madre, marcadas con fluorocromo y ligado a microesferas superparamagnéticas de óxido de hierro de un tamaño de 0,9 micrómetros. Se estudió en ratas que padecían de infarto agudo de miocardio tras inducirles una isquemia. El procedimiento comenzó con la inyección intramiocárdica de la formulación y se aplicó un campo magnético con un imán de 1.3T de potencia cerca del ápex del corazón durante 10 minutos. En seguida se observó que la decoloración del tejido recuperó color, manifestando la retención. Al día siguiente se confirmaron los resultados mediante estudios histológicos. Una imagen por fluorescencia reveló que las células marcadas se extendieron a pulmón y bazo en el grupo de ratas que no recibieron la

formulación ni el campo magnético. Los análisis de la PCR mostraron una retención tres veces superior en el grupo que recibió la formulación y el campo magnético. Los autores concluyeron que la aplicación de 10 minutos de campo magnético era suficiente para aumentar la retención de células a corto plazo. Estos estudios se confirmaron con estudios posteriores por el mismo grupo⁴³, pero esta vez aplicando campos magnéticos, de forma constante o a intervalos, de hasta 6 horas de duración. Los resultados obtenidos mostraron que la retención aumentó en menor grado en las aplicaciones de campos magnéticos de mayor duración y que las condiciones de las ratas empeoraban si se realizaban en intervalos de larga duración.

Los principales retos para la aplicación eficaz de esta técnica son incrementar la concentración de fármaco o células madre en el miocardio, así como controlar de manera más precisa los procesos de extravasación y dilución en células adyacentes tras los procesos de división celular. En segundo lugar, habría que mejorar la precisión de la técnica para que permita distinguir entre células viables y no viables. Huang et al⁴⁸ demostraron que las señales obtenidas mediante resonancia magnética procedían en parte de partículas de hierro extracelulares. Estas partículas se habían separado de las células madre a las que estaban unidas en la formulación. Además, se combinó con la falta de aclaramiento del hierro en el miocardio, pudiendo provocar a largo plazo un estrés oxidativo en el miocardio que puede afectar a la viabilidad de las células. En ese sentido, Yao et al⁴⁹ utilizaron nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro unidas a células endoteliales progenitoras para ser inyectadas en el miocardio de roedores. La resonancia magnética confirmó la presencia de estas células en el lugar de la inyección 10 días después y la señal continuó hasta dos meses más. Sin embargo, este aumento en la señal se debía en parte, como en el estudio anterior, a macrófagos que habían absorbido las partículas junto con las células, haciéndolas inservibles. Se concluyó, entonces que no resulta adecuado monitorizar la viabilidad de las células madre a través de la intensidad de la señal recibida sino que es necesario encontrar estrategias alternativas.

En conclusión, aunque se han logrado grandes avances y se han conseguido resultados prometedores, aun se necesitan más estudios para determinar la eficacia de la terapia con células madre para la regeneración del tejido.

6. VALORACIÓN CRÍTICA

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo, cualquier investigación enfocada a mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento tiene gran repercusión. Una vez finalizada la revisión bibliográfica se ha podido concluir que el uso de nanopartículas de óxido de hierro en sistemas de administración dirigida de fármacos tiene aplicaciones reales que se están empezando a utilizar así como otras potenciales que hay que optimizar en futuras investigaciones sobre el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Los métodos de síntesis y cobertura desarrollados hasta el momento son capaces de ofrecer una síntesis de partículas controlada. Los óxidos de hierro son materiales adecuados para dar respuesta suficiente a un campo magnético externo y poder ser guiados a través del organismo. El control del tamaño como los diferentes materiales de cobertura permiten a las partículas adecuarse al entorno y a la función que se quiera desarrollar, presentando una gran biocompatibilidad y nula toxicidad.

Los mayores avances realizados hasta el momento se centran en el diagnóstico por imagen de enfermedades cardiovasculares. El hecho de poder diagnosticar precozmente episodios de inflamación permite abordar las enfermedades cardiovasculares con mayor margen de tiempo, pudiendo tomar medidas preventivas antes de que se produzcan daños, mejorando el pronóstico de dichas enfermedades que tanta prevalencia tienen.

A pesar de la cantidad de estudios realizados, el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares mediante sistemas de administración dirigida aún se encuentra en desarrollo, aunque ya se han conseguido algunos logros. La mayoría de investigaciones apuntan a la recuperación del tejido cardíaco

como principal daño a tratar. Por diferentes métodos, se ha conseguido ligar células madre a las partículas de óxido de hierro y crear una retención en el miocardio con la finalidad de que esas células regeneren el tejido afectado tras una isquemia o infarto de miocardio.

Por otro lado, sería interesante enfocar futuras investigaciones al estudio de nuevos materiales o formulaciones. Aunque está demostrado en muchos estudios que las partículas de óxido de hierro son candidatas ideales para este fin, nos encontramos con limitaciones como capacidad de carga, o retención de fármaco insuficiente en el lugar de acción.

7. CONCLUSIONES

Tras la realización de la revisión bibliográfica se ha podido establecer en relación con los objetivos las siguientes conclusiones:

1. La técnica de diagnóstico por imagen, en concreto la resonancia magnética, ha sido mejorada con el uso de agentes de contraste basados en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Poder jugar con el tamaño de la partícula permite que el sistema endotelial fagocite las partículas manifestando la inflamación. La imagen que se proyecta al emplear partículas de óxido de hierro es más nítida y puede detectar zonas de inflamación que con otros contrastes no se es capaz de apreciar. Tienen especial interés para detectar precozmente enfermedades cardiovasculares antes de que se produzca el daño.
2. La aplicación de nanopartículas magnéticas en técnicas como la administración dirigida de fármacos puede ofrecer nuevas posibilidades de tratamiento. Se ha conseguido dirigir selectivamente las nanopartículas magnéticas a las zonas dañadas del miocardio mediante técnicas de vectorización activa. Los estudios realizados indican que con este tipo de formulaciones se reduce la cantidad de

fármaco circulante y se evitan posibles efectos adversos derivados de la toxicidad.

3. El posible tratamiento con fármacos de la administración dirigida en enfermedades cardiovasculares está siendo enfocada hacia la recuperación del tejido cardiaco tras un infarto de miocardio. De momento se están estudiando células madre como fármacos y mediante la magnetización se está intentando crear una retención suficiente como para regenerar el tejido afectado. Aunque los estudios son muy prometedores y se han logrado ciertos objetivos, aún quedan investigaciones por realizar para que esta línea de trabajo sea una realidad.
4. Las nuevas investigaciones se deben centrar en el desarrollo de formulaciones que permitan una mayor capacidad de carga y una selectividad mayor entre células viables y no viables

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. WHO. [citado 15 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
2. Lahoz C, Mostaza JM. La Aterosclerosis como enfermedad sistémica. Revista Española de Cardiología. febrero de 2007;60(2):184-95.
3. Riesgo cardiovascular [Internet]. [citado 15 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular.html>
4. García Jimeno S. Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas [Tesis doctoral]. Barcelona: Universitat de Barcelona. Facultat de Farmacia, 2012.
5. Ali A, Zafar H, Zia M, ul Haq I, Phull AR, Ali JS, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. Nanotechnology, Science and Applications. agosto de 2016; Volume 9:49-67.
6. Ghazanfari MR, Kashefi M, Shams SF, Jaafari MR. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. Biochemistry Research International. 2016;2016:1-32.
7. Cullity BD, Graham CD. Introduction to magnetic materials. 2nd ed. Hoboken, N.J: IEEE/Wiley; 2009. 544 p.
8. Krishnan KM. Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. IEEE Transactions on Magnetics. julio de 2010;46(7):2523-58.
9. Wu W, He Q, Jiang C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. Nanoscale Research Letters. noviembre de 2008;3(11):397-415.

10. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*. 28 de abril de 2015;16(2):23501.
11. Xu J, Sun J, Wang Y, Sheng J, Wang F, Sun M. Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. *Molecules*. 4 de agosto de 2014;19(8):11465-86.
12. Maity D, Agrawal DC. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. enero de 2007;308(1):46-55.
13. Cheraghipour E, Javadpour S. Cationic albumin-conjugated magnetite nanoparticles, novel candidate for hyperthermia cancer therapy. *International Journal of Hyperthermia*. septiembre de 2013;29(6):511-9.
14. Aslani F, Bagheri S, Muhd Julkapli N, Juraimi AS, Hashemi FSG, Baghdadi A. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1-28.
15. Servin A, Elmer W, Mukherjee A, De la Torre-Roche R, Hamdi H, White JC, et al. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research* [Internet]. febrero de 2015 [citado 4 de abril de 2017];17(2). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-015-2907-7>
16. Auffan M, Rose J, Bottero J-Y, Lowry GV, Jolivet J-P, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*. noviembre de 2009;4(10):634-41.
17. Xu P, Zeng GM, Huang DL, Feng CL, Hu S, Zhao MH, et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment*. mayo de 2012;424:1-10.
18. Foley RW, Wiek A. Scenarios of nanotechnology innovation vis-à-vis sustainability challenges. *Futures*. diciembre de 2014;64:1-14.
19. Wang D, Kou R, Choi D, Yang Z, Nie Z, Li J, et al. Ternary Self-Assembly of Ordered Metal Oxide–Graphene Nanocomposites for Electrochemical Energy Storage. *ACS Nano*. 23 de marzo de 2010;4(3):1587-95.
20. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. junio de 2005;26(18):3995-4021.
21. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. agosto de 2011;166(1-2):8-23.
22. Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*. enero de 2008;24(6):467-74.
23. Jordan A. Hyperthermia classic commentary: ‘Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia’ by Andreas Jordan et al., *International Journal of Hyperthermia* , 1993;9:51–68. *International Journal of Hyperthermia*. enero de 2009;25(7):512-6.
24. Matsuoka F, Shinkai M, Honda H, Kubo T, Sugita T, Kobayashi T. Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. *Biomagn Res Technol*. 25 de marzo de 2004;2(1):3.

25. Magnetite Nanoparticles - MeSH - NCBI [Internet]. [citado 20 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=magnetite+nanoparticle>
26. Owensiii D, Peppas N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 3 de enero de 2006;307(1):93-102.
27. Edge D, Shortt CM, Gobbo OL, Teughels S, Prina-Mello A, Volkov Y, et al. Pharmacokinetics and bio-distribution of novel super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in the anaesthetized pig. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. marzo de 2016;43(3):319-26.
28. Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Molecular Pharmaceutics*. abril de 2008;5(2):316-27.
29. Metabolismo del hierro [Internet]. [citado 15 de abril de 2017]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol16_3_00/hih01300.htm
30. Edge D, Shortt CM, Gobbo OL, Teughels S, Prina-Mello A, Volkov Y, et al. Pharmacokinetics and bio-distribution of novel super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in the anaesthetized pig. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. marzo de 2016;43(3):319-26.
31. Nissim J, Robson JM. Preparation and standardisation of saccharated iron oxide for intravenous administration. *The Lancet*. abril de 1949;253(6556):686-9.
32. Richter GW. The cellular transformation of injected colloidal iron complexes into ferritin and hemosiderin in experimental animals: a study with the aid of electron microscopy. *Journal of Experimental Medicine*. 1 de febrero de 1959;109(2):197-216.
33. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation*. 8 de junio de 2010;121(22):2437-45.
34. Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, et al. ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 Expert Consensus Document on Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal of the American College of Cardiology*. junio de 2010;55(23):2614-62.
35. Schelbert EB, Hsu L-Y, Anderson SA, Mohanty BD, Karim SM, Kellman P, et al. Late Gadolinium-Enhancement Cardiac Magnetic Resonance Identifies Postinfarction Myocardial Fibrosis and the Border Zone at the Near Cellular Level in Ex Vivo Rat Heart. *Circulation: Cardiovascular Imaging*. 1 de noviembre de 2010;3(6):743-52.
36. Qi C, Du L, Wu W, Li D, Hao J, Gong L, et al. Detection of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Experimental Atherosclerosis with the USPIO-Enhanced MRI. *Cell Biochemistry and Biophysics*. noviembre de 2015;73(2):331-7.
37. Blocki A, Beyer S, Dewavrin J-Y, Goralczyk A, Wang Y, Peh P, et al. Microcapsules engineered to support mesenchymal stem cell (MSC) survival and proliferation enable long-term retention of MSCs in infarcted myocardium. *Biomaterials*. junio de 2015;53:12-24.
38. Gomez-Mauricio RG, Acarregui A, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Gallo I, Hernández RM, et al. A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model. *Eur J Pharm Biopharm*. mayo de 2013;84(1):29-39.

39. Bai X, Yan Y, Coleman M, Wu G, Rabinovich B, Seidensticker M, et al. Tracking long-term survival of intramyocardially delivered human adipose tissue-derived stem cells using bioluminescence imaging. *Mol Imaging Biol.* agosto de 2011;13(4):633-45.
40. Función renal, fibrosis sistémica nefrogénica y otras reacciones adversas asociadas a los medios de contraste basados en el gadolinio. *Nefrología [Internet]*. julio de 2014 [citado 19 de abril de 2017];(34). Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/modules.php?name=articulos&idarticulo=12375&idlangart=ES>
41. Cheng K, Li TS, Malliaras K, Davis DR, Zhang Y, Marban E. Magnetic Targeting Enhances Engraftment and Functional Benefit of Iron-Labeled Cardiosphere-Derived Cells in Myocardial Infarction. *Circulation Research.* 28 de mayo de 2010;106(10):1570-81.
42. Zhang Y, Li W, Ou L, Wang W, Delyagina E, Lux C, et al. Targeted Delivery of Human VEGF Gene via Complexes of Magnetic Nanoparticle-Adenoviral Vectors Enhanced Cardiac Regeneration. Emanuela C, editor. *PLoS ONE.* 26 de julio de 2012;7(7):e39490.
43. Cheng K, Malliaras K, Li T-S, Sun B, Houde C, Galang G, et al. Magnetic Enhancement of Cell Retention, Engraftment, and Functional Benefit After Intracoronary Delivery of Cardiac-Derived Stem Cells in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion. *Cell Transplantation.* 1 de junio de 2012;21(6):1121-35.
44. Cheng K, Shen D, Hensley MT, Middleton R, Sun B, Liu W, et al. Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting. *Nature Communications.* 10 de septiembre de 2014;5:4880.
45. Alvizo-Baez CA, Luna-Cruz IE, Vilches-Cisneros N, Rodríguez-Padilla C, Alcocer-González JM. Systemic delivery and activation of the TRAIL gene in lungs, with magnetic nanoparticles of chitosan controlled by an external magnetic field. *International Journal of Nanomedicine.* diciembre de 2016;Volume 11:6449-58.
46. Bietenbeck M, Florian A, Sechtem U, Yilmaz A. The diagnostic value of iron oxide nanoparticles for imaging of myocardial inflammation – quo vadis? *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance [Internet]*. diciembre de 2015 [citado 23 de abril de 2017];17(1). Disponible en: <http://jcmr-online.com/content/17/1/54>
47. Moon H, Park HE, Kang J, Lee H, Cheong C, Lim YT, et al. Noninvasive Assessment of Myocardial Inflammation by Cardiovascular Magnetic Resonance in a Rat Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Circulation.* 29 de mayo de 2012;125(21):2603-12.
48. Ge J, Huang Z, Li C, Yang S, Xu J, Shen Y, et al. Magnetic resonance hypointensive signal primarily originates from extracellular iron particles in the long-term tracking of mesenchymal stem cells transplanted in the infarcted myocardium. *International Journal of Nanomedicine.* marzo de 2015;1679.
49. Yao Y, Li Y, Ma G, Liu N, Ju S, Jin J, et al. In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Injected Endothelial Progenitor Cells after Myocardial Infarction in Rats. *Molecular Imaging and Biology.* abril de 2011;13(2):303-13.
50. Zhou Q, Yang K-R, Gao P, Chen W-L, Yang D-Y, Liang M-J, et al. An experimental study on MR imaging of atherosclerotic plaque with SPIO marked endothelial cells in a rabbit model. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* diciembre de 2011;34(6):1325-32.
51. Martín Giménez VM, Ruiz-Roso MB, Camargo AB, Kassuha D, Manucha W. Nanotecnología, un nuevo paradigma en el tratamiento de la aterosclerosis. *Clínica e*

Investigación en Arteriosclerosis [Internet]. noviembre de 2016 [citado 2 de mayo de 2017]; Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0214916816301292>

53. Santoso MR, Yang PC. Magnetic Nanoparticles for Targeting and Imaging of Stem Cells in Myocardial Infarction. *Stem Cells International*. 2016;2016:1-9.

54. Campan M, Lionetti V, Aquaro GD, Forini F, Matteucci M, Vannucci L, et al. Ferritin as a reporter gene for in vivo tracking of stem cells by 1.5-T cardiac MRI in a rat model of myocardial infarction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 1 de junio de 2011;300(6):H2238-50.

55. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*. junio de 1996;13(3):245-55.

56. Tadayon A, Jamshidi R, Esmaeili A. Delivery of tissue plasminogen activator and streptokinase magnetic nanoparticles to target vascular diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. noviembre de 2015;495(1):428-38.

