



Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad de Química

**Sistemas vectorizados de liberación modificada para el
tratamiento de artritis reumatoide**

Trabajo Monográfico de Actualización

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

Mayra Martínez Peláez





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Josefa Bernad Bernad

VOCAL: Profesor: Verónica Zamora Salazar

SECRETARIO: Profesor: Jorge Esteban Miranda Calderón

1er. SUPLENTE: Profesor: Lorena García González

2° SUPLENTE: Profesor: Andrea Saori Majluf Trejo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA: María Josefa Bernad Bernad

SUSTENTANTE: Mayra Martínez Peláez

Resumen

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica y autoinmune que genera procesos de inflamación, destrucción y deformación de las articulaciones. Su tratamiento es de tipo paliativo y contempla, por lo general, el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs), mismos que son formulados de manera convencional. Desafortunadamente, los resultados obtenidos con estas terapias no son completamente satisfactorios, dado que el efecto buscado sólo se consigue en una pequeña proporción de los pacientes, en los que la remisión parcial de la enfermedad y las recaídas son un problema común. Adicionalmente, los fármacos antirreumáticos desarrollados hasta el momento tienen un riesgo considerable de generar efectos adversos, algunos de los cuales pueden ser graves o incluso mortales. Esto se debe, en parte a la falta de especificidad de la mayoría de los principios activos por un tejido diana y debido a un alto grado de distribución sistémica, que junto con su rápida eliminación, requieren de la aplicación frecuente de dosis altas.

Los sistemas farmacéuticos vectorizados de administración modificada representan un enfoque prometedor para superar las limitaciones terapéuticas actuales, ya que pueden llevar al fármaco selectivamente al sitio de inflamación, lo que podría mejorar su eficacia y reducir su biodistribución. Además de conducir a una reducción de las dosis empleadas y generar una disminución en los daños colaterales al paciente.

El creciente interés y la confianza de estos sistemas han dado lugar a un mayor número de investigaciones en este campo, que pueden llegar a revolucionar el tratamiento para esta enfermedad. En este contexto, el presente trabajo bibliográfico se centra en las estrategias liberación modificada y direccionada de fármacos para el tratamiento de la artritis reumatoide, buscando un mejor entendimiento del padecimiento, que permitan la generación de nuevas ideas para el desarrollo mejores e innovadores sistemas.

Índice general

Introducción.	1
Capítulo 1	
1. Aspectos clínicos de la artritis reumatoide.	3
1.1 Epidemiología.	3
1.2 Desarrollo clínico	3
1.2.1 Fase inicial.	3
1.2.2 Fase de estado	3
1.3 Diagnóstico.	4
1.4 Manifestaciones clínicas	4
1.4.1 Manifestaciones articulares	4
1.4.1.1 Manos y muñecas	4
1.4.1.2 Tobillos y pies	5
1.4.1.3 Rodillas.	5
1.4.1.4 Cadera	6
1.4.1.5 Hombros	6
1.4.2 Manifestaciones extraarticulares	6
1.4.2.1 Manifestaciones cardíacas	6
1.4.2.2 Manifestaciones cutáneas	6
1.4.2.2.1 Nódulos reumatoides	7
1.4.2.2.2 Vasculitis.	7
1.4.2.2.3 Fenómeno de <i>Raynaud</i>	7
1.4.2.3 Manifestaciones pulmonares	7
1.4.2.4 Manifestaciones neurológicas.	8
1.4.2.5 Manifestaciones oculares.	8
1.5 Etiopatogenia	8
1.5.1 Bases genéticas.	8
1.5.2 Teoría inmunogénica de respuesta adaptativa	9

1.5.3	Presentación de antígeno	10
1.5.4	Liberación de mediadores de inflamación	11
1.5.4.1	Citocinas proinflamatorias o Th1	11
1.5.4.2	Quimiocinas	13
1.6	Tratamiento.	14
1.6.1	Tratamiento farmacológico.	14
1.6.1.1	AINEs	14
1.6.1.2	Glucocorticoides	14
1.6.1.3	FARMEs	15
1.6.1.3.1	Metotrexato.	15
1.6.1.3.2	Leflunomida.	16
1.6.1.3.3	Sulfasalazina	16
1.6.1.3.4	Antipalúdicos	18
1.6.1.4	FARMEs biológicos.	19
1.6.1.4.1	Fármacos anti-TNF- α	19
1.6.1.4.2	Fármacos anti-interleucinas	20
1.6.2	Tratamiento no farmacológico	20
Capítulo 2		
2.	Patogenia en la artritis reumatoide	21
2.1	Sistema óseo	21
2.1.1	Proceso de remodelación ósea	21
2.2	Sistema articular	22
2.2.1	Anatomía y fisiología de la articulación diartrodial	23
2.2.1.1	Cápsula articular.	23
2.2.1.2	Membrana sinovial.	23
2.2.1.2.1	Capa íntima	24
2.2.1.2.2	Capa subíntima.	24
2.2.1.3	Líquido sinovial	25
2.2.1.4	Cartílago articular.	26
2.2.1.5	Meniscos y ligamento	27

2.3	Alteraciones patológicas en la artritis reumatoide	27
2.3.1	Angiogénesis	27
2.3.1.1	Mediadores de la angiogénesis.	27
2.3.2	Desarrollo del <i>pannus</i>	28
2.3.3	Medio hipóxico.	29
2.3.4	Cambios en el líquido sinovial.	29
2.3.5	Erosión de hueso	30
2.3.6	Degradación de cartílago	31

Capítulo 3

3.	Sistemas de liberación farmacéutica	32
3.1	Sistemas convencionales	32
3.1.1	Vías de administración.	33
3.1.1.1	Vía oral	33
3.1.1.2	Vía parenteral.	34
3.1.1.3	Vía intraarticular.	34
3.1.2	Terapia convencional en la artritis reumatoide	35
3.2	Sistemas no convencionales.	36
3.2.1	Liberación modificada.	36
3.2.1.1	Liberación retardada	36
3.2.1.2	Liberación extendida o prolongada	37
3.3	Clasificación de sistemas de liberación controlada	37
3.3.1	Sistemas de velocidad preprogramada	37
3.3.1.1	Sistemas reservorios	37
3.3.1.2	Sistemas matriciales	38
3.3.1.2.1	Matrices inertes	38
3.3.1.2.2	Matrices hinchables	38
3.3.1.2.3	Matrices erosionables	38
3.3.2	Sistemas modulados por activación.	39
3.3.3	Sistemas vectorizados.	39
3.4	Materiales.	39

3.4.1	Polímeros	39
3.4.1.1	Polímeros sintéticos.	41
3.4.1.2	Polímeros naturales	41
3.4.2	Lípidos	41
Capítulo 4		
4.	Sistemas vectorizado.	42
4.1	Clasificación de técnicas de vectorización	42
4.1.1	Vectorización pasiva	42
4.1.2	Vectorización activa	43
4.2	Vehículos o acarreadores	44
4.2.1	Sistemas moleculares	44
4.2.1.1	Ciclodextrina	44
4.2.1.1.1	Síntesis y conjugación de fármaco	45
4.2.1.1.2	Caracterización	46
4.2.2.1	Dendrímeros	46
4.2.2.1	Síntesis y conjugación de fármaco	47
4.2.2.2	Caracterización.	48
4.2.2	Sistemas coloidales	48
4.2.2.1	Nanopartículas.	49
4.2.2.1.1	Métodos de preparación.	49
4.2.2.1.2	Caracterización	51
4.2.2.1.3	Métodos que favorecen la permanencia	52
4.2.2.2	Liposomas	52
4.2.2.2.1	Métodos de preparación	53
4.2.2.2.2	Caracterización	53
4.2.2.2.3	Métodos que favorecen carga	54
4.2.2.2.4	Métodos que favorecen la permanencia	55
4.2.2.3	Nanogeles	56
4.2.2.3.1	Métodos de preparación	57
4.2.2.3.2	Caracterización	58

4.2.2.3.3	Nanogeles cargados con nanopartículas	59
4.2.3	Otros sistemas	59
4.2.3.1	Sistema anticuerpo-fármaco	59
4.2.3.1.1	Anticuerpos	60
4.2.3.1.2	Características	60
4.2.3.1.3	Desarrollo	60
4.2.3.1.4	Mecanismo de acción	61
4.2.3.2	Sistemas conjugados a proteínas	61
4.2.3.2.1	Albúmina	62
4.2.3.2.2	Desarrollo	62
Capítulo 5		
5.	Sistemas vectorizados en artritis reumatoide.	63
5.1	Investigación realizada	63
5.2	Similitud entre artritis reumatoide y cáncer	63
5.3	Estrategias de vectorización pasiva en artritis reumatoide	64
5.3.1	Permeabilidad	64
5.3.2	Retención	65
5.3.3	Aclaramiento	65
5.4	Sistemas pasivos desarrollados	66
5.4.1	Liposomas	66
5.4.2	Nanopartículas	67
5.4.3	Proteínas plasmáticas	68
5.4.4	Otros sistemas	69
5.5	Estrategias de vectorización activa en artritis reumatoide	75
5.5.1	Vectores naturales	75
5.5.2	Estímulos externos	76
5.6	Sistemas activos naturales desarrollados	76
5.6.1	Receptor folato	76
5.6.2	Receptor CD44	80
5.6.3	Integrina $\alpha_v\beta_3$	82

5.6.4 E-Selectina.	84
5.6.5 ICAM-1	86
5.7 Sistemas activos artificiales desarrollados.	87
5.7.1 Estímulo magnético	87
5.8 Control de la liberación	89
5.8.1 Sistemas sensibles a hipoxia.	90
5.8.2 Sistemas sensibles a pH	93
5.8.3 Sistemas sensibles a temperatura.	96
Discusión.	99
Conclusiones	102
Bibliografía	103

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1	Deformación de cuello de cisne	4
Figura 2	Deformidad de hiperflexión plantar	5
Figura 3	Nódulos reumatoides en los dedos	7
Figura 4	Paciente con episcleritis.	8
Figura 5	Desarrollo de la artritis reumatoide	10
Figura 6	Estructuras químicas de los FARMES más usados para el tratamiento de la artritis reumatoide	16

Capítulo 2

Figura 7	Elementos que intervienen en el proceso de remodelación ósea.	21
Figura 8	Elementos estructurales que componen a la articulación diartrodial	23
Figura 9	Membrana sinovial de articulación de rodilla	24
Figura 10	Elementos celulares presentes en líquido sinovial vistos con tinción de Wright-Giemsa	25
Figura 11	Invasión de <i>pannus</i> a cartílago y hueso en artritis reumatoide . .	28
Figura 12	Zonas de erosión ósea en manos.	30
Figura 13	Comparación entre articulación sana y articulación con artritis reumatoide.	31

Capítulo 3

Figura 14	Perfil de concentración hipotética de fármaco con liberación inmediata con terapia multidosis	34
Figura 15	Concentración hipotética de fármaco con liberación prolongada y retardada en función al tiempo	38
Figura 16	Esquema comparativo de un sistema matricial y reservorio. . .	39
Figura 17	Tipos de sistemas de liberación controlada	40

Figura 18	Polímeros biodegradables y biocompatibles empleados comúnmente	41
Capítulo 4		
Figura 19	Liberación de fármaco de sistema no vectorizado y sistemas vectorizados de tipo pasivo y activo.	44
Figura 20	Estructura de β -ciclodextrina.	46
Figura 21	Estructura de PAMAM de segunda generación.	48
Figura 22	Método de emulsificación con evaporación de solvente para obtención de nanopartículas.	51
Figura 23	Método de <i>salting-out</i> para la obtención de nanopartículas . . .	51
Figura 24	SEM de nanopartículas de PLA.	52
Figura 25	Estructura de liposomas de tipo multi y unilaminar obtenidas por crioelectromicroscopía.	54
Figura 26	Micrografía SEM de nanogel de NIPAm	59
Figura 27	Sistema fármaco-anticuerpo	60
Figura 28	Estructura de la HSA.	62
Capítulo 5		
Figura 29	Estudios de investigación publicados sobre sistemas vectorizados para el año 2012	63
Figura 30	Comparación entre tejido normal e inflamado y el paso de sistemas farmacéuticos a través de ellos	64
Figura 31	Tejido articular después de la administración de prednisolona formulada convencionalmente y con liposomas PEGilados . . .	66
Figura 32	Acumulación de nanopartículas de HPMA en patas de ratas con artritis reumatoide inducida	68
Figura 33	Comparación de porcentaje de metotrexato acumulado en patas de ratas sanas y con artritis reumatoide inducida, en sistema de fármaco con y sin conjugar a HSA	69
Figura 34	Liberación de fármaco vía vectorización con ácido fólico. . . .	77

Figura 35	Dendrímtero PAMAM ligado a ácido fólico y al fármaco.	78
Figura 36	Concentración de metotrexato acumulada en tejido articular tras la administración del sistema liposomal y el fármaco libre	79
Figura 37	Distribución de nanopartículas de ácido hialurónico marcadas fluorescentemente en órganos de ratas sanas y artríticas	82
Figura 38	Unión de liposomas ligados a RGD marcados fluorescentemente a fibroblasto patológico vista mediante microscopía electrónica.	83
Figura 39	Unión de sistema vectorizado vía E-selectina y sistema convencional con diferente grado de activación de células endoteliales	86
Figura 40	Vectorización vía estímulo magnético	87
Figura 41	Mecanismo de reacción de reducción de un compuesto nitroaromático por acción de la nitroreductasa en condiciones de hipoxia	91
Figura 42	Porcentaje de doxorubicina liberada de sistemas convencionales y sistemas sensibles a hipoxia en condiciones normales de oxígeno y de hipoxia.	92
Figura 43	Acumulación de doxorubicina en distintos órganos empleando un sistema sensible a hipoxia	93
Figura 44	Polímeros acrílicos y catiónicos sensibles a pH	94
Figura 45	Porcentaje de fármaco liberado del nanogel contra tiempo a diferentes pH del nanogel y metotrexato libre	96
Figura 46	Comportamiento de sistema termosensible LCST a diferentes temperaturas.	97
Figura 47	Estrategias de liberación de fármaco en liposomas termosensibles	98

Índice de tablas

Capítulo 1

Tabla 1	Posibles antígenos responsables de la respuesta celular T específica	9
Tabla 2	Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias importantes en la artritis reumatoide	11
Tabla 3	Células productoras y función de principales citocinas proinflamatorias asociadas en el desarrollo de la artritis reumatoide	13
Tabla 4	Características de FARMES sintéticos empleados para el tratamiento de la artritis reumatoide	18

Capítulo 3

Tabla 5	Dosis y precios de medicamentos convencionales empleados comúnmente para el tratamiento de la artritis reumatoide . . .	35
----------------	---	----

Capítulo 5

Tabla 6	Sistemas de vectorización pasiva para el tratamiento de la artritis reumatoide	70
----------------	--	----

Abreviaturas

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
CGTasa	Enzima ciclodextrin-glicosil-transferasa
CPA	Células presentadoras de antígeno
DMPC	Dimiristoil fosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DSC	Calorimetría diferencia de barrido
DSPC	Diestearil fosfatidilcolina
DSPC	Distearoil fosfatidil colina
EM	Espectroscópicas de masas
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
FARMEs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
Fc	Fracción cristalizable de anticuerpo
FR	Receptor folato
FRβ	Receptor folato- β
GCs	Glucocorticoides
HIF-1	Factor de transcripción inducible a hipoxia tipo 1
HLA	Antígeno leucocitario de Clase II
HPMA	N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida
HSA	Albúmina sérica humana
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFNγ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IR	Espectroscopía de infrarrojo
LCST	Temperatura crítica mínima de solución
LFN	Leflunomida
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
M-CSF	Factor estimulante de colonias para precursores de macrófagos
MMP	Enzimas metaloproteinasas

MTX	Metotrexato
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIPAM	N-isopropilacrilamida
NK	Células <i>natural killer</i>
OPG	Osteoprotegerina
PAA	Ácido poli-acrílico
PAH-Cit	Anhídrido poli-alilamina hidrocloreto-citracónico
PAMAM	Poliamidoamina
PBAA	Ácido poli-butilacrilato
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEA	Poliesteramina
PEAA	Ácido poli-etilacrílico
PEG	Polietilenglicol
PEHAM	Polieterhidroxilamina
PEO-PPO	Polioxietileno-polioxipropileno
PGA	Ácido poli-glutámico
PHis	Poli-L-histidina
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PMAA	Ácido poli-metacrílico
PPAA	Ácido poli-propilacrílico
PPI	Polipropileno
PVP	Poli-4-vinilpiridina
RANKL	Ligando de receptor activador para NF-κB
RASFs	Fibroblastos sinoviales
RASMs	Macrófagos sinoviales de artritis reumatoide
RCT	Receptor de la célula T
RGD	Secuencia de tripéptidos Arg-Gli-Asp
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEM	Microscopía electrónica de barrido

SSZ	Sulfasalazina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Th1	Respuesta proinflamatoria (T <i>helper</i>)
Th2	Respuesta antiinflamatoria
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
UV/VIS	Espectroscopía ultravioleta visible
VECs	Endotelio vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio
Y-1	Angiopoyetina-1

Introducción

La artritis reumatoide es un padecimiento crónico e inflamatorio que afecta a las articulaciones. Si bien no es una enfermedad mortal, afecta notablemente la calidad de vida de los pacientes, debido a que genera episodios constantes de dolor, atrofia y deformación en los tejidos involucrados.

Debido a su carácter etiológico de tipo inmunológico, aún no se ha podido elucidar con certeza la causa real de la enfermedad, por lo que el tipo de tratamiento farmacológico que se puede ofrecer es únicamente de tipo paliativo.

A pesar que existe una numerosa variedad de principios activos que pueden ser prescritos para las enfermedades inflamatorias, y en particular para la artritis reumatoide, la gran mayoría de los pacientes no ha respondido idealmente a los tratamientos. Aunado al elevado riesgo que conllevan al desarrollo de numerosos efectos adversos que afectan principalmente al sistema hepático, renal y hematopoyético, pudiendo llegar a ser graves e incluso mortales. Esta toxicidad sistémica se debe a la baja especificidad de los fármacos antirreumáticos por un tejido o célula diana, lo que los llevan a distribuirse ampliamente en el organismo, comprometiendo otras funciones y favoreciendo su rápida eliminación. Estos factores disminuyen marcadamente la biodisponibilidad y eficacia de los fármacos, por lo que, las terapias actuales contemplan el uso de dosis altas, administradas de manera frecuente, lo que incrementa el riesgo del desarrollo de efectos adversos, además que genera la incomodidad del paciente, puesto que al tratarse de una enfermedad crónica, está sujeto a la medicación de por vida.

La formulación de un fármaco influye en su estabilidad y liberación. El uso de nuevos materiales y estrategias ha dado lugar a la generación de formas farmacéuticas no convencionales. La investigación actual se centra en el desarrollo de acarreadores de tamaño nanométrico, capaces de contener al principio activo y llevarlo a un sitio en específico, mediante técnicas de liberación modificada como la vectorización.

Introducción

El diseño de estos sistemas requiere del conocimiento de las alteraciones causadas por la enfermedad, con el fin de poder seleccionar las estrategias adecuadas que permitan el resguardo y protección del fármaco, hasta el sitio y las condiciones en donde se requiere liberar. Los sistemas vectorizados de liberación modificada son una alternativa que favorece la eficacia de los fármacos y pueden reducir la toxicidad generada tras su administración.

El presente Trabajo Monográfico de Actualización tiene como propósito la recolección de información bibliográfica que permita el conocimiento y entendimiento de la artritis reumatoide, así como de los sistemas vectorizados y de liberación modificada que se han desarrollado hasta el momento para su tratamiento, con el fin de identificar las ventajas e inconvenientes que puedan servir como herramienta para la generación de estrategias innovadoras para la formulación de medicamentos antirreumáticos más eficaces.

El capítulo 1 presenta las características, etiología, manifestaciones clínicas y tratamientos actuales de la artritis reumatoide. En el capítulo 2 se hace hincapié en los cambios patológicos de la enfermedad, mismos que permiten el diseño de sistemas inteligentes. En el capítulo 3 se muestran los conceptos básicos de los sistemas de liberación, mismos que son la pauta para introducir a los sistemas vectorizados y a la nanotecnología, que se desarrollan en el capítulo 4. Finalmente el capítulo 5, muestra en concreto, diversas aplicaciones que se han realizado, referentes a los sistemas vectorizados de liberación modificada, con base a toda la información previamente revisada.

De este modo este trabajo pretende verificar la hipótesis que si la artritis reumatoide genera cambios patológicos en el microambiente de los tejidos y células, permitiría el desarrollo de sistemas vectorizados de liberación modificada, los cuales serían una mejor alternativa para el tratamiento de este padecimiento, en comparación a las formas farmacéuticas convencionales, dado que favorecerían la eficacia de los fármacos antirreumáticos, además de reducir los efectos adversos asociados a su uso.

Capítulo 1

1. Aspectos clínicos de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica, heterogénea y autoinmune que se caracteriza por la inflamación de las membranas sinoviales de las articulaciones, principalmente las de tipo diartrodial¹. Es un padecimiento que presenta altos grados de destrucción articular y una gran variedad de manifestaciones extra-articulares clínicamente evidentes².

1.1 Epidemiología

Demográficamente, la artritis reumatoide es la afección reumática inflamatoria más frecuente que afecta de 0.5 a 1.0% de la población adulta a nivel mundial³. La enfermedad puede aparecer a cualquier edad, pero es más incidente en individuos entre 40 y 60 años de edad. Además de predominar principalmente en mujeres, siendo su desarrollo hasta 4 veces más frecuente⁴.

1.2 Desarrollo clínico

1.2.1 Fase inicial

El surgimiento de la artritis reumatoide es variable. Por lo general, existe una periartrosis distal que afecta con más frecuencia a las muñecas y en algunas ocasiones los antepiés. Los eventos dolorosos que la acompañan, suelen comenzar en la noche y son máximos al despertar por la mañana. En otros casos, puede comenzar con una monoartritis, principalmente de la rodilla, que permanece durante meses o años⁵.

1.2.2 Fase de estado

Las manifestaciones clínicas principales en la artritis reumatoide son el dolor, la tumefacción y la disminución de la movilidad. El dolor puede ser ligero o intenso, persistir en reposo e incrementarse con el movimiento. La tumefacción articular se

presenta por una cápsula edematosa de consistencia blanda que se desarrolla como resultado de la acumulación de líquido sinovial. La disminución de la movilidad es resultado de los episodios de dolor y la tensión interarticular presentados⁶.

1.3 Diagnóstico

Para establecer el diagnóstico de artritis reumatoide, el paciente debe cumplir con al menos cuatro de los siguientes criterios: presentar durante al menos 6 semanas: rigidez matutina de las articulaciones, inflamación simultánea de más de tres áreas articulares e inflamación articular simétrica; además de la identificación de signos como nódulos reumatoides, nivel elevado del factor reumatoide y hallazgos radiográficos que incluyan erosiones u osteopenia yuxtaarticular en las zonas afectadas⁷.

1.4 Manifestaciones clínicas

1.4.1 Manifestaciones articulares

Las áreas más comúnmente afectadas incluyen las articulaciones de la mano, dentro de las que se encuentran las metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, interfalángicas distales y metatarso falángicas, además de la cadera, codos, rodillas y hombros⁶.



Figura 1. Deformación de cuello de cisne.

1.4.1.1 Manos y muñecas

Los procesos de inflamación involucran con mayor frecuencia a las articulaciones de la mano y de la muñeca. En estas regiones, la artritis reumatoide puede desarrollarse

[DUCAN, A., (1981). *Rheumatoid arthritis: discussions in patient management*. Medical Examination. Vol. 1, 3° ed., Capítulo 68, p. 771 (Figura 68.7)]

como sinovitis, tenosinovitis o como un síndrome de compresión del nervio mediano del carpo, manifestándose atrofia muscular leve, además de la presencia de edemas con inflamación y aumento de la vascularización⁷. En los casos más desarrollados de la enfermedad, se generan deformaciones como consecuencia de la inflamación articular crónica, la debilidad y desgaste de los músculos de la mano, además de la ruptura de tendones. Las deformaciones más comúnmente presentadas son: la subluxación radial del carpo, formación de pulgar en Z, desviación cubital de los dedos, así como el dedo en cuello de cisne (Fig. 1) y dedo en ojal⁸.

1.4.1.2 Tobillos y pies

La inflamación en los pies ocurre en más del 90% de los pacientes con artritis reumatoide⁷. El dolor presentado prevalece en la región anterior del tobillo y en las regiones inframaleolar y retromaleolar. Además existe una alteración de los ligamentos colaterales que ocasiona la pérdida de la estabilidad articular⁹. Las deformaciones del pie siguen un patrón característico, en el que existe un hundimiento del arco anterior con callo plantar, ensanchamiento del antepié e hiperflexión¹⁰ (Fig. 2).



Figura 2. Deformidad de hiperflexión plantar.

[DUCAN, A., (1981). *Rheumatoid arthritis: discussions in patient management*. Medical Examination. Vol. 1, 3° ed., Capítulo 68, p. 776 (Fig. 68.15)]

1.4.1.3 Rodillas

Los procesos de inflamación en las rodillas son muy frecuentes, suelen aparecer en etapas tempranas de la enfermedad, pudiendo llegar a ser incapacitantes. Se caracterizan por la presencia de tumefacción, calor local y derrames articulares. Un signo común es el quiste de *Baker*, una tumefacción blanda que se genera debido al debilitamiento de la membrana sinovial que recubre a la rodilla¹⁰.

1.4.1.4 Cadera

Las molestias en la cadera se llegan a producir en cualquier momento de la enfermedad, pero son más frecuentes en fases avanzadas. Las manifestaciones incluyen dolor en la ingle y la espalda baja, debido a lesiones en la cavidad cotiloidea del coxal y cabeza femoral⁹.

1.4.1.5 Hombros

La afectación en los hombros es variable. Por lo general existe desgaste e inflamación en la cabeza del húmero, lo que causa dolor y limita el movimiento del individuo⁹.

1.4.2 Manifestaciones extraarticulares

A pesar de ser una enfermedad predominantemente articular, la artritis reumatoide es una afección sistémica que se ha asociado con diversas alteraciones en otros órganos y tejidos. Las manifestaciones extraarticulares ocurren en menos del 15% de los pacientes y sólo en un 5% es de forma severa¹⁰.

1.4.2.1 Manifestaciones cardiacas

Las afectaciones cardiacas pueden presentarse en cualquier momento del desarrollo de la artritis reumatoide. Estas alteraciones incluyen pericarditis con o sin derrame, cardiopatía isquémica, valvulopatías y alteraciones del ritmo cardíaco¹⁰. Desafortunadamente, la mayoría de estas complicaciones son silenciosas, lo que complica su detección.

1.4.2.2 Manifestaciones cutáneas

Las alteraciones en la piel constituyen las manifestaciones extraarticulares más frecuentes que presentan los pacientes con artritis reumatoide. Incluyen la aparición de nódulos reumatoides, el fenómeno de *Raynaud* y la vasculitis cutánea¹¹.

1.4.2.2.1 Nódulos reumatoides

Estas manifestaciones se presentan como estructuras granulomatosas mayores a 5 cm de diámetro. Están localizadas principalmente en zonas de fricción o de roce, como dedos (Fig. 3), codos, rodillas o tobillos¹¹. Con menor frecuencia se desarrollan internamente, en zonas intradérmicas y viscerales, el pulmón, en serosas pleuropericárdicas, miocardio, duramadre y corioide¹².



Figura 3. Nódulos reumatoides en los dedos.

[Clinical Slide Collection on
Rheumatic diseases,
Vol. 1, Edición 1995 ACR #5-C-20]

1.4.2.2.2 Vasculitis

La vasculitis es la inflamación de los vasos sanguíneos. Su gravedad depende de la localización y del tipo de vaso que se ve afectado, pudiendo desarrollarse tanto formas benignas como fatales. Los pacientes con vasculitis sistémica presentan pérdida de peso, fiebre, leucocitosis y en raras ocasiones, leucopenia. A nivel dérmico, las lesiones incluyen manchas aisladas o agrupadas de color marrón y úlceras profundas de aparición brusca¹¹.

1.4.2.2.3 Fenómeno de *Raynaud*

El fenómeno de *Raynaud* es un trastorno que causa un cambio de color trifásico en las extremidades como respuesta al estrés emocional. Por lo general se presenta especialmente en los dedos. Su curso es generalmente benigno y rara vez causa ulceración o gangrena isquémica en los pacientes¹⁰.

1.4.2.3 Manifestaciones pulmonares

La pleuropatía es la complicación infecciosa pulmonar más frecuente en los pacientes con artritis reumatoide. Es una alteración, en la que el líquido pleural presenta un aumento de proteínas, células y fagocitos¹². Otras manifestaciones observadas en los pulmones son fibrosis y la presencia de nódulos reumatoides¹⁰.

1.4.2.4 Manifestaciones neurológicas

Este tipo de alteraciones pueden involucrar tanto al sistema nervioso central como al periférico. Comúnmente, se presentan como neuropatía periférica y la mielopatía cervical¹¹.

1.4.2.5 Manifestaciones oculares

Por lo general, dentro de estas alteraciones se encuentra el desarrollo de iritis, iridociclitis, queratoconjuntivitis, episcleritis (Fig. 4), cataratas subcapsulares y escleromalacia perforante¹².

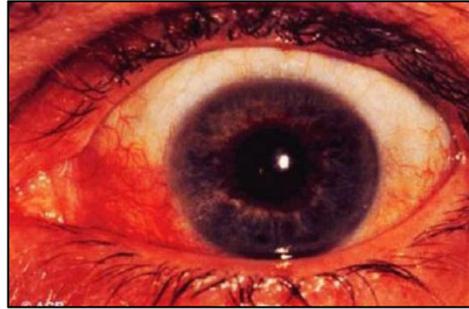


Figura 4. Paciente con episcleritis.

[Clinical Slide Collection on Rheumatic diseases,
Vol.1, Edición 1995 ACR #5-C-14]

1.5 Etiopatogenia

En la actualidad, a pesar de que los factores etiológicos de la artritis reumatoide son poco conocidos, se ha avanzado mucho en el estudio de los mecanismos que intervienen en su etiopatogenia. Las teorías más recientes sugieren que la inflamación sinovial es iniciada por un desbalance de los procesos de inmunidad celular y humoral, que genera la alteración de los elementos celulares residentes en el tejido conectivo de la articulación, mismos que la invaden y destruyen¹³. Estas alteraciones conllevan a una regulación alterada de citocinas, un aumento en el número de fibroblastos reumatoides con proliferación de células inflamatorias, principalmente macrófagos y linfocitos, además de un cambio microvascular y angiogénesis¹⁴ (Fig. 5).

1.5.1 Bases genéticas

La identificación de factores genéticos involucrados en la artritis reumatoide se dificulta por la heterogeneidad de la enfermedad, debido a la baja penetrancia alélica y a las interacciones de ésta con el medio ambiente. De los más de 100 *loci* que predisponen a este padecimiento, la mayor contribución a su desarrollo

proviene de aquellos que codifican para antígenos leucocitarios de Clase II (HLA)¹⁵.

1.5.2 Teoría inmunogénica de respuesta adaptativa

La teoría patogénica más aceptada sugiere que el origen de la enfermedad es consecuencia de la activación de linfocitos T CD4+, por un antígeno o antígenos desconocidos, que son presentados al receptor de la célula T (RCT) por determinadas moléculas de HLA de Clase II en células presentadoras de antígeno (CPA). El antígeno iniciador puede ser tanto exógeno como endógeno¹⁴.

En la Tabla 1 se mencionan algunos de los posibles antígenos que pueden ser reconocidos específicamente por los linfocitos T para el desarrollo de artritis reumatoide.

Tabla 1. Posibles antígenos responsables de la respuesta celular T específica.

[GARCÍA, R. (2014). *Artritis reumatoide (I): Etiopatogenia*. Medicine. 9; p.1806, Tabla 1]

Antígenos de tipo endógeno	
Autoantígenos articulares	Autoantígenos sistémicos
Colágeno tipo II	Región Fc de inmunoglobulina G (factor reumatoide)
Proteína p205	Filagrina (péptidos citrulinados)
Proteína central proteoglicada cartílago-específica (Agregano)	Proteína p68
	Ribonucleoproteínas
	Glucosa 6 fosfato isomerasa
Antígenos de tipo exógeno	
Glucoproteína 110 del virus <i>Epstein Barr</i>	
Proteínas de <i>Mycoplasma</i>	
Proteínas <i>heat shock</i> de micobacterias	

1.5.3 Presentación de antígeno

Las moléculas HLA de Clase II desempeñan un papel clave en la presentación de antígenos peptídicos lineales a las células T al expresarse en la superficie de las CPA. Cuando las cadenas α y β de la molécula HLA de Clase III se unen al antígeno forman un complejo trimolecular que se liga a la porción variable del linfocito T. Adicionalmente esta unión requiere de la vía estimuladora CD80/86:CD28. CD28 es una glucoproteína que está constitutivamente expresada sobre la membrana de las células T. Mientras que CD80/86 se encuentra presente sobre la membrana de las células presentadoras de antígenos. La vía CD80/86:CD28 favorece la activación de los linfocitos T, así como la proliferación y producción de citocinas¹⁶.

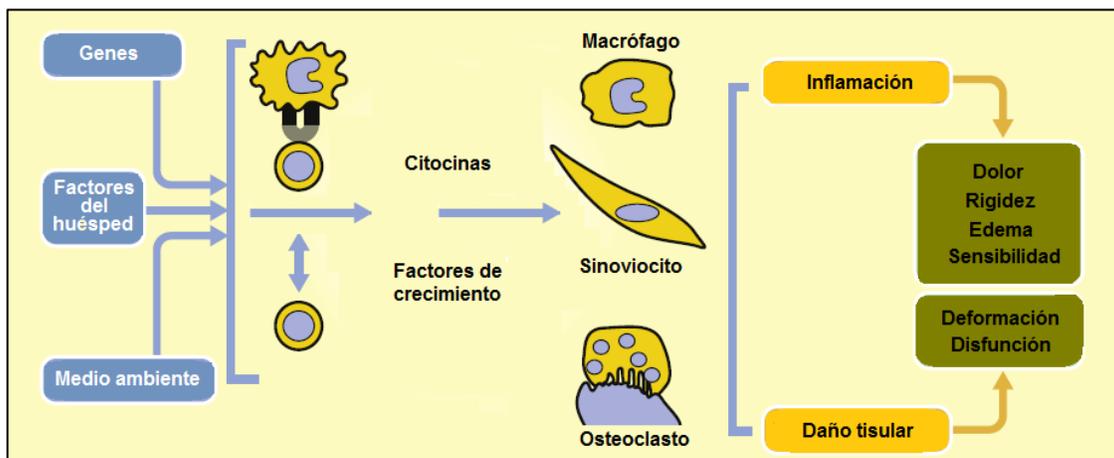


Figura 5. Desarrollo de la artritis reumatoide

[TAYLOR, P. (2014). *Aetiopathology of rheumatoid arthritis*. Medicine. 42; p.228, Figura 1]

Las células B son las principales CPA, que activan a las células T, lo que genera la producción de citocinas, además de la maduración de células B y su diferenciación en células plasmáticas para la producción de autoanticuerpos, como el factor reumatoide¹⁴. La unión de estos autoanticuerpos a muchos autoantígenos que se localizan en la superficie del cartílago favorece la formación de inmunocomplejos y la consiguiente activación local del complemento. Además, los autoanticuerpos pueden actuar como un estímulo autoperpetuador para las células B, pudiendo activar macrófagos y células dendríticas¹⁶.

1.5.4 Liberación de mediadores de la inflamación

La magnitud de la infiltración de macrófagos y células dendríticas se correlaciona con la intensidad de los síntomas en la artritis reumatoide, debido a su intervención en la secreción de citocinas o interleucinas (IL). Las citocinas son mediadores peptídicos de bajo peso molecular que establecen comunicaciones entre células de forma intracrina, autocrina o a distancia. Las citocinas específicas de células T que están involucradas en la inmunidad específica se dividen en 2 categorías: unas implicadas en la respuesta Th1 (T *helper*) o proinflamatoria y otras en la respuesta Th2 o antiinflamatorias. Las citocinas proinflamatorias actúan como moléculas efectoras fundamentales en la sinovitis reumatoide¹⁶. En la Tabla 2,

Tabla 2. Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias importantes en la artritis reumatoide.

Citocinas Th1 o Proinflamatorias	Citocinas Th2 o Antiinflamatorias
IL-1	TNF-R
TNF- α	IL-1ra
IL-12	TGF- β
IL-15	IL-10
IL-17	IL-11
IL-18	IL-13
GM-CSF	IL-16
M-CSF	
MCP-1	
MIP-1	
ENA78	
IL-6	

se muestran algunas citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias importantes que intervienen en el desarrollo de la artritis reumatoide.

1.5.4.1 Citocinas proinflamatorias o Th1

La IL-12 es producida por células dendríticas y por los macrófagos. Induce la producción de otra citocina llamada interferón gamma (IFN γ), misma que es producida por células *natural killer* (NK) y células T y cuya función es conducir al desarrollo de la respuesta Th1, mediante la activación de macrófagos¹⁷.

La IL-15 es producida por macrófagos, sinoviocitos, células T y células NK en líquido y tejido sinovial. Tiene capacidad para favorecer la migración y activación

de células T que, a través de contactos intercelulares con los macrófagos induce la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α)¹⁷.

El TNF- α es una citocina pleiotrópica, cuya liberación aumenta la proliferación de citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y de las enzimas metaloproteinasas (MMP) en la región sinovial, lo que produce la activación local del endotelio vascular, la vasodilatación por liberación de óxido nítrico, aumento en la permeabilidad vascular y adhesión plaquetaria¹⁸.

Los sinoviocitos tipo fibroblasto estimulados con IL-1 y TNF α producen IL-15, que de forma autocrina favorece su proliferación y los hace resistentes a la apoptosis. La IL-18 o factor inducible por IFN γ , induce proliferación, citotoxicidad y producción de citocinas por células Th1 y NK. La combinación de IL-12, IL-15 e IL-18 estimula de forma potente la producción *in vitro* de IFN γ , e induce producción de TNF- α por los macrófagos¹⁶.

La IL-17 es otra citocina producida por las células T de memoria con numerosos efectos proinflamatorios que puede unir los estadios iniciales de perpetuación con fases más avanzadas de sinovitis crónica.

La IL-15 es un potente inductor de IL-17 en las células T y, a través de sus receptores en monocitos y sinoviocitos, induce la producción de enzimas MMP, mismas que generan proteasas y contribuyen en el efecto destructor del cartílago, además de estimular la diferenciación de osteoclastos para degradar el hueso e inhibir su formación¹⁸.

Por su parte, la IL-1 parece estar relacionada con la destrucción del cartílago y el hueso mediante la secreción de MMP. La IL-6 favorece la síntesis hepática de los reactantes de fase aguda, el desarrollo de anemia de proceso crónico, así como otras manifestaciones sistémicas y efectos locales articulares de la enfermedad¹⁷.

Capítulo 1-Aspectos clínicos de la artritis reumatoide

En la Tabla 3, se muestra de forma resumida la célula productora y función de las citocinas proinflamatorias (Th1) que destacan en la etiopatogenia de la artritis reumatoide.

Tabla 3. Células productoras y función de principales citocinas proinflamatorias asociadas en el desarrollo de la artritis reumatoide.

Citosina	Célula productora	Función
TNF-α	Macrófago, linfocito T	Hiperplasia de fibroblastos, producción MMP, expresión de moléculas de adhesión en endotelio, inducción de HLA de clase II.
IL-1	Macrófago	Igual a TNF- α y desmineralización.
IL-2	Linfocito T	Proliferación de linfocitos T, activación de linfocitos B y células NK.
IL-6	Macrófago	Inhibición de MMP, síntesis de reactantes, aumento de Ig.
IL-12	Macrófago, célula dendrítica, NK	Inducción y maduración de Th1.
IL-15	Macrófago, sinoviocito, linfocito T y NK	Igual a IL-2.
IL-17	Linfocito T	Producción de IL-6 e IL-8.
IL-18	Macrófago, condrocitos	Proliferación, citotoxicidad, quimiotaxis de Th1 y producción de MMP.
IFNγ	Linfocito T	Activación de NK y macrófagos, inducción de HLA de clase II.

1.5.4.2 Quimiocinas

Las quimiocinas son péptidos de bajo peso molecular con actividad quimiotáctica muy potente. Son resistentes a la degradación y se caracterizan por su capacidad

para atraer selectivamente a subgrupos de linfocitos T. La secreción de las quimiocinas inflamatorias se induce típicamente por citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, TNF α e IFN γ . Varias quimiocinas han sido detectadas en el tejido y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide¹⁹.

1.6. Tratamiento

1.6.1 Tratamiento farmacológico

Los objetivos del tratamiento van encaminados al control del proceso inflamatorio y el impedimento de la progresión del padecimiento con el fin de mejorar los síntomas, disminuir el daño articular y prevenir la limitación funcional asociada.

A lo largo del tiempo, el tratamiento ha ido cambiando constantemente. Se ha pasado de utilizar sólo antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y glucocorticoides (GCs), a la práctica actual del uso de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs)²⁰.

Los avances en el conocimiento de la inmunopatología, han permitido la identificación de nuevas dianas terapéuticas, dando lugar a los FARMEs biológicos, que aportan esperanzas renovadas a los pacientes²¹.

1.6.1.1 AINEs

Los fármacos de tipo AINEs se aplican en la artritis reumatoide para reducir el dolor y la tumefacción de las articulaciones. Debido a que no alteran la evolución de la enfermedad, no deben administrarse solos²². Su uso es controlado para evitar la aparición de síntomas gastrointestinales que oscilan desde gastritis hasta úlceras gástricas.

1.6.1.2 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son los análogos sintéticos de los corticoides endógenos, que inhiben la producción de citocinas²³. Poseen un efecto modificador del daño

estructural en la artritis reumatoide de corta evolución, por lo que son útiles en las primeras etapas del padecimiento, ya sea solos, o asociados a algún AINEs. Es frecuente que se utilicen como terapia puente para el tratamiento con los FARMES²². La prednisona es el fármaco clásico de este grupo. Se administra de manera oral, intravenosa, intraarticular e intramuscular, en la dosis más baja posible, que por lo general es 5-10 mg/día, debido al riesgo elevado de los efectos colaterales que se pueden presentar, como osteoporosis, cataratas, síntomas cushinoides e hiperglucemia²⁴.

1.6.1.3 FARMES

En la actualidad, el mecanismo de acción de los FARMES no se conoce de forma completa, pero se sabe que producen una inhibición del sistema inmune, modificando el curso de la artritis reumatoide tanto por su actividad inflamatoria como inmunosupresora. El grupo incluye a los fármacos más empleados para el tratamiento de esta enfermedad (Fig.6). En general, la primera elección recae sobre la sulfasalazina o la hidroxicloroquina pero en los casos más graves el tratamiento de primera línea es el metotrexato²⁶. En la Tabla 4, se muestra de forma resumida las características más importantes de algunos de ellos.

1.6.1.3.1 Metotrexato

Los estudios observacionales clínicos y la práctica clínica han demostrado la superioridad del metotrexato (MTX) frente a otros FARMES convencionales en términos de eficacia y toxicidad²⁷.

El MTX posee un efecto inmunomodulador con facultad de modificar la capacidad funcional de diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario²⁶. Actúa inhibiendo de forma competitiva la enzima hidrofolatorreductasa y bloqueando la reducción de ácido fólico a ácido tetrahidrofólico y los derivados folatos²⁷.

Se puede administrar por vía oral o subcutánea, debido a que las concentraciones de fármaco obtenidas en plasma y el área bajo la curva son mayores, en

comparación a otras vías. Siempre se usa una única dosis semanal, empezando con 5-10 mg/semana durante 4 semanas, seguida de 15 mg/semana durante las 4 semanas posteriores, pudiéndose después aumentar hasta 20-25 mg/semana de manera continua. Su administración debe ser conjunta al ácido fólico (5-10 mg/semanal), debido a la inhibición de su formación²⁸. Los efectos secundarios más frecuentes presentados con este tratamiento, consisten en alteraciones gastrointestinales, además de alopecia, fiebre, y síntomas del sistema nervioso central como cefalea, cansancio y dificultad de concentración. Durante el tratamiento con MTX es frecuente la elevación de enzimas hepáticas, pudiendo inducir fibrosis, además de una posible toxicidad medular, que incluye leucopenia, trombopenia y anemia macrocítica²⁷. De esta manera, se requiere de la monitorización continua del tratamiento, que incluye un hemograma y bioquímica que contenga albúmina sérica²⁶.

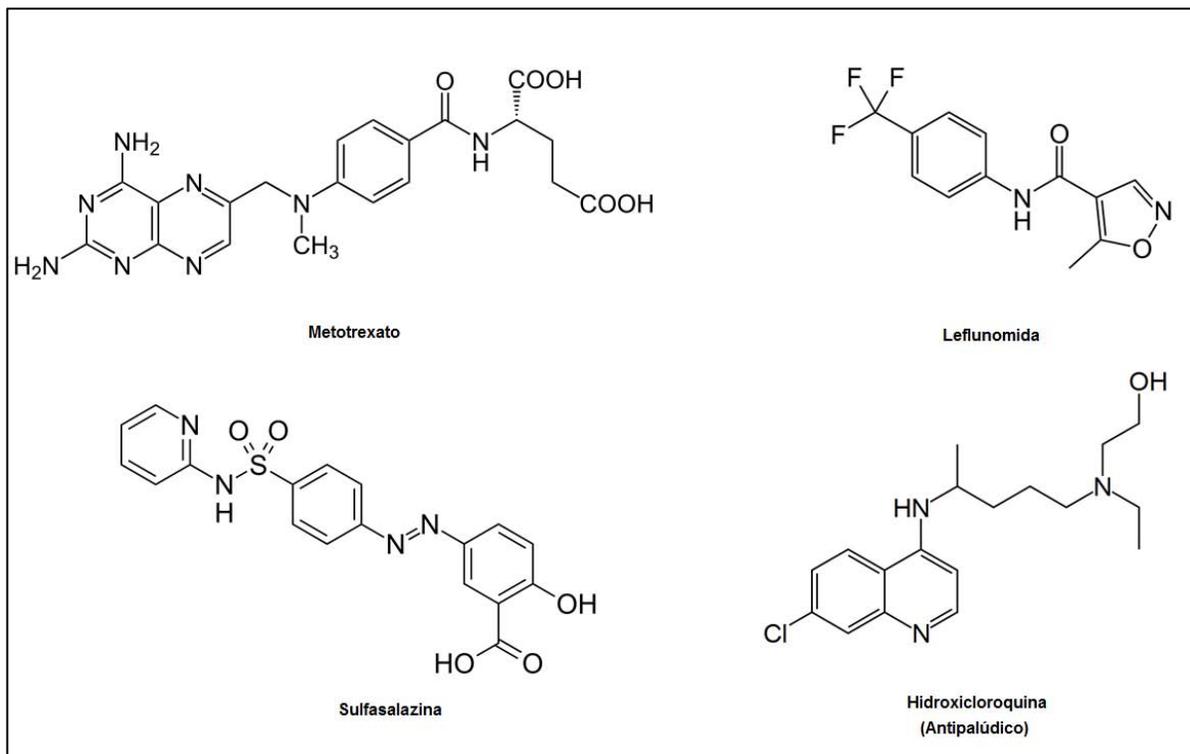


Figura 6. Estructuras químicas de los FARMES más usados para el tratamiento de la artritis reumatoide.

1.6.1.3.2 Leflunomida

La leflunomida (LFN) se considera el fármaco alternativo al MTX cuando este no se tolera o su uso está contraindicado. Es un derivado isoxazólico que se convierte en el metabolito activo en la mucosa intestinal y en el plasma²⁶. Actúa inhibiendo la enzima fumarato deshidrogenasa, ejerciendo una actividad antiproliferativa²⁷.

Su administración es solamente por vía oral, debido a que la LFN debe ser metabolizada para dar el metabolito activo (A771726, antes llamado M1), responsable de la actividad *in vivo*. Se inicia con una dosis de 100 mg/día durante 3 días y se continúa con 20 mg/día de forma permanente. Debe ser utilizado con precaución en pacientes con insuficiencia renal y no está recomendado en pacientes con enfermedad hepática porque su función es necesaria para la conversión de LFN en el metabolito activo. Tras iniciar el tratamiento con LFN se recomienda realizar controles de hemograma, bioquímica hepática incluyendo la albúmina sérica²⁶. Los efectos adversos asociados más frecuentes son diarrea, náuseas y dolor abdominal, así como infecciones respiratorias²⁷.

1.6.1.3.3 Sulfasalazina

El uso de la sulfasalazina (SSZ) está indicado en pacientes con contraindicación tanto a MTX como a LFN. Es un derivado de la mesalazina y pertenece al grupo de las sulfamidas²⁵. Se emplean dosis de 0.5-2.0 g/día²⁶. Su administración es por vía oral y se absorbe solo una pequeña cantidad del fármaco en el intestino delgado. Para su absorción es necesaria la participación de las bacterias del intestino grueso que desdoblan el fármaco en 5-aminosalicílico y sulfapiridina, siendo esta última la responsable de la acción antirreumática del fármaco²⁷.

La mayoría de los efectos adversos se presentan en los primeros meses de tratamiento y su incidencia desciende con la utilización continua. Los más frecuentes son cefalea, vértigo, además de anorexia, náusea, vómito, y dolor abdominal. Puede conllevar a macrocitos, leucopenia y anemia megaloblástica, razón por la que es necesaria la monitorización con un hemograma y bioquímica

basal, cada 4 semanas durante el primer trimestre y cada tres a seis meses posteriormente²⁷.

Tabla 4. Características de FARMES sintéticos empleados para el tratamiento de la artritis reumatoide.

[BOHÓRQUEZ, A., MOVASAT, A., ÁLVAREZ, M. (2014). *Actualización en el tratamiento de la artritis reumatoide*. Medicine. 11; p.4114, Tabla 1].

Principio activo	Dosis	Monitorización recomendada
Metotrexato	15-30 mg semanales Vía oral o subcutánea Administrar conjunta de ácido fólico.	Hemograma y bioquímica en función hepática y renal cada 2 semanas para ajuste de dosis, después cada 4-12 semanas. Biopsia hepática si existe un aumento de transaminasas.
Leflunomida	10-20 mg diarios Vía oral	Hemograma y bioquímica cada 4 semanas los primeros 6 meses. Después cada 8 semanas.
Sulfasalazina	2-3 g diarios divididos en varias toma Vía oral	Hemograma y bioquímica general cada 3 meses, después cada 12 semanas. Análisis de orina.
Hidroxicloroquina	200-400 mg diarios Vía oral	Revisión oftalmológica cada 6-12 meses. Hemograma y bioquímica hepática cada 3 meses.

1.6.1.3.4 Antipalúdicos

Los fármacos del grupo de los antipalúdicos poseen actividad antiinflamatoria e inmunosupresora leve. Actúan inhibiendo la producción de factor reumatoide y

estabilizando las membranas lisosomales, de manera que inhiben la actividad de muchas enzimas como la colagenasa y la proteasa, mismas que producen ruptura del cartílago²⁵. Los fármacos más empleados son cloroquina e hidroxiclороquina, los cuales están indicados en pacientes con actividad reumatoide muy leve y ningún factor de mal pronóstico²⁷. Durante el tratamiento con antiplalúdicos, es importante monitorizar la afectación ocular, puesto que pueden producir alteraciones corneales, así como alteraciones en la retina y defectos en el campo visual²⁴.

1.6.1.4 FARMES biológicos

Durante la última década se han multiplicado las opciones de los FARMES con el desarrollo de nuevos y prometedores fármacos de carácter biológicos, que en general consisten en anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas específicas (anti-TNF- α) y a receptores de interleucinas (IL-1, IL-6), principalmente. Numerosos ensayos clínicos han demostrado la eficacia y la seguridad de la terapia biológica, sin embargo, el seguimiento de estos casos a largo y medio plazo ha sido limitado.²⁸

1.6.1.4.1 Fármacos anti-TNF- α

Los antagonistas del TNF- α han sido la primera terapia biológica aprobada para el tratamiento de la artritis reumatoide. Estos actúan al inhibir la acción del TNF- α , disminuyendo las concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias. Los ensayos clínicos que se han realizado, han demostrado que además de controlar la actividad inflamatoria, evitan la progresión radiológica y mejoran la función física de los pacientes³⁰. Sin embargo, existe cierta controversia ya que su uso se asocia con un mayor riesgo a padecer infecciones oportunistas, el desarrollo de tumores y fenómenos de desmineralización²⁹. Los fármacos más usados son: infliximab, un anticuerpo quimérico del que se administra hasta 5 mg/semana en perfusión intravenosa; etanerceptes una proteína de fusión que consta de la fracción constante de una inmunoglobulina pegada a un receptor de TNF- α , la cual es

administrada por vía subcutánea a una dosis de 50 mg/semana; y el adalimumab, un anticuerpo monoclonal humano que se administra a una dosis de 40 mg una vez cada dos semanas³⁰. En la actualidad existen un número considerable de otros anti-TNF- α que aún se encuentran en desarrollo y serán comercializados en un futuro próximo.

1.6.1.4.2 Fármacos anti-interleucinas

Dentro de los antagonistas de la IL-1 se encuentra el fármaco anakinra, una forma recombinante no glicosilada de dicha interleucina, que ha demostrado una eficacia marginal en la artritis reumatoide, cuando se combina con MTX. Su dosis es 100 mg/día administrados de forma subcutánea. El efecto secundario más frecuente que provoca es el aumento en la frecuencia de infecciones²⁹.

El tocilizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante humanizado que se une al receptor de la IL-6, inhibiendo su señalización celular²⁸. Su dosis es de 8 mg/kg administrados de forma intravenosa cada 4 semanas. Los efectos secundarios más habituales son el aumento en la frecuencia de infecciones, la neutropenia, sobre todo en las primeras ocho semanas desde el inicio del tratamiento, la elevación de enzimas hepáticas, y el aumento de colesterol total y triglicéridos³⁰.

1.6.2 Tratamiento no farmacológico

La cirugía únicamente está dirigida para restaurar la función articular. Puede llegar a disminuir los síntomas y corregir o prevenir deformidades.

La intervención quirúrgica para la artritis reumatoide puede ser de tipo profiláctica o terapéutica. Las cirugías profilácticas tienen por objetivo la extirpación del tejido sinovial inflamado en un intento de mejorar la función articular, mientras que las cirugías terapéuticas ayudan a aliviar el dolor en situaciones donde la destrucción de las articulaciones y la ruptura del tendón ya están presentes³¹.

Capítulo 2

2. Patogenia en la artritis reumatoide

2.1 Sistema óseo

El esqueleto es una estructura dinámica constituida por huesos. El hueso es un tejido mineralizado que está soportado por estructuras conectivas complementarias como ligamentos, tendones, músculos y cartílagos. La unidad fundamental del hueso es el osteocito. El hueso se compone aproximadamente de 70% de compuestos inorgánicos, principalmente de hidroxapatita; un 22% de materia orgánica, mayoritariamente colágeno tipo I; y 8 % de agua³². Los huesos poseen una cubierta superficial de tejido conectivo fibroso que se denomina periostio y de tejido conectivo cartilaginoso que recubre las superficies articulares. Así mismo se encuentra inervado de vasos sanguíneos y nervios³³. Morfológicamente hay dos tipos de hueso: trabecular del hueso poroso, también conocidos como hueso esponjoso, y el hueso cortical denso, también conocido como hueso compacto.

2.1.1 Proceso de remodelación ósea

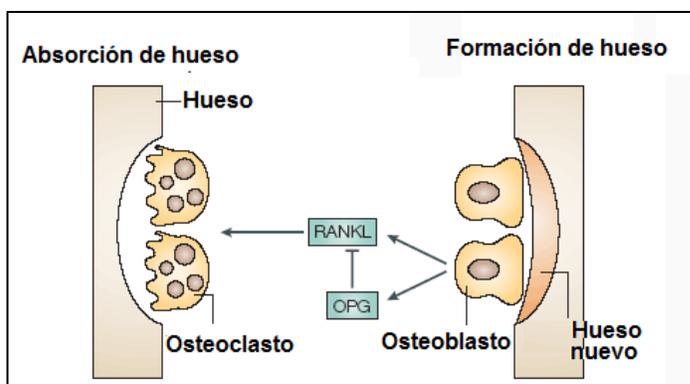


Figura 7. Elementos que intervienen en el proceso de remodelación ósea.

[LOGOTHETIS, C., LIN, S. (2005). *Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone*. *Nature Reviews Cancer*. 5 (1); 21 (Figura 2)]

El mantenimiento de la masa ósea que conforma al hueso depende del equilibrio entre los procesos de degradación osteoclástica y el de formación osteoblástica³⁴. Los osteoclastos se forman por fusión de los monocitos y macrófagos, para constituir células gigantes multinucleadas que tienen la capacidad de expresar a la catepsina K, la fosfatasa ácida

resistente al tartrato (TRAP) y al receptor de la calcitonina, los cuales permiten la reabsorción de hueso. La formación de osteoclastos requiere la presencia del factor estimulante de colonias para precursores de macrófagos (M-CSF) y al ligando de receptor activador para NF- κ B (RANKL). RANKL puede ser producido por fibroblastos sinoviales, células estromales de la médula ósea, linfocitos, células del músculo liso vascular y las células cebadas³⁵.

La regulación de la diferenciación de los osteoclastos también se ve afectada por la osteoprotegerina (OPG), un receptor homólogo de RANK, que bloquea la interacción RANKL–receptor RANK³⁴. OPG es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF- α y es expresado por fibroblastos sinoviales, osteoblastos y células endoteliales³⁵.

Los osteoclastos se encuentran solamente cerca del tejido mineralizado. Cuando OPG se activa, éstos se trasladan a las zonas de microfracturas en el hueso por quimiotaxis. La resorción se inicia cuando los osteoclastos migrantes se adhieren a la matriz ósea, lo que conduce a la reorganización del citoesqueleto y la polarización celular. Los osteoclastos segregan protones a través de la ATPasa en el compartimiento extracelular, llegando a formar un ambiente ácido menor a un pH de 3, lo que propicia la disolución de los minerales en los huesos. Esto es seguido por la secreción de enzimas proteolíticas para la degradación de la matriz de colágeno no mineralizado expuesta³⁵. Los residuos formados son procesados extracelularmente o tomados por los osteoclastos por endocitosis para ser degradados en los lisosomas. Una vez degradado el hueso, los osteoblastos producen la matriz particular que conforma al hueso, preservando la estructura y función de éste³⁴ (Fig. 7).

2.2 Sistema articular

La articulación es la unión de dos o más huesos. Según su movilidad, pueden ser sinartroidales, cuando no poseen movimiento y están unidas por tejido fibroso, como los huesos del cráneo; anfiartroidales, cuando su movilidad es mínima y su

unión se debe a la presencia de fibrocartílago, como las articulaciones de la columna vertebral; y diartroidales o sinoviales, que permiten un amplio rango de movimiento y constituyen al tipo de articulación más numerosa que conforman al organismo, como la cadera, rodilla, codos, articulaciones de manos y pies.³⁶

2.2.1 Anatomía y fisiología de la articulación diartrodial

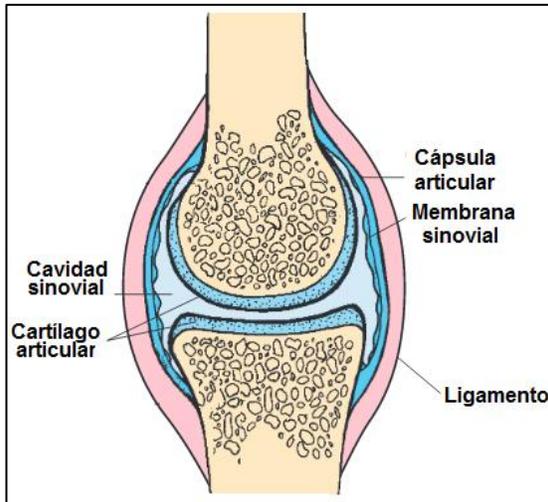


Figura 8. Elementos estructurales que componen a la articulación diartrodial.

[OATIS, C. A., (2003). *Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*. Baltimore: Lippicott Williams and Willkins, p. 254 (Fig. 11-1)]

La articulación diartrodial es una estructura especializada compuesta de tejido conjuntivo, cuya función principal es posibilitar la locomoción.

Estructuralmente se compone de dos extremos recubiertos por cartilago articular tipo hialino, los cuales se encuentran unidos por la cápsula articular y por ligamentos que mantienen su contacto, además de una membrana sinovial que la recubre y la lubrica con líquido sinovial³⁶ (Fig. 8).

2.2.1.1 Cápsula articular

La cápsula articular es una membrana que rodea a la articulación. Su principal función es asegurar el contacto entre los elementos articulares, impidiendo su desplazamiento excesivo. Consta de una capa externa o estrato fibroso, formado por tejido conectivo denso y una capa interna denominada membrana sinovial³⁷.

2.2.1.2 Membrana sinovial

La membrana sinovial es una fina estructura especializada que tapiza la cavidad sinovial de la articulación diartrodial. Se inserta en la interfase hueso-cartilago y se

prolonga hacia la región extraarticular. Está constituida por dos capas: la capa sinovial y una capa subíntima, más profunda y menos definida, compuesta de tejido conjuntivo vascularizado³⁸.

2.2.1.2.1 Capa íntima

La capa íntima o sinovial consta de 1 a 4 estratos celulares enredados en una red de matriz extracelular³⁸. Es la capa funcional de la membrana sinovial. Se ha demostrado en microscopia electrónica que es discontinua y que en algunos puntos, la matriz extracelular está en contacto con la cavidad sinovial (Fig. 9). No posee estructuras de uniones estrechas células-células, ni membrana basal, lo que le confiere su propiedad semipermeable. La ausencia de membrana basal hace que las

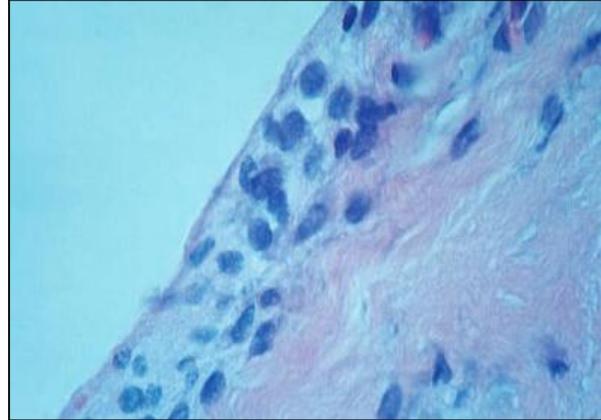


Figura 9. Membrana sinovial de articulación de rodilla.

[MCLATCHEY, K.D., (2002). *Clinical Laboratory Medicine*. 2° edición. Lippincott Williams and Wilkins. p. 254 (Fig. 11-2)]

células sean más móviles, lo que evita las sobrecargas mecánicas en los movimientos articulares³⁹. Está formada fundamentalmente por 2 tipos celulares denominados sinoviocitos de tipo A o macrófagos sinoviales, y los de tipo B o fibroblastos. Los macrófagos sinoviales son células fagocíticas con características similares a los macrófagos tisulares residentes en otros tejidos conjuntivos. Los fibroblastos sinoviales tienen funciones sintéticas relacionadas con la homeostasis de la matriz extracelular y la secreción de componentes esenciales del líquido sinovial³⁸.

2.2.1.2.2 Capa subíntima

En esta capa predominan los fibroblastos y los macrófagos, que se acumulan inmediatamente por debajo de la capa superficial y alrededor de los vasos

sanguíneos. Puede contener algunos mastocitos y adipocitos. Según las localizaciones, la subíntima es de tipo areolar, adiposo o fibroso³⁹.

2.2.1.3 Líquido sinovial

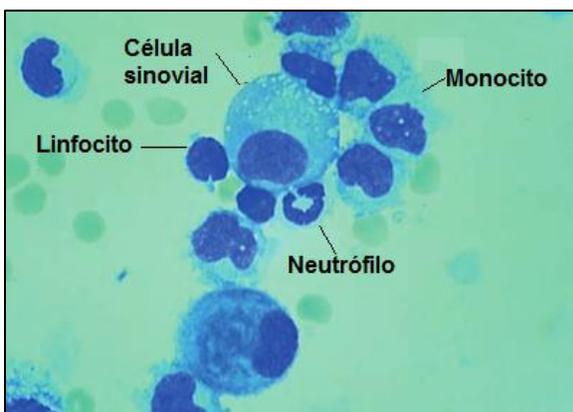


Figura 10. Elementos celulares presentes en líquido sinovial vistos con tinción de Wright-Giemsa.

[MCLATCHEY, K.D., (2002). *Clinical Laboratory Medicine*. 2° edición. Lippincott Williams and Wilkins. p. 257 (Fig. 11-9)]

El líquido sinovial es un dializado de plasma modificado que contiene componentes secretados por tejidos articulares (Fig. 10). Se diferencia de otros fluidos derivados del plasma debido a su alto contenido de ácido hialurónico, lo que le confiere una consistencia viscosa⁴⁰.

El ácido hialurónico es secretado por los fibroblastos de la capa íntima de la membrana sinovial. Es un polisacárido no sulfatado, que está compuesto por cantidades equimolares de ácido D-glucurónico y residuos de N-acetil-D-glucosamina⁴¹. Dado que el cartílago articular no contiene conductos sanguíneos ni linfáticos, el líquido sinovial contribuye en su nutrición al propiciar suministro de glucosa para los condrocitos. Otra de sus funciones consiste en la regulación de la función mecánica de las articulaciones debido a su capacidad lubricante.

El volumen normal del líquido sinovial varía de una articulación a otra. El pH oscila desde 7.0-7.8⁴². Su contenido proteico es principalmente derivado del plasma. El paso de las proteínas del plasma al líquido sinovial está relacionado con el tamaño y forma de las proteínas. La mayoría de las proteínas con pesos moleculares menores a 100000 Da se transfieren fácilmente⁴¹. Por otro lado, la cantidad de células que componen al líquido sinovial varían de una articulación a otra, pero normalmente es baja. Los linfocitos, tanto B como T, son los que más prevalecen.

Los monocitos y los neutrófilos también están presentes, mientras que los macrófagos son vistos sólo ocasionalmente. Se cree que la función principal de las células mononucleares es la eliminación de los desechos que aparecen en las articulaciones en el uso normal⁴².

2.2.1.4 Cartílago articular

El cartílago articular es el tejido que recubre los extremos óseos que se ponen en contacto a nivel articular. Está compuesto por una importante red de fibras de colágeno tipo II y proteoglicanos, fabricados por las células nobles del cartílago, denominadas condrocitos y agrecano⁴³.

El agrecano es una proteína de 2500 kDa, que constituye el componente principal del proteoglicano de la matriz extracelular del cartílago. El agrecano junto con el colágeno del tipo II son componentes fundamentales para la estructura y la función del cartílago de las articulaciones. Adicionalmente, el agrecano es capaz de retener grandes cantidades de agua en un espacio muy limitado proporcionando elasticidad y flexibilidad al cartílago, permitiéndole amortiguar golpes.

Los condrocitos son las células que constituyen al cartílago. Desempeñan un papel clave en el mantenimiento de su homeostasis. Estas células se conforman por tres regiones distintas. La región pericelular, que se encuentra próxima a la superficie de la célula y permite la transmisión de señales mecánicas y bioquímicas provenientes de la matriz extracelular. La región territorial que es adyacente a la región pericelular y proporciona protección hidrodinámica contra cargas mecánicas. Finalmente, la región interterritorial que es la más externa y contribuye principalmente a las propiedades mecánicas del cartílago.

El colágeno es la macromolécula más abundante de la matriz extracelular. El colágeno tipo II (Coll- II) constituye el 90 % del colágeno del cartílago y forma bandas de asociación con los colágenos tipo IX y XI (Collo- IX y Coll- XI). Estas fibras se entrecruzan por los proteoglicanos y la proteína oligomérica de la matriz del cartílago⁴⁴.

2.2.1.5 Meniscos y ligamentos

Los meniscos son elementos constituidos por cartílago fibroso, que se localizan únicamente en algunas articulaciones, como lo son las rodillas, las radiocarpianas y las temporo-mandibulares. Su función es brindar estabilidad a las articulaciones³⁶. Los ligamentos son estructuras de tejido conectivo denso organizado, encargadas de mantener los extremos óseos articulares en contacto.

2.3 Alteraciones patológicas en la artritis reumatoide

2.3.1 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por medio del cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Constituye un aspecto importante en el desarrollo de tejido nuevo, así como en su crecimiento y reparación. En circunstancias normales no se produce angiogénesis, por lo que las células endoteliales se encuentran inactivas⁴⁵. La activación excesiva y prolongada de éstas células ocurre por un proceso complejo que involucra mediadores relacionados en la patogénesis de la artritis reumatoide, tales como citocinas, quimiocinas, proteasas, factores de crecimiento y de adhesión, así como componentes de la matriz extracelular⁴⁶.

Para su desarrollo, los factores angiogénicos activan células endoteliales, que producen enzimas proteolíticas como la MMP y los activadores del plasminógeno. Esto resulta en la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular perivascular. Las células endoteliales proliferan y forman *loops*, permitiendo la generación de nuevos capilares. Estos nuevos vasos sanguíneos suministran nutrientes y oxígeno a la masa celular inflamada, promoviendo la llegada de leucocitos, lo que genera la activación inmunológica de la zona⁴⁷.

2.3.1.1 Mediadores de la angiogénesis

El aumento de algunos factores de crecimiento endotelial ha sido detectado en pacientes con artritis reumatoide. Un mediador importante de la angiogénesis es el

factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que funge como quimioatrayente de células endoteliales, monocitos y polimorfonucleares, que aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos, induciendo la vasodilatación. Otras funciones del VEGF es generar la liberación de los factores implicados en la remodelación de los vasos sanguíneos y coagulación de la sangre⁴⁶. Además de ejercer efectos mitogénicos sobre células endoteliales y mejorar la adhesión de los leucocitos. La angiopoyetina-1 (Y-1) es otro factor de crecimiento que estimula a la neovascularización. Se expresan sólo en las células endoteliales, promoviendo la generación de vasos sanguíneos inmaduros. De esta manera, VEGF y Y-1 ejercen un efecto sinérgico que influye en la formación de vasos sanguíneos⁴⁸.

2.3.2 Desarrollo del *pannus*

El proceso de neoangiogénesis aumenta la expresión de las moléculas de adhesión, favoreciendo la presencia de neutrófilos, linfocitos T, células B, monocitos y células plasmáticas en el espacio articular⁴⁹.

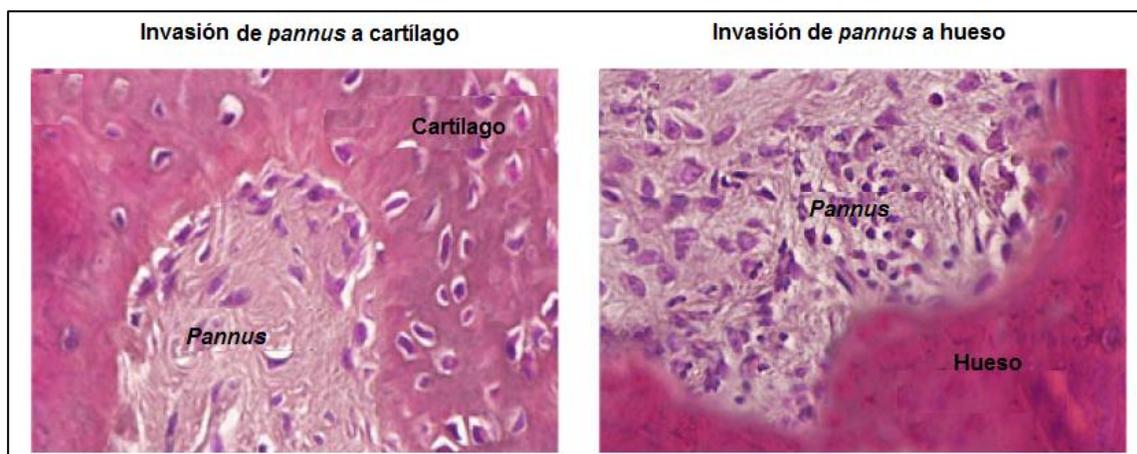


Figura 11. Invasión de *pannus* a cartilago y hueso en artritis reumatoide.

[AINOLA, M., (2009). *Pannus invasion into cartilage and bone in rheumatoid arthritis*. Faculty of Medicine of the University of Helsinki. p. 21 (Figura 4d y 4e)]

La articulación sufre hipertrofia e hiperplasia que con el progreso de la enfermedad, da lugar al cambio histológico más característico de la artritis reumatoide: la formación de un tejido de granulación, invasivo, altamente vascularizado, denominado *pannus*. Este tejido está compuesto

fundamentalmente por sinoviocitos y macrófagos activados. Los condrocitos activados producen las MMP que degradan la matriz cartilaginosa. La progresiva destrucción del cartílago da lugar al ensanchamiento del espacio articular. La invasión del *pannus* en el hueso, que comienza en la zona de unión a la sinovial, provoca erosiones óseas y acaba destruyendo el hueso subcondral, la cápsula, tendones y ligamentos⁵⁰ (Fig. 11).

2.3.3 Medio hipóxico

A pesar de la generación de nuevos vasos sanguíneos, las articulaciones afectadas en la artritis reumatoide residen en un medio hipóxico. Esto se debe a la proliferación de células sinoviales activadas, que causa una creciente demanda metabólica de oxígeno y nutrientes que al ser insuficientes resulta en hipoxia local. El factor de transcripción inducible a hipoxia tipo 1 (HIF-1) es el regulador clave de la respuesta celular a la hipoxia y se presume como un factor clave en el crecimiento tumoral. Este factor presenta dos subunidades α y β , las cuales responden a la presión de oxígeno en el interior de la célula.

Cuando la célula está en condiciones de hipoxia, HIF-1 estimula la liberación de VEGF que favorece la angiogénesis. Se ha encontrado que en tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide existe una expresión aumentada de HIF-1⁵⁰.

La presión media de oxígeno en el líquido sinovial de individuos sanos oscila cerca de los 63 mmHg, mientras que pacientes con artritis reumatoide se alcanzan niveles menores a 10 mmHg. Se ha determinado que la presión de oxígeno se correlaciona con la severidad histológica de la inflamación⁵¹.

2.3.4 Cambios en el líquido sinovial

El aspecto del líquido sinovial puede variar en pacientes con artritis reumatoide. En algunos casos puede lucir normal, pero también se han encontrado exudados purulentos.

El color del líquido sinovial varía dependiendo del tipo y el número de los constituyentes celulares presentes. Un gran número de eritrocitos imparten un color sanguinolento al fluido. Por lo general se aprecia un recuento de glóbulos blancos excesivo, además de células fagocíticas. Los linfocitos, monocitos y células de tipo macrófago predominan en los fluidos de baja celularidad⁵². La viscosidad del fluido sinovial por lo general disminuye, debido a un decremento en los niveles de ácido hialurónico que lo compone.

El aumento de los recuentos de glóbulos blancos se observó en pacientes humanos con diversas formas de artritis aguda y crónica. Por otro lado, se ha encontrado una alta cantidad de colagenasas en fluidos sinoviales inflamatorios, que son producidas por células de membrana sinovial y por los leucocitos polimorfonucleares⁵³.

Adicionalmente, los niveles de líquido sinovial de las prostaglandinas son elevados. Los estudios in vitro han mostrado un incremento en la síntesis de prostaglandinas por la membrana sinovial reumatoide y la promoción de la resorción ósea y la destrucción del cartílago articular por presencia de ésta⁵³.

2.3.5 Erosión de hueso

Una característica común de la artritis reumatoide es la pérdida o erosión de hueso articular focal, que se hace evidente desde fases tempranas en el proceso de la enfermedad. Esto se debe a una expresión aumentada de RANKL/OPG, debido a una dominancia de condiciones pro-osteoclastogénicas en el microambiente de la articulación⁵⁴.

Las erosiones ocurren en sitios donde el *pannus* invade el hueso cortical, subcondral y en los

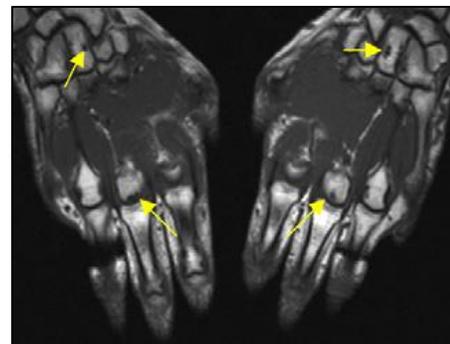


Figura 12. Zonas de erosión ósea en manos.

[FOUQUE, A. *et al.* (2010). *A comparative review of the different techniques to assess hand bone damage in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*.7; p. 213 (Figura 1)]

espacios medulares adyacentes. En última instancia, también se pierde hueso trabecular del esqueleto apendicular y axial, lo que con el tiempo resulta en un aumento del riesgo de fractura⁵⁵ (Fig. 12).

2.3.6 Degradación de cartílago

Los factores producidos por la inflamación sinovial implicados en la regulación de la remodelación del hueso también afectan a la función de los condrocitos. Entre los efectos de productos favorecedores de la regulación que mejoran la degradación de la matriz, y que también pueden suprimen la síntesis y reparación de ésta se encuentran IL-1 y TNF- α ⁵⁵. La IL-1 estimula los condrocitos para aumentar la producción de MMP y otros productos de degradación tales como el óxido nítrico. Algunos estudios han demostrado que los efectos de TNF- α son sinérgicas a IL-1⁵⁵. Además contribuye en la sobrerregulación de productos de degradación. Estas citocinas genera el agotamiento de la matriz del cartílago, debido a la disminución de la síntesis de colágenos y proteoglicanos específicos de cartílago. La pérdida de agregano se considera como un paso inicial durante la degradación del cartílago, seguido por el debilitamiento de la red de fibras de colágeno, lo que da paso a la degradación enzimática y biomecánica. Se ha sugerido que la degradación del cartílago no mineralizado es mediada principalmente por el tejido de *pannus* sinovial⁵⁶ (Fig. 13).

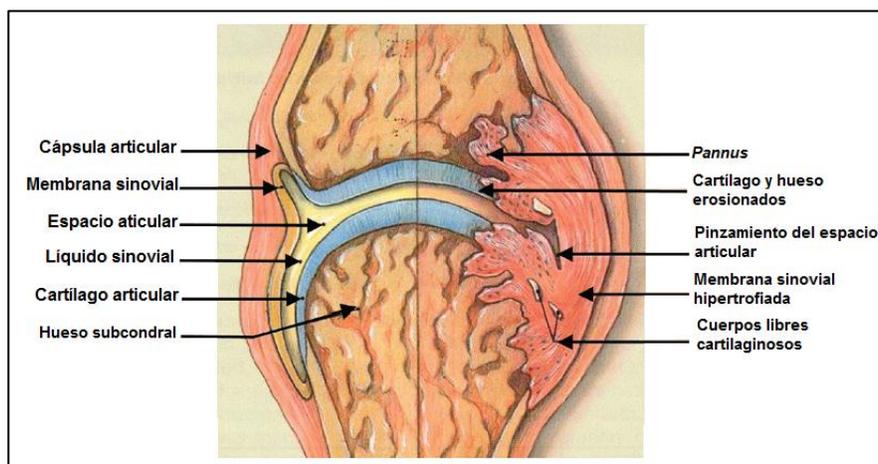


Figura 13. Comparación entre articulación sana y articulación con artritis reumatoide.

[GARCÍA, R. ORTIZ A. (2005) *Artritis reumatoide (I): Etiopatogenia*. Medicine. 9 (28); 1806 (Figura 1)]

Capítulo 3

3. Sistemas de liberación de fármacos

La forma farmacéutica es la disposición individualizada a la que se adaptan los principios activos y excipientes para poder ser administrados al organismo, permitiendo la adecuada dosificación, conservación y administración del fármaco. En la actualidad los principios activos pueden administrarse al organismo en sistemas convencionales, que son los típicamente empleados, pero también pueden variarse algunos aspectos de su liberación, en un sistema no convencional.

3.1 Sistemas convencionales

Existen muchas desventajas asociadas al empleo de las formas farmacéuticas convencionales, tales como su no especificidad, ligada a su liberación inmediata.

Las formas farmacéuticas de tipo convencional liberan sus componentes activos de manera inmediata. La vía que siguen implica la liberación del fármaco antes que su distribución, por lo que ésta no es específica. De este modo, el principio activo se distribuye en el organismo según sus propiedades físicas, tales como solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar una gran variedad de sitios, pudiendo llegar a ejercer una acción indeseada o nociva, que se traduce en efectos secundarios negativos⁵⁷.

Las formas farmacéuticas convencionales poseen una incapacidad para controlar la liberación temporal. Existen diversas estrategias para intentar mantener los niveles del fármaco en la sangre dentro del rango terapéutico por largos periodos, por ejemplo, aumentar la dosis inicial, sin embargo pueden alcanzarse niveles tóxicos en tiempos tempranos, lo cual resulta impráctico. Otra alternativa es una terapia multidosis, que consiste en la administración repetida del principio activo, a través de un intervalo de dosis frecuente. Existen varios problemas potenciales ligados a la terapia de dosis múltiple. En primer término, si el intervalo entre dosis no es apropiado para la vida media del fármaco, pueden aparecer grandes picos y

valles en los niveles sanguíneos del fármaco, además que el nivel de fármaco en la sangre podría no encontrarse dentro del rango terapéutico en tiempos tempranos, lo cual debe considerarse en algunos estados patológicos. Finalmente, se dificulta el cumplimiento del paciente con el régimen multidosis, lo cual puede resultar en el fracaso de esta estrategia (Fig. 14).

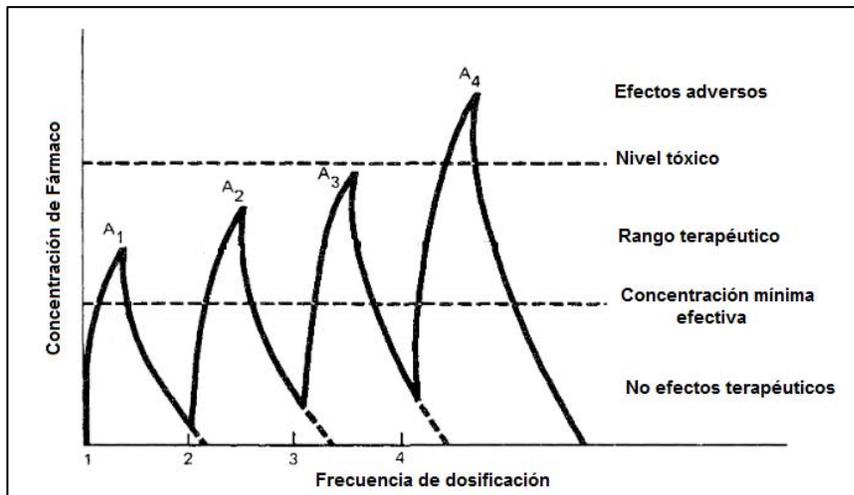


Figura 14. Perfil de concentración hipotética de fármaco con liberación inmediata con terapia multidosis.

[CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2^o edición Informa Medical p.2 (Imagen 1)]

3.1.1 Vías de administración

El tratamiento convencional de la artritis reumatoide incluye la administración de fármacos, mediante principalmente tres vías: oral, intravenosa, subcutánea e intraarticular. En la Tabla 5 se muestra una recapitulación de información de interés referente de los fármacos más empleados que son formulados de manera convencional.

3.1.1.1 Vía oral

La vía oral es la ruta más común y preferida para la administración de fármacos. La mayoría de los principios activos utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide es por vía oral. Esta forma de administración resulta práctica y cómoda. Sin embargo debe plantearse un mecanismo de liberación modificada que permita la concentración del fármaco en los sitios patológicos, para la obtención de tratamientos más eficientes. En formulaciones convencionales, su

administración frecuente, puede conllevar a varios efectos secundarios tales como hemorragias gástricas, necrosis renal, síndrome nefrótico, y lesiones hepáticas⁵⁸.

3.1.1.2 Vía parenteral

Los productos parenterales se inyectan a través de la piel o de las membranas mucosas en compartimentos internos del cuerpo, ya sea de forma intravenosa o subcutánea. Existen varios fármacos antirreumáticos que se administran mediante esta vía, debido a que implica numerosas ventajas que incluyen, un efecto terapéutico más rápido y seguro, que evita el efecto del primer paso. Sin embargo, también presenta algunas desventajas. En primer término se trata de un método invasivo que genera dolor e incomodidad. Para la vía intravenosa, debido a su administración directa a la sangre, puede existir un aclaramiento renal rápido, lo que obliga a la administración frecuente del fármaco⁵⁹.

3.1.1.3 Vía intraarticular

La singularidad de la administración de fármacos por vía interarticular radica en que éstos se liberan en las proximidades de la articulación, lo que es ideal para la artritis reumatoide. De este modo, sólo una cantidad mínima del principio activo es requerida para ejercer la actividad farmacológica deseada, de manera que se minimiza la exposición del fármaco a otros sitios.

Algunas ventajas de la utilización de la ruta intraarticular incluyen la posibilidad de administrar altas concentraciones de fármaco en un sitio específico, disminuyendo los efectos sistémicos. También puede ser una opción para principios activos con baja biodisponibilidad oral y para pacientes que no responden o son intolerantes a los demás tratamientos⁶⁰. A pesar que la vía intraarticular ofrece una terapia más directa a zonas afectadas, se trata de un método invasivo, que requiere de la repetitiva punción de la articulación, lo que la lesiona e incrementa el riesgo de contraer infecciones.

3.1.2 Terapia convencional en la artritis reumatoide

Tabla 5. Dosis y precios de medicamentos convencionales empleados comúnmente para el tratamiento de la artritis reumatoide.

[Agency for Healthcare Research and Quality, (2008). *Choosing Medications for rheumatoid arthritis: Clinician's Guide*. No. 08-EHC004-3, p. 4 (Tabla 2)].

Fármaco	Marca	Dosis	Precio por mes	
			Genérico	Innovador
FARME sintético-Vía oral				
Hidroxicloroquina	Plaquenil®	400 mg/día	\$1,400	\$2,500
Leflunomida	Arava®	10 mg/día	\$9,900	\$11,400
		20 mg/día	\$9,900	\$11,400
Metotrexato	Rheumatrex® Trexall®	7.5 mg/semana	\$800	\$900
		15 mg/semana	\$1,600	\$1,800
		20 mg/semana	\$2,100	\$2,400
Sulfasalazina	Azulfidine® Sulfazine®	500 mg/8 horas	\$300	\$600
		1000 mg/8 horas	\$600	\$1,200
		1500 mg/8 horas	\$900	\$1,700
FARME biológico-Vía subcutánea				
Adalimumab	Humira®	40 mg/2 semanas	NA	\$31,700
Anakinra	Kineret®	100 mg/día	NA	\$28,900
FARME biológico-Vía intravenosa				
Infliximab	Remicade®	3 mg/kg/8 semanas	NA	\$14,600
		6 mg/kg/8 semanas		\$29,300
		10 mg/kg/8 semanas		\$48,800
		semanas		
Rituximab	Rituxan®	1000 mg/2 semanas	NA	\$20,300
Glucocorticoides-Vía oral				
Prednisonona	Varios	5 mg/día	\$300	\$500
		7.5 mg/día	\$500	\$800
		10 mg/día	\$600	\$1,100
Prednisona	Varios	5 mg/día	\$40	\$60
		7.5 mg/día	\$60	\$100
		10 mg/día	\$60	\$120

La mayoría de los fármacos antirreumáticos que en la actualidad se comercializan se presentan en formas farmacéuticas de tipo convencional, por lo que poseen una liberación inmediata no específica, que conlleva a una distribución sistémica en el organismo, ocasionando una menor biodisponibilidad y eficacia del fármaco, además del desarrollo de efectos adversos. Esto genera que los objetivos buscados en los tratamientos para la artritis reumatoide sólo se consigan en una pequeña proporción de los pacientes, por lo que la remisión parcial de la enfermedad y las recaídas son un problema común. Además que un número significativo de individuos todavía no responde en absoluto a los tratamientos disponibles. Todo esto aunado al elevado coste de los tratamientos, ocasiona que la artritis reumatoide sea una enfermedad con un tratamiento poco práctico. En la tabla 5, se muestran las marcas de los medicamentos empleados y su precio.

3.2 Sistemas no convencionales

Los principales inconvenientes que presentan las formas farmacéuticas convencionales han creado la necesidad de generar nuevas estrategias farmacéuticas, que sean capaces de brindar una acción prolongada y específica del fármaco en cuestión.

3.2.1 Liberación modificada

Las formas farmacéuticas no convencionales pueden diseñarse de manera que se disminuya la velocidad de liberación del fármaco o que la liberación de éste se dé después de alcanzar una zona específica de acuerdo a las características físicas, químicas o biológicas de la enfermedad o del principio activo. La liberación modificada puede ser retardada y extendida, prolongada o sostenida.

3.2.1.1 Liberación retardada

Las formas farmacéuticas de liberación retardada son sistemas que liberan al principio activo en un momento no inmediatamente a su administración. Por lo general, se utilizan para proteger al fármaco de la degradación ocasionada por el medio ácido del estómago o para proteger al estómago de la irritación por el

principio activo. Además, en otras vías como la intravenosa se puede controlar la liberación del fármaco en pH específicos (Fig. 15).

3.2.1.2 Liberación extendida, prolongada o sostenida

Los sistemas de liberación prolongada permiten que el fármaco se libere durante períodos de tiempo alargados. De este modo, al extender el perfil de liberación de un principio activo, la frecuencia de dosificación puede reducirse (Fig. 15).

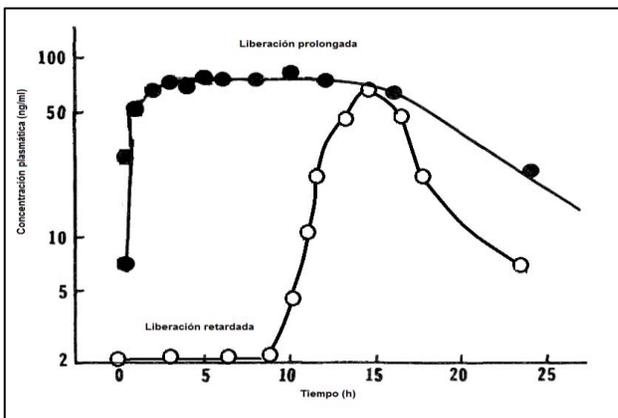


Figura 15. Concentración hipotética de fármaco con liberación prolongada y retardada en función al tiempo.

[CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2° edición Informa Medical p.2
(Imagen 2)]

3.3 Clasificación de sistemas de liberación modificada

3.3.1 Sistemas de velocidad preprogramada

En este grupo de sistemas farmacéuticos, la liberación del principio activo es preprogramada a una velocidad específica. Las características de estos sistemas de liberación permiten su clasificación en sistemas reservorios o capsulares y matriciales o monolíticos⁶¹.

3.3.1.1 Sistemas reservorios

Los sistemas reservorios, también llamados capsulares constan de un compartimento donde se aloja el fármaco, el cual está rodeado por una membrana o cápsula. El grado de liberación del principio activo depende de la naturaleza de la membrana, del tipo de material empleado y su grosor⁶², así como de las características fisicoquímicas del fármaco y su interacción con la membrana (Fig. 16).

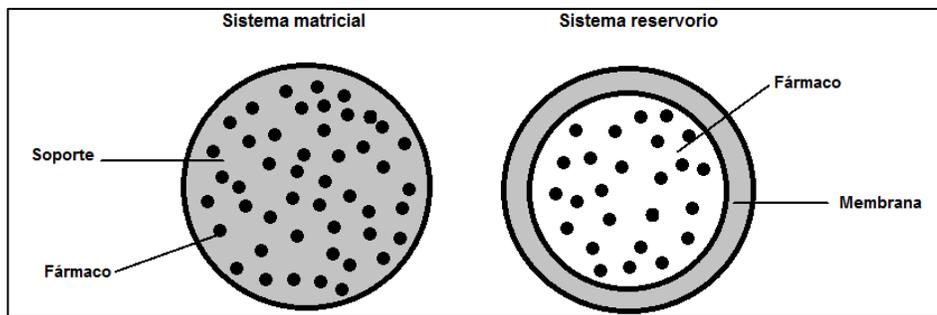


Figura 16. Esquema comparativo de un sistema matricial y reservorio.

3.3.1.2 Sistemas matriciales

Los sistemas matriciales o sistemas monolíticos están compuestos por el fármaco homogéneamente disperso en un soporte que controla su liberación. De acuerdo al material que las conforma y a su mecanismo de liberación, estos sistemas pueden ser inertes, hinchables y erosionables⁶³ (Fig. 16).

3.3.1.2.1 Matrices inertes

También conocidas como matrices plásticas. Son matrices no solubles ni desintegrables, compuestas por una red porosa. Para su disolución se requiere de la disolución del fármaco, una vez disuelto, penetra en la red porosa del sistema por capilaridad, difundiendo a través de los canales de la misma⁶³.

3.3.1.2.2 Matrices hinchables

Por lo general están compuestas de materiales hidrofílicos. Cuando entran en contacto con agua o fluidos biológicos, forman una barrera de gel, denominada frente de hinchamiento, que controla la velocidad de salida del fármaco, el cual se disuelve y difunde hacia el exterior. Aunado al proceso de difusión, se sabe que puede existir un proceso de erosión de la matriz⁶⁴.

3.3.1.2.3 Matrices erosionables

Normalmente las conforman matrices lipídicas. Su liberación se da por un proceso de degradación de la superficie por lipólisis que conlleva a la formación de canales por donde difunde el fármaco disuelto⁶³.

3.3.2 Sistemas modulados por activación

Estos sistemas son activados por un estímulo físico, químico o bioquímico, mismo que es seleccionado de acuerdo a la naturaleza y características de la patología a la cual son destinados. De esta forma la liberación del fármaco es exclusiva a las condiciones a las cuales es programada⁶¹.

3.3.3 Sistemas vectorizados

Este tipo de sistema contienen un elemento direccionador que lo lleva a un sitio específico, en el cual libera su contenido⁶¹. La especificidad de acción del vector, mejora la actividad terapéutica del fármaco con dosis menores, además que evita la generación de efectos adversos (Fig. 17).

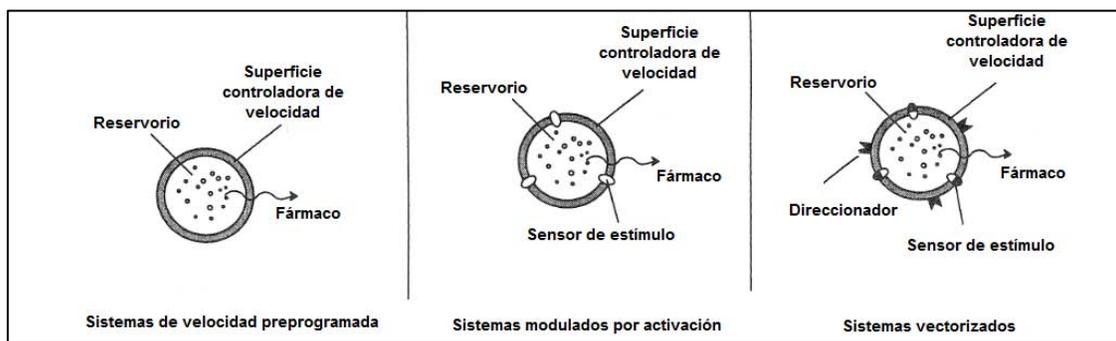


Figura 17. Tipos de sistemas de liberación controlada.

[CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2° edición Informa Medical p.4 (Imagen 3)]

3.4 Materiales

Los sistemas de liberación modificada son principalmente elaborados a partir de polímeros, sin embargo, también se suelen emplear con frecuencia algunos tipos de lípidos y en la investigación actual se han empezado a utilizar materiales de tipo inorgánico.

3.4.1 Polímeros

Los polímeros son sustancias de alto peso molecular formadas por unidades químicas simples repetidas, denominadas monómeros. Estructuralmente pueden encontrarse en forma lineal o ramificarse formando retículos tridimensionales.

Dependiendo del tipo de unidades monoméricas que los conforman pueden ser homopolímeros cuando se constituyen por la misma unidad o copolímeros, cuando están formados por distintas unidades. Algunas propiedades que se buscan en los polímeros son la biodegradación y biocompatibilidad (Fig. 18).

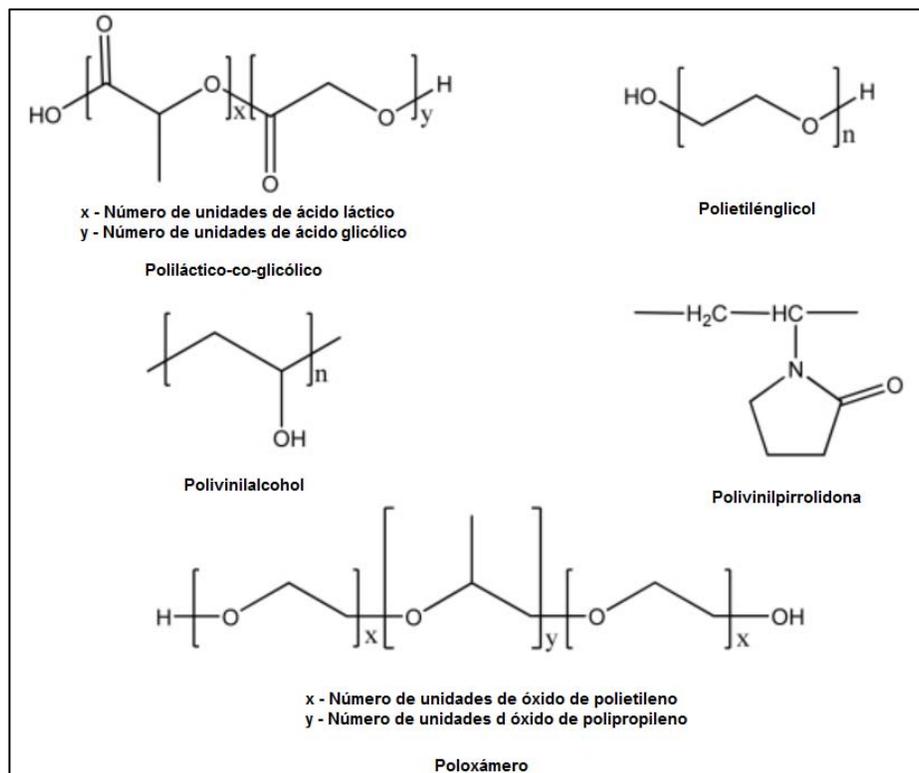


Figura 18. Polímeros biodegradables y biocompatibles empleados comúnmente.

[MANSOUR, H.M., *et al.*, (2010). *Material for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects*. International Journal of Molecular Sciences. 11 (9); 3298 (Figura 1)]

La biodegradación es el proceso por el cual el polímero se degrada formando unidades más pequeñas. Ocurre cuando el agua penetra por la matriz polimérica, al atacar los enlaces químicos por hidrólisis, acortando la longitud de sus cadenas, lo que implica una reducción en el peso molecular de éste⁶⁵. Un polímero no biodegradable puede usarse, siempre y cuando su acumulación no implique un problema en la función normal del organismo. La biocompatibilidad se refiere a las propiedades específicas de un material que lo hacen no tóxico ni perjudicial para los sistemas biológicos. Los materiales no biocompatibles pueden causar daños irreversibles en los tejidos, pudiendo provocar necrosis y fibrosis⁶⁶.

3.4.1.1 Polímeros sintéticos

Una gran cantidad de polímeros pueden ser generados artificialmente. Dentro de los polímeros de uso común más importantes en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos destacan la poli- ϵ -caprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), los cuales son ampliamente conocidos por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades no tóxicas⁶⁷.

3.4.1.2 Polímeros naturales

Los polímeros de origen natural como los polisacáridos y las proteínas han sido empleados para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, debido a sus similitudes con la matriz extracelular del cuerpo humano y las propiedades específicas favorables que pueden ser explotadas para este tipo de sistemas. Los polisacáridos son una clase de biopolímeros constituidas por uno o dos monosacáridos, que difieren en la longitud de su cadena, en los tipos de las unidades de enlace y en el grado de ramificación, incluyen el almidón, quitosán, alginato y ácido hialurónico. Dentro de los polímeros de origen proteico se encuentran la albúmina y el colágeno⁶⁷.

3.4.2 Lípidos

Los sistemas de liberación de fármacos basados en lípidos han sido diseñados para abordar problemas de solubilidad y biodisponibilidad de algunos fármacos. Las formulaciones generadas con este tipo de materiales han demostrado reducir la toxicidad de diversos fármacos al cambiar la biodistribución de los fármacos, alejados de los órganos sensibles. Los materiales lipídicos incluyen derivados de aceites vegetales como glicéridos parciales (como los monocaprilcapratos, monoesteratos, y diesteratos de glicerilo), polioxiglicéridos (como los Labrafil® y Gelucire®), ácidos grasos (como el esteárico y el palmítico) y algunas ceras (como la cera blanca y la Carnauba). Para el caso de liposomas, se suelen utilizar algunos fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fofatidilcolina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol, además de colesterol.

Capítulo 4

4. Sistemas vectorizados

La vectorización es la estrategia por la que se obtiene una liberación selectiva del principio activo en los órganos, tejidos o células sobre los que ejerce su acción. La distribución del fármaco es uniforme y ocurre antes de su liberación, generando una distribución de forma restringida y específica. De este modo se incrementa la concentración del fármaco en los sitios diana, mejorando su eficiencia y reduciendo los efectos adversos.

Los sistemas vectorizados o de direccionamiento se desarrollan considerando las propiedades específicas del sitio en cuestión, además de la naturaleza de los acarreadores que trasladan al principio activo. Estos sistemas deben ser bioquímicamente inertes, no inmunogénicos, física y químicamente estables⁷⁰.

4.1 Clasificación de técnicas de vectorización

En varias enfermedades sistémicas existen cambios estructurales en el microambiente del tejido dañado que permiten el direccionamiento pasivo y activo de agentes terapéuticos (Fig. 19).

4.1.1 Vectorización pasiva

En la vectorización pasiva se aprovechan las características fisiológicas naturales de la enfermedad para facilitar la distribución selectiva del fármaco. El ejemplo típico de este tipo de direccionamiento se observa en el cáncer⁷¹.

En el cáncer cuando un tumor alcanza un tamaño entre 2 y 3 mm, comienza la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. La neovasculatura resultante difiere ampliamente de la de un tejido sano. Los vasos sanguíneos son irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, y las células endoteliales están desorganizadas, presentando grandes fenestraciones. También, las células

perivasculares y la membrana basal, o la capa de músculo liso presentan anomalías o incluso están ausentes. La luz de los vasos tumorales es más ancha, mientras el drenaje linfático es deficiente. Esta anatomía defectuosa junto con las anomalías funcionales, es lo que produce la mayor permeabilidad a los componentes del plasma sanguíneo. Por otra parte, el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático hacen que las macromoléculas sean retenidas en el tumor, mientras la extravasación en el intersticio tumoral prosigue. Estos fenómenos constituyen el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR)⁷². La combinación de estos capilares porosos y el deficiente drenaje linfático permiten el fácil acceso de los acarreadores al espacio intersticial, además que favorece su retención durante un tiempo prolongado en su interior en comparación con un tejido normal.

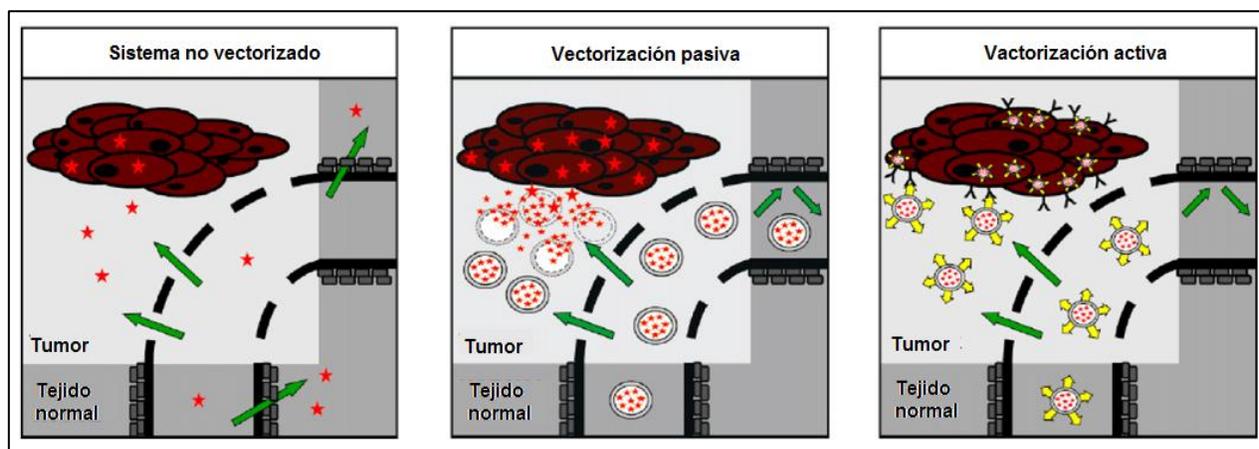


Figura 19. Liberación de fármaco de sistema no vectorizado y sistemas vectorizados de tipo pasivo y activo.

[LAMMERS, T., *et al.*, (2010). Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumor-targeted combination therapy. *Nano Today*. 5; p. 198 (Figura 1)]

4.1.2 Vectorización activa

La vectorización activa permite la dirección de un sistema farmacéutico a determinado sitio mediante las interacciones existentes entre un ligando y un receptor propio de la diana⁷³.

Las interacciones entre ligando y receptor son sólo posibles cuando ambos se encuentran próximos, alrededor de 0.5 nm. Además dependen de una gran variedad de factores, tales como el grado de expresión del receptor, su disponibilidad en la superficie de la célula específica, así como de su internalización. Una posible desventaja es que la expresión del receptor puede no estar distribuida de manera homogénea dentro de un tejido, además que la expresión puede cambiar con el tiempo⁷⁴.

4.2 Vehículos o acarreadores

Los acarreadores son los sistemas que contienen al fármaco y son capaces de protegerlo y transportarlo a un sitio específico donde éste se liberará⁷⁵. Los vehículos usados deben ser preferentemente biodegradables o fácilmente eliminables del cuerpo, por aclaramiento renal. Así mismo deben generarse por métodos sencillos, reproducibles, económicamente viables y escalables⁷⁶. De acuerdo a sus características y composición, los acarreadores se clasifican en sistemas moleculares y coloidales.

4.2.1 Sistemas moleculares

Los nanoacarreadores puede ser de tipo molecular cuando su estructura básica se basa en una molécula *per se*, tales como las ciclodextrinas y los dendrímeros.

4.2.1.1 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son compuestos macrocíclicos formados por varias unidades de glucosa unidas por enlaces α -1-4, que forman una estructura molecular toroidal, rígida, con una cavidad interior de volumen específico (Fig. 20). Las ciclodextrinas más comunes son la α , β y γ , las cuales están constituidas por 6,7 y 8 unidades de glucosa respectivamente⁷⁷.

El acomodo de los grupos funcionales hidroxilo, éter y metilenos de las moléculas de glucosa provoca que se forme una cavidad con carácter hidrofóbico y un exterior con carácter hidrofílico⁷⁸. Esta característica les permite alojar fármacos

hidrofóbicos en su interior, permitiéndoles fungir como un sistema transportador. Como consecuencia del acomodo de los grupos hidroxilo libres, que se encuentran situados en el exterior de la superficie de los anillos, las ciclodextrinas son hidrófilas y solubles en agua y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso⁷⁷.

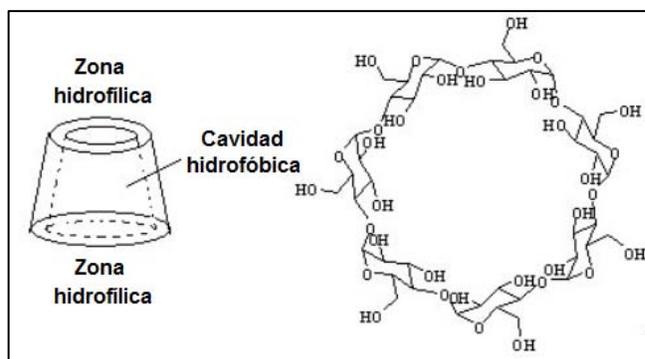


Figura 20. Estructura de β -ciclodextrina

[CHALLA, R., (2005). *Cyclodextrins in drug delivery: An updated review*. American Association of Pharmaceutical Scientists. 6(2); E32 (Figura 1)]

4.2.1.1.1 Síntesis y conjugación de fármaco

Las ciclodextrinas se obtienen durante la degradación enzimática del almidón, a través de la enzima ciclodextrin-glicosil-transferasa (CGTasa)⁷⁸. La principal fuerza impulsora para la formación del complejo de inclusión es la salida de moléculas de agua de la cavidad de la ciclodextrina, las cuales son desplazadas por el fármaco huésped. De esta manera, se alcanza una asociación apolar-apolar que disminuye la tensión del anillo de ciclodextrina, generando un estado energético más estable⁷⁹.

Las técnicas de inclusión del principio activo incluyen métodos que requieren a la ciclodextrina en estado líquido o sólido. Los métodos en estado líquido incluyen la mezcla de disolventes y la co-precipitación y neutralización. La mezcla de disolventes consiste en la disolución de la ciclodextrina en solución acuosa y el fármaco en un disolvente miscible en agua, el cual se evapora⁷⁸. En el método de co-precipitación se hace una suspensión de la ciclodextrina en agua a temperatura ambiente con agitación vigorosa y se agrega una cantidad controlada de fármaco⁷⁹. Los métodos en estado sólido se realizan con la mezcla física de la

ciclodextrina y el fármaco, su amasado de la ciclodextrina que propicia la fusión fármaco al sistema⁷⁹.

Otra alternativa para la introducción del fármaco son las técnicas de conjugación, las cuales involucran enlaces covalentes con la ciclodextrina.

4.2.1.1.2 Caracterización

Las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía ultravioleta visible (UV/VIS) demuestran la formación de un complejo de inclusión, al permitir la observación de cambios en los picos tanto para el fármaco huésped como para la ciclodextrina. Adicionalmente, RMN permite el cálculo de la constante de estabilidad. Además que se puede usar para sondear la geometría del complejo y dar información sobre su cinética de asociación y disociación⁸⁰ Las técnicas como la calorimetría diferencia de barrido (DSC) determinan si el fármaco huésped sufre alguna modificación con el proceso de inclusión, ya sea fusión, evaporación, descomposición, oxidación o transición polimórfica. Adicionalmente se pueden utilizar otros métodos como espectroscopía de infrarrojo (IR), difracción de rayos X en sólido y estudios de solubilidad para determinar la formación de complejos de inclusión⁸¹.

4.2.1.2 Dendrímeros

Los dendrímeros son moléculas tridimensionales, altamente ramificadas, que se diferencian de los polímeros convencionales debido a sus propiedades estructurales, como su simetría y monodispersabilidad. Poseen características como una alta solubilidad en agua, biocompatibilidad, polivalencia que los convierten en un vehículo ideal para la administración de fármacos⁸².

Estos sistemas constan de una estructura que posee tres componentes principales: un núcleo, capas de unidades ramificadas que se repiten

denominadas ramificaciones y una capa de la unidad repetitiva que forma los grupos terminales. Cada par de unidades monoméricas forman lo que se conoce como generación⁸² (Fig. 21).

Los avances e innovaciones de la ciencia de polímeros han dado como resultado el desarrollo de dendrímeros altamente ramificados. Algunos ejemplos son la poliamidoamina (PAMAM), polipropileno (PPI), poli-L-lisina, polieterhidroxilamina (PEHAM) y poliesteramina (PEA)⁸³.

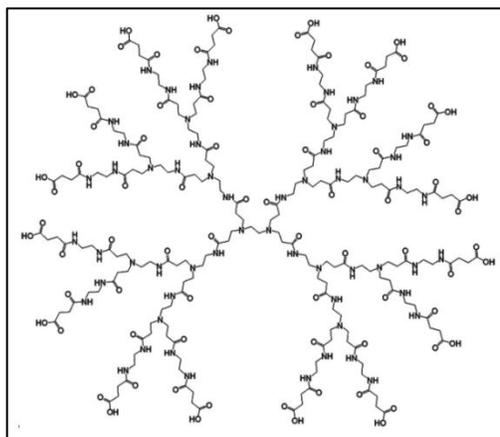


Figura 21. Estructura de dendrímero hecho con PAMAM de segunda generación.

[WU, L., et al., (2015), *Dendrimers in medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges*. *Bioconjugate Chem.* 26 (7); 1199 (Figura 2)]

4.2.1.2.1 Síntesis y conjugación de fármaco

La síntesis de los dendrímeros involucra básicamente dos pasos, uno su activación y el otro es su acoplamiento. El uso de estos dos pasos ha permitido la síntesis de macromoléculas de alto peso molecular con un crecimiento controlado. El diseño y construcción de estas nuevas moléculas se puede realizar empleando dos diferentes metodologías denominadas; método divergente y método convergente⁸⁴.

El método divergente de síntesis de dendrímeros, se inicia del centro hacia la periferia del futuro dendrímero. La molécula núcleo se acopla con una unidad monomérica activada que contiene un centro reactivo y dos centros inactivos, para así evitar una polimerización no controlada, dando así la primera generación del dendrímero⁸⁴.

El segundo método de síntesis que se conoce es el método convergente, mismo que comienza con lo que será la periferia del dendrímero, por medio de reacciones de acoplamiento entre un monómero base y el monómero que tendrá los grupos terminales, obteniendo así, lo que se conoce como el dendrón de primera generación. La activación del monómero base y las subsecuentes reacciones de acoplamiento y activación, conllevan a la formación de dendrones de mayores generaciones⁸⁵.

La conjugación entre los dendrímeros con las moléculas de fármaco puede darse por encapsulado o aprovechando las interacciones electrostáticas y covalentes. La forma elíptica y esférica de las cavidades internas vacías y la naturaleza abierta de la arquitectura de los dendrímeros hacen posible la encapsulación directa de fármacos en su interior. Estas cavidades usualmente tienen propiedades hidrofóbicas, lo que las hace ideales para interactuar con fármacos poco solubles en agua. Por otro lado, la presencia de numerosos grupos funcionales en la superficie de los dendrímeros permite su conjugación con fármacos mediante interacciones electrostáticas y covalentes⁸².

4.2.1.2.2 Caracterización

Diversas técnicas analíticas se utilizan para determinar los parámetros físicos y químicos de los dendrímeros conjugados con fármacos. La encapsulación de moléculas de fármaco o nanopartículas de dendrímeros puede caracterizarse por microscopía electrónica de transmisión (TEM), UV-Visible y espectroscopía infrarroja; por transformada de Fourier. Por otra parte, RMN y técnicas espectroscópicas de masas (EM) se utilizan para estudiar la naturaleza de los complejos⁸⁵.

4.2.2 Sistemas coloidales

El impacto del tamaño de los acarreadores en la biodistribución ha sido estudiado usando partículas con una amplia variedad de dimensiones. El tamaño de la partícula está intrínsecamente relacionado con la velocidad de aclaramiento de la

circulación sanguínea y en general se ha observado que las partículas pequeñas de entre 50 a 300 nm son removidas más lentamente de la circulación en comparación con aquellas de mayor tamaño.

Con objetivo de alcanzar tiempos de circulación apropiados y adecuadas concentraciones en los tejidos diana, se ha desarrollado sistemas coloidales de tamaño submicrométrico.

4.2.2.1 Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas sólidas coloidales que funcionan como sistemas de liberación del fármaco, tienen capacidad de contenerlo, protegerlo y trasladarlo a un sitio específico. Pueden presentarse como matrices llamadas nanoesferas o sistemas reservorios denominados nanocápsulas⁸⁶. Estos acarreadores se generan a partir de materiales poliméricos y lipídicos. Para la elaboración de nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco es de importante consideración conocer las propiedades de las partículas y el ambiente en el cual se libera el fármaco.

La selección del polímero o combinación de polímeros que se usan depende de factores, como las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las partículas, es decir, su tamaño, carga, polaridad, capacidad de carga, degradabilidad y perfil de liberación, además se deben considerar las propiedades del polímero como la carga, polaridad y solubilidad, finalmente igual es importante tomar en cuenta la naturaleza del principio activo, su carga, polaridad, solubilidad y estabilidad⁸⁷.

4.2.2.1.1 Métodos de preparación

Se utilizan diversos métodos para la síntesis de nanopartículas. Uno de los más comunes es la emulsificación. Básicamente consiste en la preparación de una emulsión, con una fase orgánica compuesta de los polímeros y el fármaco, disueltos en solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano y acetato de etilo. Por otro lado, se genera una fase acuosa, que contiene agentes

estabilizantes y tensoactivos. La homogenización de la emulsión se logra a través de agitación mecánica y la ultrasonificación. Las emulsiones más empleadas son de tipo o/w, pero también se pueden generar dobles emulsiones como la w/o/w cuando hay componentes que requieren solubilizarse en otro medio. La obtención de nanopartículas se obtiene mediante la evaporación del solvente de la emulsión, ya sea con temperatura ambiente o con presión reducida⁸⁸ (Fig. 22).

Otra técnica es la nanoprecipitación o desplazamiento de solvente, que se basa en la adición gota a gota de una fase orgánica que contiene al polímero y al fármaco, en una fase acuosa con tensoactivos. Posteriormente, el solvente orgánico se evapora para la formación de las nanopartículas⁸⁸.

El método de *salting-out* parte de una solución con altas concentraciones de electrolitos como $MgCl_2$ y $CaCl_2$. El fundamento de esta técnica se basa en las interacciones electrolito-no electrolito, en donde a altas concentraciones salinas, se induce la precipitación de las nanopartículas, debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas⁸⁸ (Fig. 23).

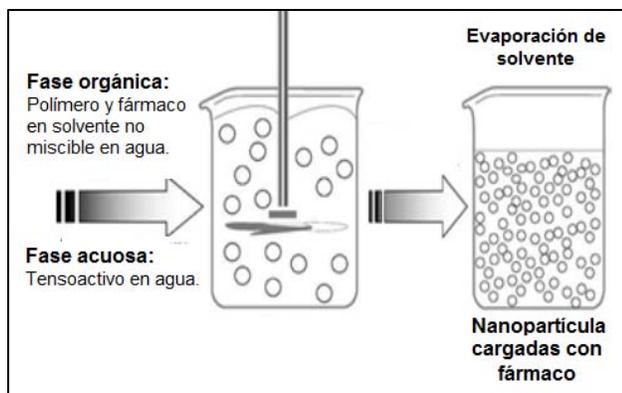


Figura 22. Método de emulsificación con evaporación de solvente para la obtención de nanopartículas.

[NAGAVARMA, B., *et al.* (2012), *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles: A review.* Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 5 ;(3) (Fig 2)]

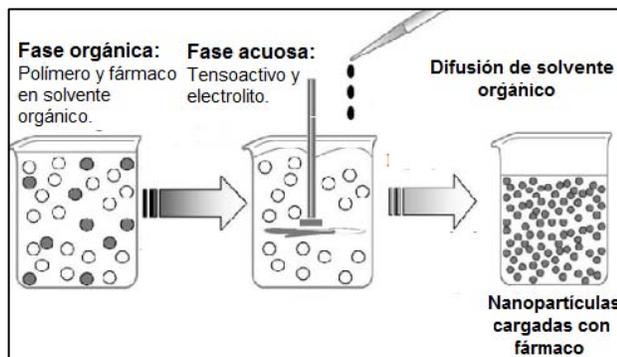


Figura 23. Método de *salting-out* para la obtención de nanopartículas.

[NAGAVARMA, B., *et al.* (2012), *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles: A review.* Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 5 ;(3) (Fig 5)]

El método de precipitación anti-solvente es ideal para la encapsulación de proteínas. La técnica se basa en la supersaturación de los componentes para inducir su precipitación. El solvente generalmente usado es el CO₂, cuya rápida difusión permite la formación de nanopartículas. La principal ventaja de este método es la omisión del uso de un solvente⁸⁶.

Otro método común para la generación de nanopartículas es la atomización, en el cual una solución o suspensión del activo y polímero es atomizada en finas gotas, las cuales son tratadas con aire caliente, para inducir la rápida evaporación del solvente de las gotas y formar las microesferas⁸⁷.

4.2.2.1.2 Caracterización

El tamaño de partícula es una de las características más importantes de los sistemas de liberación poliméricos. Se obtiene por medio de métodos de dispersión de luz o microscopía⁸⁸. Las partículas poliméricas por lo general están cargadas de acuerdo a las características eléctricas de las moléculas usadas. Las propiedades eléctricas son usualmente caracterizadas por su potencial zeta⁸⁹.

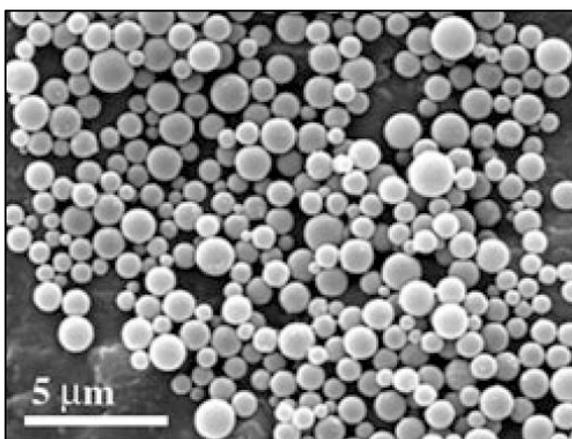


Figura 24. SEM de nanopartículas de PLA.

[ALLOUCHE, J., (2013). *Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods*. Nanomaterials: A danger or a promise? Springer-Verlag. P. 41 (Figura 2.9)]

Las morfología y estado de agregación de las partículas son generalmente estudiadas usando distintas formas de microscopía. La microscopía convencional óptica es usada para estudiar la microestructura de las partículas. Las tinciones y fluorescencias pueden ayudar a la visualización de componentes específicos. La microscopía confocal se usa con muestras fluorescentes para la obtención de mejores imágenes en 3D. La microscopía electrónica de barrido

(SEM), permite información de las características superficiales de las partículas, como composición y topología⁸⁸ (Fig. 24). Es un reto determinar la composición y distribución del principio activo en las partículas debido al pequeño tamaño en cuestión. Algunas de las técnicas empleadas para estos propósitos incluyen la espectroscopia IR y difracción de rayos X de bajo ángulo, para el análisis químico de la composición superficial. DSC se utiliza para detectar cristales en un compuesto encapsulado, además para la detección de interacciones entre polímeros que componen a la partícula⁸⁹.

4.2.2.1.3 Métodos que favorecen la permanencia

El uso de sistemas basados en nanopartículas como acarreadores de fármacos no siempre genera buenos resultados en cuanto al tiempo de permanencia en el organismo. En algunos casos las nanopartículas son reconocidas, capturadas y eliminadas rápidamente de la circulación sanguínea por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear. Este fenómeno limita su función en liberación controlada así como la posibilidad de concentrar el fármaco en un tejido específico. Una de las estrategias que se han usado para evadir la captura de las nanopartículas por el sistema fagocítico mononuclear es la PEGilación, un método que consiste en la conjugación de la nanopartícula con moléculas de polietilenglicol (PEG)⁹⁰.

Algunos estudios han mostrado que la presencia de las cadenas hidrofílicas de polietilenglicol en las superficies de las nanopartículas reduce significativamente su interacción con las opsoninas, las cuales son proteínas que promueven la fagocitosis, de esta manera las nanopartículas PEGiladas han demostrado una circulación prolongada en el organismo. Además les brinda protección contra el ataque enzimático⁹¹.

4.2.2.2 Liposomas

Los liposomas son vesículas compuestas de bicapas de fosfolípidos que rodean un compartimiento acuoso (Fig. 25). Estos sistemas permiten la encapsulación de

fármacos tanto lipófilos como hidrófilos. Los lípidos naturales, como el colesterol y fosfatidilcolina, han sido ampliamente utilizados para producir los liposomas convencionales, sin embargo un gran número de estos se ha visto envuelto en problemas de fagocitosis por aumento de opsonización. Para disminuir este problema, se usan algunos tipos de fosfatidilcolina como dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y diestearil fosfatidilcolina (DSPC). Adicionalmente, se ha observado que la unión de glicoproteínas, péptidos y polímeros sintéticos a la bicapa puede modificar las características biofísicas de los liposomas, así como su estabilidad, biodisponibilidad y propiedades de liberación prolongada⁹².

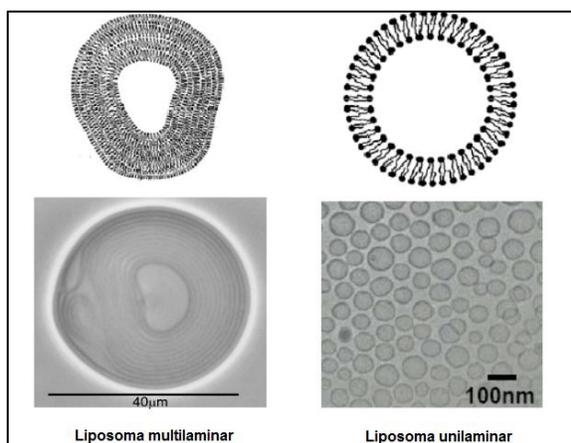


Figura 25. Estructura de liposomas de tipo multi y unilaminar obtenidas por crioelectromicroscopía.

[PEDERSEN, P., CLAUSEN M., (2010).
Liposomal drug delivery of anticancer drugs.
Technical University of Denmark. P. 7 (Figura 3)]

De acuerdo a sus características estructurales como número de bicapas y tamaño, los liposomas pueden ser multilamelares, que tienen tamaños entre 0.1–10 μm y presentan más de una bicapa lipídica que rodean más de un compartimento acuoso; y unilamelares, los cuales se componen de una sola bicapa lipídica y un compartimento acuoso y que a su vez pueden ser de diámetro grande, cuando mide entre 100 y 500 nm y de diámetro pequeño, cuando su tamaño es menos a 100 nm⁹³.

4.2.2.2.1 Métodos de preparación

Las características de los liposomas están directamente relacionadas con el método de preparación empleado. La principal diferencia de estas técnicas radica en su enfoque para superar la baja solubilidad de los lípidos en agua. De acuerdo con ello, estos métodos pueden ser agitación mecánica, evaporación del disolvente, evaporación en fase inversa y solubilización de detergente⁹⁴.

Con la agitación mecánica se logran solubilizar los lípidos en agua. El inconveniente de esta técnica es que los liposomas generados, no son adecuados para fungir como acarreadores de fármacos, debido a la inestabilidad, tamaño y una alta fuga del fármaco encapsulado⁹⁴.

El método de evaporación de solvente requiere de la solubilización de los lípidos y fármacos hidrófobos en un disolvente orgánico. Después se procede a la evaporación del disolvente. Seguida de la hidratación con una solución *buffer*. El volumen acuoso encerrado dentro de las membranas lipídicas suele ser muy pequeño (5-10%) en comparación a la proporción del total de volumen utilizado. Como consecuencia, una gran cantidad de fármaco soluble en agua es desperdiciado durante la preparación. Sin embargo, para el caso de los fármacos hidrofóbicos se pueden encapsular con una eficiencia del 100 %⁹⁵.

Mediante la evaporación en fase reversa se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso. Este método parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa. Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación se elimina el éter a presión reducida o mediante la aplicación de calor, produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper cuando se sigue incrementando el grado de vacío aplicado para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni o multilaminar⁹⁵.

La eliminación de detergente parte de micelas mixtas formadas por una combinación de fosfolípidos y un detergente que preferiblemente debe presentar una concentración crítica micelar elevada y un bajo índice de agregación como el colato o desoxicolato sódico o el octilglucósido. Para controlar el diámetro de vesícula, la lamellaridad y también la homogeneidad del tamaño de los liposomas obtenidos es posible aplicar un procedimiento de extrusión⁹⁵.

4.2.2.2.2 Caracterización

El tamaño de los liposomas es primordial, porque influye en su distribución en el organismo. Diversas técnicas se emplean para determinar el tamaño de los liposomas. Se usan algunos tipos de microscopia como la óptica, tinción negativa, SEM, entre otras. De igual forma se utiliza la difracción y dispersión de la luz y en algunos casos técnicas hidrodinámicas como fraccionamiento de flujo de campo, permeación de gel y ultracentrifugación⁹⁵.

Es importante conocer la carga en la superficie del liposoma, pues puede influir en el proceso de carga del fármaco. Algunas técnicas empleadas son la electroforesis de flujo libre y la medición del potencial zeta. La carga superficial se puede calcular mediante la estimación de la movilidad de la dispersión de liposomas en una solución *buffer* adecuada⁹⁵.

La laminalidad de los liposomas indica el número de bicapas que lo componen. Diversos tipos de microscopía electrónica pueden ser utilizadas para evaluarla, tales como criofractura o crio-electromicroscopía, misma que requiere de la congelación de las vesículas con nitrógeno, seguido de un corte o fractura de su superficie, lo cual permite su observación.

La morfología de los liposomas también se puede conocer empleando estas técnicas⁹⁶. Al igual que con otros tipos de acarreadores, las técnicas termoanalíticas como DSC, permiten evaluar las posibles interacciones químicas entre los liposomas y el fármaco con el que se carga⁹⁶.

4.2.2.2.3 Métodos que favorecen carga

La cantidad de principio activo que puede encapsularse en los liposomas usualmente es muy pequeña. Para mejorar este parámetro se suelen usar liposomas con pH ácido en su interior, suspendidos en un medio neutro con fármaco. De este modo el fármaco se encuentra sin carga, lo que favorece su

entrada por la barrera lipídica. Una vez dentro del liposoma, el principio activo vuelve a su forma cargada⁹⁷.

4.2.2.2.4 Métodos que favorecen permanencia

Al igual que las nanopartículas los liposomas pueden ser rápidamente eliminados de la circulación por los fagocitos del sistema retículo-endotelial. La velocidad de captura depende del tamaño y carga del liposoma. Los liposomas más grandes se suelen eliminar a una velocidad mayor. Dentro de las estrategias para prolongar el tiempo de circulación está la PEGilación. Otras alternativas incluyen el uso de colesterol y esfingomielinas en la elaboración de los liposomas⁹⁶.

4.2.2.3 Nanogeles

Un gel es una red polimérica tridimensional reticulada capaz de absorber una gran cantidad de disolvente sin disolverse debido a los enlaces físicos o químicos formados entre sus cadena. Cuando el tamaño del gel es nanométrico, se denomina nanogel⁹⁸.

La síntesis de nanogeles se basa típicamente en la generación de redes entrecruzadas en un espacio confinado de manera tal que se formen nanopartículas en su interior.

Generalmente la formación de redes se logra a partir de la polimerización de los monómeros en presencia de un agente de entrecruzamiento, como glutaraldehído o formaldehído, entre otros⁹⁹.

Los polímeros comúnmente utilizados en la preparación de hidrogeles pueden ser naturales como ácido hialurónico, ácido algínico, carboximetilcelulosa, carragenina, entre otros; así como polímeros sintéticos como los acrilatos, las poliamidoaminas, polietilenaminas y polivinilamina, además de sus respectivos monómeros⁹⁸.

4.2.2.3.1 Métodos de preparación

Los métodos de preparación de nanogeles se dividen de acuerdo al mecanismo de formación de partículas en técnicas de reticulación de polímeros y polimerización de monómeros⁹⁹.

El método de reticulación consiste en la agregación controlada de polímeros hidrofílicos capaces de tener interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o puentes de hidrógeno entre sí. El auto-ensamblaje de polímeros hidrofílicos permite la encapsulación de macromoléculas y es útil para la preparación de nanogeles cargados con proteínas. La reticulación puede darse de forma física por radiación o por reacciones química¹⁰⁰.

La reticulación por irradiación utiliza rayos gamma, rayos X, electrones acelerados, iones y rayos ultravioleta. La irradiación inducida es absorbida por el agua, generando especies reactivas de vida corta, que pueden reaccionar con el polímero, generando radicales que se recombinan al azar. Este método permite sintetizar nanogeles utilizando cadenas de polímeros lineales y agua como componentes de partida sin la necesidad de monómeros, agentes reticulantes, iniciadores y tensoactivos¹⁰⁰.

Por otro lado la reticulación química está basada en reacciones de poliadición. Se pueden sintetizar nanogeles mediante la adición de Michael, entre un nucleófilo como una amina o un tiol y un grupo vinilo; o a través de las reacciones de condensación entre los grupos hidroxilo o aminas con ácidos carboxílicos o sus derivados. Para ambos casos se suelen utilizar agentes reticulantes¹⁰⁰.

El método de polimerización de monómeros genera nanogeles mediante la polimerización por precipitación o por nanoemulsión¹⁰¹. A través de la polimerización por precipitación, todos los componentes incluyendo los monómeros, agente reticulantes y el iniciador se disuelven en agua. La formación

de partículas de nanogel se produce por un mecanismo de nucleación homogénea¹⁰¹.

En el método de polimerización en nanoemulsiones se generan gotas acuosas mediante sonicación en un disolvente orgánico como fase continua en presencia de tensoactivos liposolubles. La polimerización se da en presencia de agentes reticulantes, conduciendo a la formación del nanogel¹⁰¹.

4.2.2.3.2 Caracterización



Figura 26. Micrografía SEM de nanogel de NIPAm.

[AYMAN, M., *et al.*, (2015). *Application of amphiphilic 2-acylamido-2-methylpropane sulfonic acid-con-N-isopropyl acrylamide nanogels as thin film coating*. *International Journal Electrochemistry Science*; 10; 104

(Figura 2)]

Para la caracterización de nanogeles se emplea la técnica de dispersión de luz para obtener información sobre la estructura y la dinámica de los nanogeles en estudio. Se basa en la interacción de la radiación electromagnética al chocar con las partículas de tipo coloidal que lo componen¹⁰⁰.

Los cambios relativos en dimensiones hidrodinámicas de nanogeles, relacionados con su peso molecular promedio, estructura y tamaño, pueden ser monitoreados mediante mediciones de viscosidad en disoluciones diluidas. En estudios de reología se puede obtener información a partir de la relación de compactación y rigidez de partículas de nanogel y su susceptibilidad a una deformación, la permeabilidad del disolvente, así como las interacciones entre las partículas¹⁰².

Así mismo, se emplean métodos termoanalíticos como DSC para caracterizar las propiedades físicas de los polímeros que componen a los nanogeles, como temperaturas de fusión, cristalización, y temperaturas de transición de fases y los correspondientes cambios de entalpía y entropía, la transición vítrea y otros

efectos que muestran cambios en la capacidad calorífica o de calor latente. Adicionalmente, permite determinar la presencia de agua asociada a los nanogeles y la no asociada, lo que podría ser de utilidad para conocer el grado de hinchamiento de los nanogeles estímulo-sensibles¹⁰².

Las técnicas de microscopía como SEM, solo son adecuadas para analizar partículas en estado seco y por lo tanto no brinda ninguna información acerca del grado de hinchamiento de los nanogeles (Fig. 26). Pero la microscopía de fuerza atómica ha sido utilizada para el estudio de la topología de la superficie de nanogeles. Finalmente, los métodos espectroscómicos, al igual que con otro tipo de acarreadores, permite determinar la composición química de los nanogeles¹⁰².

4.2.2.3.3 Nanogeles cargados con nanopartículas

En la actualidad se ha incrementado el interés por el uso de nanogeles como plantillas para la síntesis, almacenamiento y transporte de nanopartículas. Estos sistemas brindan ventajas en el control del sistema en cuanto a la localización de sitios reactivos, crecimiento controlado y distribución homogénea. Del mismo modo se mejoran algunas propiedades de las nanopartículas como su tamaño, morfología, estabilidad y área superficial¹⁰³.

4.2.3 Otros sistemas

4.2.3.1 Sistema anticuerpo-fármaco

El uso terapéutico de anticuerpos se ha extendido notablemente en los últimos años, particularmente en la oncología.

El acoplamiento de un fármaco a un anticuerpo monoclonal representa un método para combinar la especificidad del anticuerpo por su blanco con la

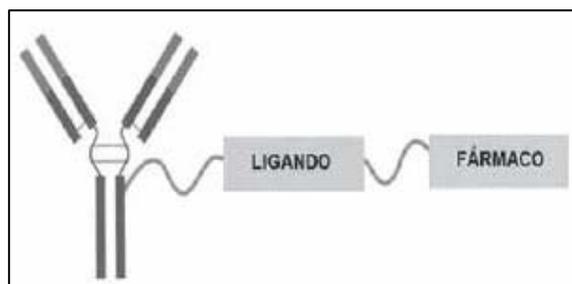


Figura 27. Sistema fármaco-anticuerpo

[HERNÁNDEZ, E., GONZÁLEZ, E. (2011).
Conjugados Anticuerpo-Fármaco: El estado de
arte. Revisión Mexicana de Ciencias
Farmacéuticas. 42 (3), p. 10 (Figura 2)]

potencia de un fármaco, lo que incrementa significativamente ambos aspectos¹⁰⁴ (Fig. 27).

4.2.3.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que envuelven una estructura bioquímica compleja demarcada por la unión de cuatro cadenas proteicas: dos pesadas, y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuro. Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab, y una fracción cristalizable (Fc) que media función efectora como la citotoxicidad celular que depende del anticuerpo y la citotoxicidad que depende del complemento¹⁰⁵.

Las regiones Fab están conformadas por una región variable y otra conservada. La región variable tiene una diversidad casi infinita para el reconocimiento de antígenos, gracias a las regiones determinantes de complementariedad (CDR), o regiones hipervariables; la región conservada ayuda a la estabilización de la reacción entre los segmentos CDR con el antígeno¹⁰⁵. Los anticuerpos monoclonales son glicoproteínas especializadas pertenecientes al sistema inmune, producidas por las células B, con la capacidad de reconocimiento de antígenos.¹⁰⁵

4.2.3.1.2 Características

El desarrollo de este tipo de sistemas requiere que el acoplamiento del fármaco al anticuerpo no modifique negativamente la distribución de la molécula, sino que la mejore y además aumente su vida media. Se debe asegurar que el fármaco permanecerá unido al anticuerpo hasta la llegada al sitio de acción, para evitar el daño a otros tejidos¹⁰⁴.

4.2.3.1.3 Desarrollo

Existen dos estrategias para desarrollar un sistema fármaco-anticuerpo; una de ellas es utilizar un anticuerpo monoclonal que únicamente reconozca a un

antígeno en específico, mismo que está presente en las células transformadas debido a la enfermedad; o bien incluir un anticuerpo monoclonal que reconozca nuevos blancos¹⁰⁶.

4.2.3.1.4 Mecanismo de acción

El sistema fármaco-anticuerpo deberá tener la capacidad de internalizarse en la célula blanco, para que sólo en el interior de ésta pueda liberarse el principio activo, cumpliendo así la propuesta de especificidad y de incremento de concentración. Por ello, estos sistemas deben ser reconocidos por receptores de membrana asociados a proceso de endocitosis, ya sea que el anticuerpo monoclonal esté dirigido contra un receptor membranal, o bien que sea reconocido por receptores para inmunoglobulinas, que están presentes en un limitado número de células¹⁰⁶.

Para alcanzar los niveles terapéuticos esperados en el interior de la célula, el procesamiento del sistema debe ser eficiente para liberar al principio activo sin modificar la estructura del mismo. En general, esto requiere el desarrollo de moléculas de unión o ligandos estables en circulación, pero que sean accesibles a enzimas o cambios fisicoquímicos en los diferentes compartimientos celulares¹⁰⁶.

4.2.3.2 Sistemas conjugados a proteínas

Las proteínas corporales pueden ser usadas como acarreadores de fármacos, debido a que al ser medios endógenos, no generan reacciones inmunológicas. La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína versátil que puede actuar como un vehículo potente de algunos principios activos. Debido a su tamaño es capaz de atravesar las fenestraciones del endotelio. Además se

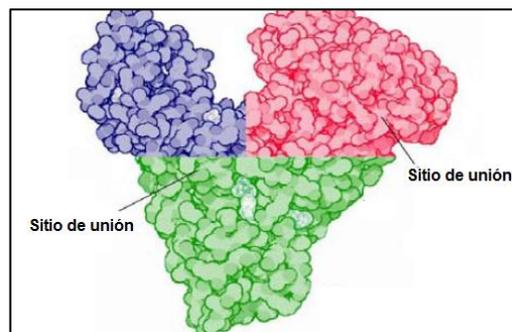


Figura 28. Estructura de la HSA.

[BAIRAGI, U., MITTAL, P., MISHRA, B., (2015). *Albumin: A versatile drug carriers*. Austin therapeutics 2 (2); 1021 (Figura 1)]

ha visto, que estos sistemas pueden alcanzar vidas medias circulatorias de hasta 19 días, lo que mejora la biodisponibilidad de muchos fármacos.

4.2.3.2.1 Albúmina

La HSA es una proteína globular, compuesta de 3 dominios, cuya estructura secundaria se basa principalmente en α -hélices (Fig. 28). Se compone principalmente de los aminoácidos cisteína, leucina, glutamato y lisina y contiene un solo residuo de triptófano. La presencia de un gran número de residuos ionizados mejora su solubilidad. Además, los residuos aminoácidos les aportan un carácter básico, que le confieren una carga negativa. Por otro lado, sus puentes disulfuro contribuyen en su estabilidad¹⁰⁷.

La albúmina es importante para diversos procesos fisiológicos. Por un lado mantiene la presión osmótica coloidal, también participa en procesos de inmunomodulación, brinda estabilización endotelial, facilita la solubilización de ácidos grasos de cadena larga, regula el equilibrio de pH del plasma y se involucra en la entrega de nutrientes a las células¹⁰⁷.

4.2.3.2.2 Desarrollo

Como ya se ha mencionado, la HSA presenta una alta capacidad de unión de ligandos. Los sistemas de administración de fármacos a base de proteínas incluyen nanopartículas compuestas de albúmina y proteína de fusión a fármacos

La carga negativa de la HSA, que facilita la unión electrostática de diversos ligandos, por lo que es capaz de ligarse con bilirrubina, ácidos biliares, hormonas, metales, aniones, ácidos grasos de cadena larga, L -tiroxina, óxido nítrico, endotoxinas y otros productos bacterianos. La formación de complejos y unión de alta afinidad con HSA son principalmente reversibles. Recientemente, se ha podido generar la unión covalente de la HSA con algunos compuestos terapéuticos mediante enlaces covalentes, especialmente para unir moléculas pequeñas como doxorubicina o metotrexato¹⁰⁸.

Capítulo 5

5. Sistemas vectorizados en artritis reumatoide

5.1 Investigación realizada

En varias enfermedades sistémicas existen cambios estructurales en el microambiente del tejido dañado que permiten el direccionamiento pasivo y activo de los agentes terapéuticos.

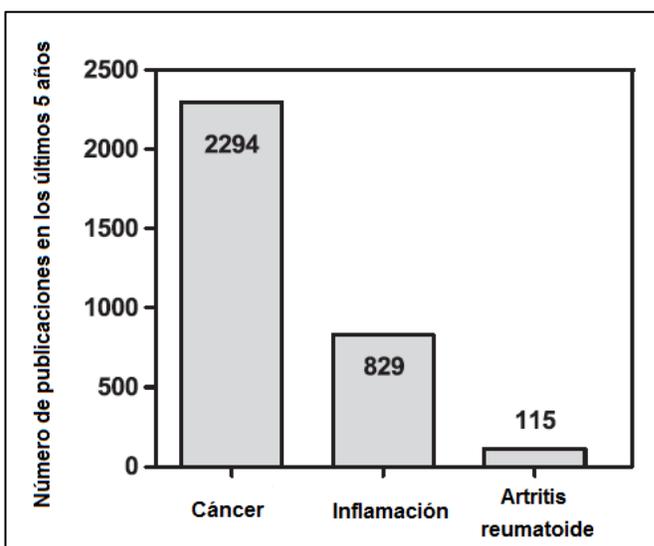


Figura 29. Estudios de investigación publicados sobre sistemas vectorizados para el año 2012.

[CRIELAARD, B., *et al.*, (2012). *Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one.* Journal of Controlled Release. 161; 226 (Figura 1)]

La alta morbilidad y mortalidad de los pacientes con cáncer justifica esta orientación. Al mismo tiempo, el gran impacto socio-económico de algunos desórdenes inflamatorios como la artritis reumatoide, ha impulsado la investigación enfocada al desarrollo de este tipo de sistemas¹⁰⁹ (Fig. 29).

5.2 Similitud entre artritis reumatoide y cáncer

Las razones que han impulsado el reciente interés en el desarrollo de sistemas vectorizados para el tratamiento de la artritis reumatoide se basan en algunas similitudes patológicas con el cáncer, tales como la formación de nuevos

A pesar que los sistemas vectorizados podrían potencializar la eficiencia clínica de las intervenciones terapéuticas, en varios, sino es que en todos los padecimientos, muchas de las estrategias de direccionamiento que se han desarrollado e investigado se enfocan en el cáncer.

La alta morbilidad y mortalidad de los pacientes con cáncer justifica esta orientación. Al mismo tiempo, el gran impacto socio-económico de algunos desórdenes

microvasos dentro de la membrana sinovial, el daño macro vascular y endotelial, así como la formación del *pannus* que es comparable a un tumor cancerígeno¹¹⁰.

5.3 Estrategias de vectorización pasiva en artritis reumatoide

Como se ha mencionado, la vectorización pasiva en el cáncer tiene que ver con el desarrollo de tumores, los cuales generan un aumento de la permeabilidad vascular y del drenaje linfático, características que como se mencionó anteriormente constituyen al efecto EPR.

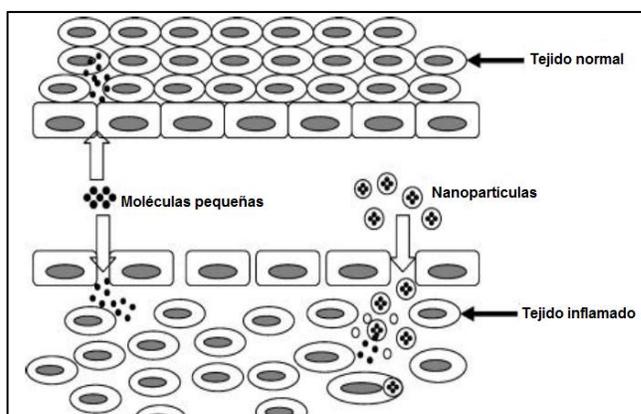


Figura 30. Comparación entre tejido normal e inflamado y el paso de sistemas farmacéuticos a través de ellos.

[SHAJI, J., LAL, M., (2013), *Nanocarriers for targeting in inflammation*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 6 (3); 3 (Figura 1)]

Se ha descrito una relación entre el tamaño molecular de las proteínas y su localización en las articulaciones de los pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas. Aunque el mecanismo preciso continúa aun siendo poco claro, hay quienes sugieren que el proceso de inflamación induce de 6 a 40 veces la permeabilidad de moléculas de alto peso molecular por la barrera articular. Como consecuencia existe un aumento en la extravasación de la albúmina, como complicación en los pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo, el drenaje linfático en tejidos inflamados continúa funcionando, a diferencia de los tumores¹¹¹ (Fig. 30).

5.3.1 Permeabilidad

Los cambios estructurales en la patofisiología celular de la vasculatura inflamada pueden proveer oportunidades para el uso de sistemas de liberación de fármacos en tiempos prolongados.

La habilidad del endotelio vascular para presentar fenestraciones abiertas ha sido descrita durante procesos inflamatorios.

Además existen anormalidades en los vasos sanguíneos, como una alta proporción de células endoteliales proliferantes, deficiencia de pericitos (células contráctiles que envuelven el endotelio de los capilares) y una membrana basal aberrante. Estos fenómenos provocan un aumento en la permeabilidad vascular. Los nanoacarreadores con tamaño entre 20 a 200 nm pueden extravasarse y acumularse dentro del espacio intersticial¹¹².

5.3.2 Retención

El tamaño es un factor importante para el control de la cinética de acumulación de los sistemas farmacéuticos y para la prevención de su difusión al sistema vascular¹¹¹.

Las moléculas pequeñas, con un peso molecular entre 15,000 y 70,000 g/mol se acumulan rápida y fácilmente en los tejidos, a diferencia de moléculas más grandes.

5.3.3 Aclaramiento

Un tamaño límite inferior de 50 kDa aumenta el direccionamiento por el efecto EPR, lo que previene la filtración glomerular. La prolongación del tiempo de circulación de los acarreadores aumenta la probabilidad de que se acumulen en determinado sitio¹¹³.

Del mismo modo, la velocidad de aclaramiento de la circulación sanguínea y en general partículas pequeñas de entre 50 a 300 nm tienen una lenta remoción de la circulación en comparación con aquellas de mayor tamaño¹¹².

Las macromoléculas y algunos acarreadores de tamaño grande son eliminados renalmente del organismo, pues son captados eventualmente por células fagocíticas del sistema retículo-endotelial. Como resultado, sólo una fracción menor al 10% del total del fármaco administrado llega al sitio deseado¹¹⁴.

5.4 Sistemas pasivos desarrollados

5.4.1 Liposomas

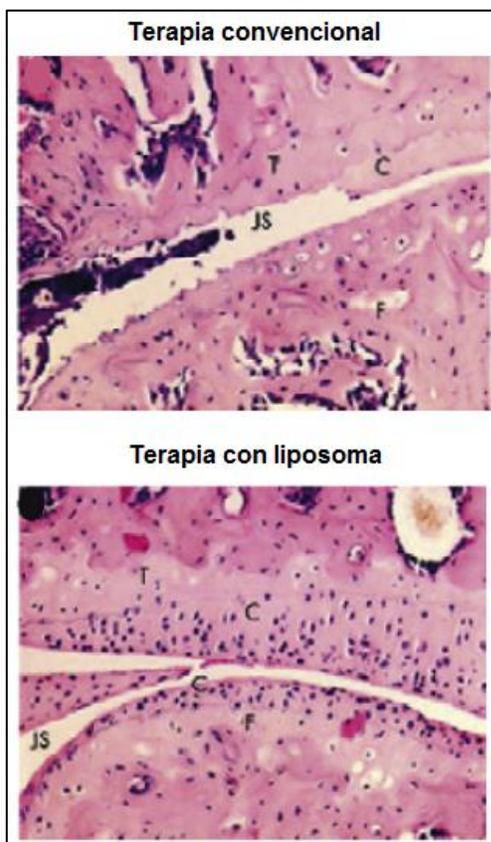


Figura 31. Tejido articular después de la administración de prednisolona formulada convencionalmente y con liposomas PEGilados.

[CRIELAARD, B., *et al.*, (2012). *Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one*. Journal of Controlled Release. 161; 228 (Figura 2C)]

En varios estudios, se ha visto que los liposomas son rápidamente eliminados por el sistema fagocítico monocitario, lo que limita su uso en los procesos de vectorización. Sin embargo, como se ha mencionado, las estrategias como la PEGilación y otras modificaciones superficiales reducen drásticamente la opsonización y por lo tanto la fagocitosis. A continuación se comentan algunos de los estudios que se han realizado con liposomas, que buscan la vectorización pasiva de los liposomas¹¹⁵.

La eficacia terapéutica de los glucocorticoides ha tenido mejores resultados con el uso del fármaco encapsulado en liposomas PEGilados. Por ejemplo, la administración intravenosa durante 7 días, de 10 mg/mL de prednisolona disminuye en un grado significativo a la inflamación articular de ratas con artritis reumatoide inducida, en comparación con el fármaco formulado convencionalmente en dosis iguales.¹¹⁶

Efectos similares se han observado para un corticoesteroide más potente, la dexametasoma, cuando se emplean dosis menores en un modelo similar. El efecto beneficioso de los glucocorticoides cargados en liposomas en la articulación inflamada se debe a la acumulación pasiva de éstos en el tejido articular¹¹⁵ (Fig. 31).

Debido a las complicaciones gastrointestinales que provocan, el uso de los AINEs en la terapia para la artritis reumatoide es limitado. Sin embargo se han hecho muchos intentos para poder generar acarreadores vectorizados, que permitan disminuir los riesgos implicados. En un estudio, se encapsuló indometacina en liposomas de 100 nm. Se observó que el sistema redujo efectivamente la inflamación en las articulaciones en ratas, mientras que una dosis 2 veces mayor del mismo fármaco formulada convencionalmente, sólo mostró un efecto limitado¹¹⁷.

En el caso de fármacos del grupo de los llamados FARMES, como el metotrexato, también hay estudios que utilizan a los liposomas como acarreadores. Se han formulado dos tipos de vesículas lipídicas cargadas de metotrexato. Primeramente liposomas a partir de los fosfolípidos DPPC y DSPC y colesterol, recubiertos con PEG y liposomas convencionales con lecitina, colesterol y ácido fosfatídico, recubiertos con quitosán. Se observó que el fármaco administrado en ambos tipos de liposomas presentó una liberación prolongada, en comparación a los liposomas sin ningún tipo de recubrimiento, además redujeron significativa en el volumen del edema inflamado¹¹⁸.

5.4.2 Nanopartículas

Las nanopartículas fabricadas con polímeros son acarreadores atractivos para la administración de fármacos antirreumáticos, debido a su proceso de manufactura relativamente simple, eficiencia de carga, estabilidad en fluidos biológicos y baja toxicidad. Los sistemas farmacéuticos mencionados en los ejemplos que se presentan a continuación presentan una vectorización de tipo pasiva, dado que no contienen ningún elemento que genere su direccionamiento activo. La aglomeración descrita de los fármacos empleados para el tratamiento de la artritis reumatoide, administrados en liposomas también puede apreciarse al emplear nanopartículas. En un estudio se fabricaron nanopartículas de N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (HPMA) cargados con dexametasona. Al ser administrado en ratas con artritis inducida, se observó mediante marcaje isotópico una vectorización

pasiva a las articulaciones inflamadas¹¹⁹ (Fig. 32). Otros tipos de nanopartículas generadas a partir de PLGA y PLA, además de copolímeros PEG-PLGA/PLA, cargados con betametasona, muestran una liberación prolongada del fármaco, pudiendo prevalecer hasta 14 días en el sitio inflamado, después de la administración intravenosa¹²⁰. Para los fármacos de tipo AINE, también se han generado sistemas. Por ejemplo, se prepararon nanopartículas a partir de metacrilamida que contienen ibuprofeno. Para evaluar la liberación del principio activo, se emplearon estudios *in vivo* en los que se determinó la acumulación del sistema preferentemente en la articulación inflamada, además se registraron ciertos efectos terapéuticos mayores, en comparación al ibuprofeno administrado de forma libre¹²¹.

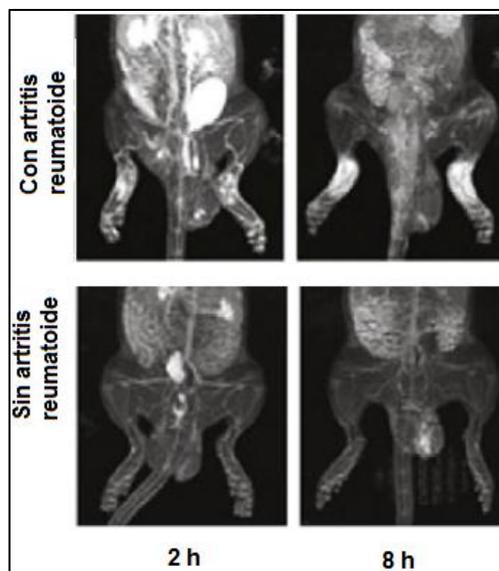


Figura 32. Acumulación de nanopartículas de HPMA en patas de ratas con artritis reumatoide inducida.

[CRIELAARD, B., *et al.*, (2012). *Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one.* Journal of Controlled Release. 161: 228 (Figura 2D)]

5.4.3 Proteínas plasmáticas

Los estudios realizados con HSA marcada isotópicamente muestran que ésta se acumula preferentemente en las articulaciones inflamadas, lo que ha servido como técnica para lograr la vectorización pasiva de fármacos antirreumáticos.

El inhibidor selectivo de la COX 2, celecoxib, ampliamente usado como analgésico en procesos inflamatorios, ha sido exitosamente encapsulado en microesferas de HSA, en las que se detectó una concentración 2.5 veces mayor de celecoxib en las articulaciones inflamadas, en comparación con una articulación sana, lo cual sugiere la vectorización pasiva del sistema¹²².

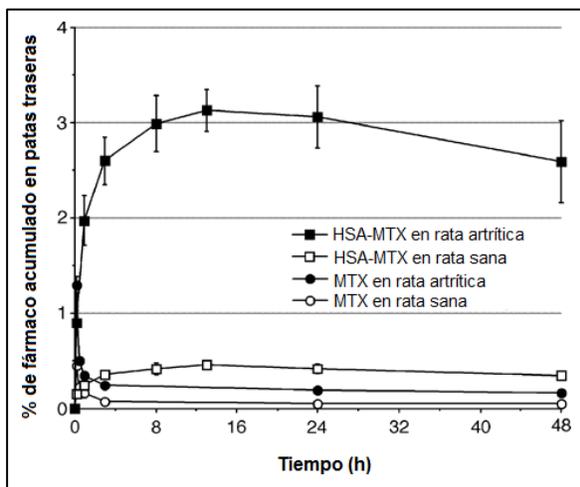


Figura 33. Comparación de porcentaje de metotrexato acumulado en patas de ratas sanas y con artritis reumatoide inducida, en sistema de fármaco con y sin conjugar a HSA.

[CRIELAARD, B., *et al.*, (2012). *Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one*. Journal of Controlled Release. 161; 229

(Figura 3C)]

mayor, en comparación de la administración individual de que cada uno de ellos en dosis dobles, lo que indica la posible acción de sinergia de los sistemas¹²⁴.

Del mismo modo, la HSA ha sido ampliamente usada en sistemas de acarreadores cargados con metotrexato para su liberación exclusiva en articulaciones. La administración de los sistemas conjugados genera una mayor acumulación del fármaco en las patas de ratas con artritis reumatoide inducida, en comparación con ratas sanas, incluso mucho mayor que el fármaco administrado de forma convencional en ambos casos¹²³ (Fig. 33). Otro estudio realizado con el mismo sistema mostró que cuando se combina metotrexato conjugado a la proteína y metotrexato libre, el efecto anti-inflamatorio es mucho

5.4.4 Otros sistemas

En cuanto al uso de sistemas acarreadores de tipo molecular, un estudio describe la aplicación de dendrímeros modificados de PAMAM complejados hidrofóticamente con indometacina. Los estudios realizados muestran concentraciones de 2 a 3 veces mayores del fármaco en las patas de ratas artríticas, en comparación con la formulación convencional¹²⁵. Es importante mencionar que para los demás tipos de fármacos antirreumáticos el uso de estos sistemas es inexistente.

En la Tabla 6, se muestra un resumen con las principales características de los sistemas con vectorización pasiva que se han mencionado en esta sección.

Capítulo 5-Sistemas vectorizados en la artritis reumatoide

Tabla 6. Sistemas de vectorización pasiva para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Tipo de sistema	Composición	Método de fabricación	Fármaco	Observaciones
<p>Liposoma PEGilado¹¹⁵</p>	<p>DPPC 50% DPPG 10% Colesterol 50%</p>	<p>Evaporación de disolvente</p>	<p>Dexametasona</p>	<p>El sistema resulta eficaz para el tratamiento de la artritis reumatoide. Los efectos de la dosis empleada en el sistema fueron superiores a los obtenidos con dexametasona libre.</p> <p>La duración del efecto prevaleció 48 hrs después de la administración intraarticular, manteniéndose altos niveles del fármaco en la membrana sinovial en comparación con el principio activo libre.</p>
<p>Liposoma PEGilado¹¹⁶</p>	<p>PC 55% Colesterol 40% DSPE 2000 5%</p>	<p>Evaporación de disolvente</p>	<p>Dexametasona</p>	<p>Se demostró una prolongación de la liberación del fármaco.</p> <p>El principio activo se acumuló preferentemente en las</p>

Capítulo 5-Sistemas vectorizados en la artritis reumatoide

				articulaciones inflamadas, Existió una eficiencia terapéutica superior en comparación a la formulación convencional.
Nanopartícula¹²⁷	PLGA 50 % PLA 50%	Emulsificación con evaporación de solvente	Betametasona	Se observó una reducción en la articulación inflamada. El efecto obtenido prevaleció durante 1 semana.
Nanopartícula PEGilada¹²⁰	PLGA 50 % PLA 50%	Emulsificación con evaporación de solvente	Betametasona	Las nanopartículas PEGiladas presentaron el mayor grado de acumulación en la articulación, en comparación con las convencionales (Sin PEGilación). El efecto obtenido con las nanopartículas PEGiladas fue 3 veces mayor en comparación a la betametasona libre. Del mismo modo, el efecto tuvo una duración de 9 días.
Nanopartícula¹¹⁹	HPMA	Emulsificación con	Dexametasona	Se obtuvo una vectorización de

Capítulo 5-Sistemas vectorizados en la artritis reumatoide

		evaporación de solvente		<p>tipo pasiva en las articulaciones inflamada.</p> <p>El efecto observado en las articulaciones de las ratas con artritis inducida fue más eficaz en comparación a la formulación convencional.</p>
Dendrímero ¹²⁵	PAMAM	NA	Indometacina	<p>Se favoreció la concentración del principio activo en las regiones inflamadas durante un tiempo prolongado.</p> <p>La eficiencia de la acción del fármaco fue 2.29 mayor a la indometacina libre.</p>
Nanopartícula ¹²¹	Metacrilato	Emulsificación con evaporación de solvente	Ibuprofeno	<p>La liberación del ibuprofeno es lenta.</p> <p>Se observó un mejor efecto analgésico y antiinflamatorio en</p>

Capítulo 5-Sistemas vectorizados en la artritis reumatoide

				comparación a la formulación convencional, lo que se puede correlacionar a una posible acumulación del principio activo en la articulación inflamada.
Liposoma PEGilado ¹¹⁸	EPC Colesterol PA DSOC	Evaporación en fase reversa	Metotrexato	El efecto del fármaco aplicado con este sistema prevaleció durante 24 hrs.
Proteína ¹²³	HSA	NA	Metotrexato	Cantidades significativamente altas de albúmina se concentraron en las articulaciones inflamadas y sólo pequeñas cantidades de éstas son encontradas en el hígado y riñón. La efectividad del sistema fue mejor a comparación del metotrexato libre.
Proteína ¹²⁴	HSA	NA	Metotrexato	Al dar dosis pequeñas de una

Capítulo 5-Sistemas vectorizados en la artritis reumatoide

				<p>terapia combinada de metotrexato conjugado a HSA y fármaco libre, se observa un efecto de sinergia, en comparación de la administración de dosis dobles de cada una de éstas por separado.</p>
<p>Liposomas PEGilados¹²⁶</p>	DSPE	Hidratación de película	Metotrexato	<p>Ambas formulaciones de liposomas son estables y liberan al fármaco durante largos periodos de tiempo, en comparación a liposomas no recubiertos.</p>
<p>Liposomas recubiertos con quitosán¹²⁶</p>	DSPE	Hidratación de película	Metotrexato	<p>Se encontró que hubo una reducción significativa de edemas en articulaciones inflamadas con ambos liposomas, así como una eficiencia terapéutica equivalente.</p>

5.5 Estrategias de vectorización activa en artritis reumatoide

Los sistemas direccionados de forma activa a un tipo de célula específica por medio de un ligando vectorizado pueden ayudar a mejorar la eficiencia de los fármacos. Generalmente, estas estrategias aumentan la concentración total del principio activo en el tejido específico, dado que cambian su distribución en éste¹²⁸.

Para lograr una vectorización activa se deben identificar posibles direccionadores que conduzcan a los sistemas acarreadores a un sitio específico. Estos vectores tienen que ser propios del ambiente patológico en cuestión y deben tener la capacidad de liberar el fármaco exclusivamente en dicha zona. Otras técnicas, recurren a la aplicación externa de estímulos para el direccionamiento de los sistemas.

5.5.1 Vectores naturales

Tanto las células del endotelio vascular, los fibroblastos y las células derivadas de monocitos, como los macrófagos; están involucradas en el proceso angiogénico de enfermedades inflamatorias crónicas, lo que las convierte en direccionadores atractivos para el desarrollo de sistemas vectorizados.

Los dos tipos de células primarias encontradas en el tejido del *pannus*, son los fibroblastos sinoviales (RASFs) y los macrófagos sinoviales de artritis reumatoide (RASMs), las cuales expresan selectivamente receptores superficiales como el receptor folato- β (FR β), CD44 y la integrina $\alpha\beta$ 3, que son buenos candidatos para la vectorización¹²⁹.

Las células angiogénicas del endotelio vascular (VECs) se presentan como resultado de la neovascularización y las moléculas de adhesión molecular E-selectina e ICAM-1 también podrían ser utilizadas en el proceso de direccionamiento de sistemas farmacéuticos¹²⁹.

5.5.2 Estímulos externos

La vectorización mediante la aplicación de un estímulo artificial representa una estrategia para el desarrollo de este tipo de sistemas en medios patológicos no tan específicos.

En los últimos años, se han desarrollado nanoacarreadores que además de encapsular al fármaco pueden contener materiales con propiedades supermagnéticas como los metales y óxidos de Ni, Co y Fe. Estos sistemas son manipulables bajo la influencia de un campo magnético externo, de manera que pueden ser conducidos a tejidos inflamados¹³⁰.

5.6 Sistemas activos naturales desarrollados

5.6.1 Receptor folato

Muchos estudios han descrito que las articulaciones inflamadas de los pacientes con artritis reumatoide presentan una subpoblación de macrófagos activados que expresan un receptor del ácido fólico.

El receptor folato (FR) es un glicosilfosfatidilinositol anclado a una proteína, que tiene la capacidad de unirse al ácido fólico con una alta afinidad ($K_D < 1$ nM), favoreciendo su endocitosis en un compartimento de bajo pH, en el que se disocia. Existen tres formas del receptor FR: FR- α , FR- β y FR- γ . La isoforma FR- α y FR- γ se encuentran presentes primordialmente en la placenta, riñón y algunos tumores malignos. Se expresan en la superficie apical del epitelio, pero por lo general se encuentran ubicados en sitios inaccesibles. Mientras que FR- β se expresa en la placenta y en células hematopoyéticas de la línea mielomonocítica, sin embargo sólo una pequeña cantidad de folato es detectado en la matriz ósea y células sanguíneas después de su administración intravenosa, debido a que éste se encuentra normalmente inactivo¹³¹.

El receptor FR exhibe una expresión limitada en células sanas, pero está presente en muchas células cancerígenas, en las que se encuentra sobre-expresado. Se ha

observado una correlación entre la expresión del receptor FR y el grado histológico del cáncer. Algunos estudios han mostrado, que éste también se encuentra sobreexpresado en macrófagos activados, que están presentes en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. De este modo, sólo una mínima cantidad de células expresan activamente al receptor FR- β ¹³².

La vectorización activa vía folato ha sido usada en técnicas de imagenología y para el desarrollo de agentes terapéuticos. En este sentido, las terapias vectorizadas a folato, atacan selectivamente a células patológicas, sin alterar a tejidos sanos. Debido a que no hay otra población de leucocitos que expresen funcionalmente a FR- β , el nivel de toxicidad asociado a esta terapia de vectorización es muy bajo¹³².

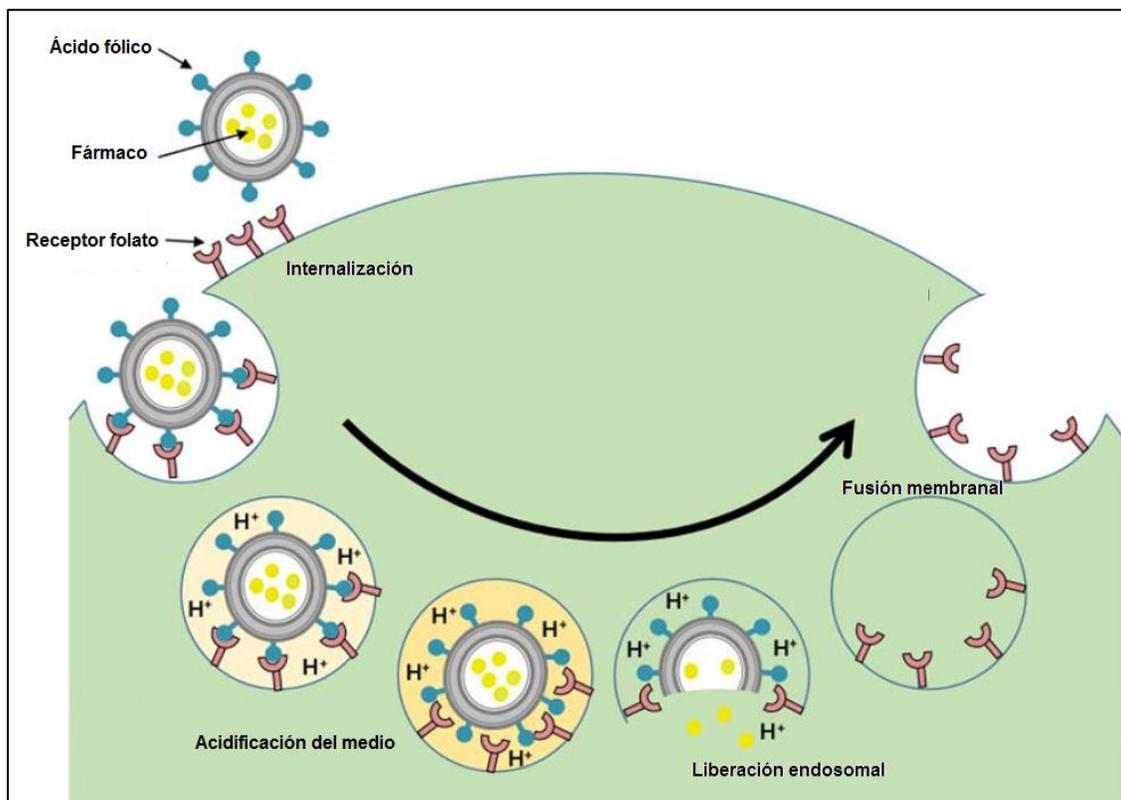


Figura 34. Liberación de fármaco vía vectorización con ácido fólico.

[NOGUEIRA, E., *et al.*, (2015). *Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy*.
Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. Article in press; 6 (Figura 2)]

El ácido fólico es un ligando atractivo para el uso de vectorización de fármacos debido a su bajo peso molecular (PM=441), solubilidad en agua, estabilidad a diversos solventes, pH, facilidad de conjugación, ausencia de inmunogenicidad y una alta afinidad a su receptor. Además, el tamaño pequeño del ligando folato permite su buena penetración en el tejido y rápido aclaramiento de tejidos erróneos¹³³.

En la actualidad, se han encontrado una variedad de moléculas y complejos que pueden ligarse al folato y que han sido diseñadas para favorecer la entrega selectiva de fármacos. Estos agentes incluyen: toxinas proteicas, principios activos de bajo peso molecular, agentes inmunoterapéuticos, liposomas con fármaco encapsulado y nanopartículas, siendo el desarrollo de sistemas acarreadores, las principales estrategias empleadas para la vectorización en la artritis reumatoide¹³³.

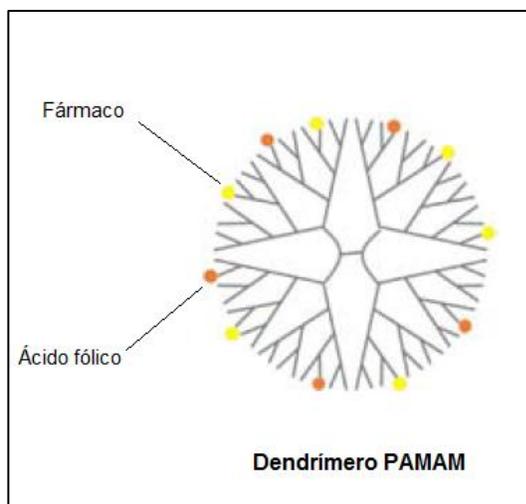


Figura 35. Dendrímero PAMAM ligado a ácido fólico y al fármaco.

[NOGUEIRA, E., *et al.*, (2015). *Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Article in press; 10 (Tabla 2)]

La estrategia de vectorización mediante el receptor folato requiere de la fabricación de acarreadores unidos moléculas de ácido fólico, que favorezca el acercamiento del sistema a los macrófagos, mismos que, a través del proceso de endocitosis, internalizan al sistema. Cuando el acarreador ha sido fagocitado, es sometido a un ambiente ácido, que culmina con la liberación endosomal, provocando la liberación del fármaco¹³⁴ (Fig. 34).

Recientemente se desarrolló un dendrímero direccionado a macrófagos para el tratamiento de la artritis inflamatoria. El dendrímero de PAMAM de 5° generación, se conjugó covalentemente con ácido fólico y con metotrexato (Fig. 35). El conjugado generado actuó como un potente agente antiinflamatorio y redujo ampliamente parámetros de inflamación propios de artritis reumatoide, tales como hinchazón,

volumen de edema, daño al cartílago y resorción de hueso. A pesar que los dendrímeros han sido estudiados como sistemas de liberación de fármacos, algunas consideraciones continúan haciéndose respecto a la seguridad de su uso terapéutico. En particular, la conjugación del fármaco en su superficie, no los protege de la degradación o desactivación antes de alcanzar el sitio específico. Por otro lado, los dendrímeros de generaciones muy altas, tienen grupos aminos superficiales, que limitan su uso para unirlos con grupos ligandos o agentes terapéuticos. Además, se sabe que el tamaño y carga de los dendrímeros de PAMAM influyen en su citotoxicidad, debido a su alta densidad de carga catiónica. De este modo, los dendrímeros desarrollados no son estables¹³⁴.

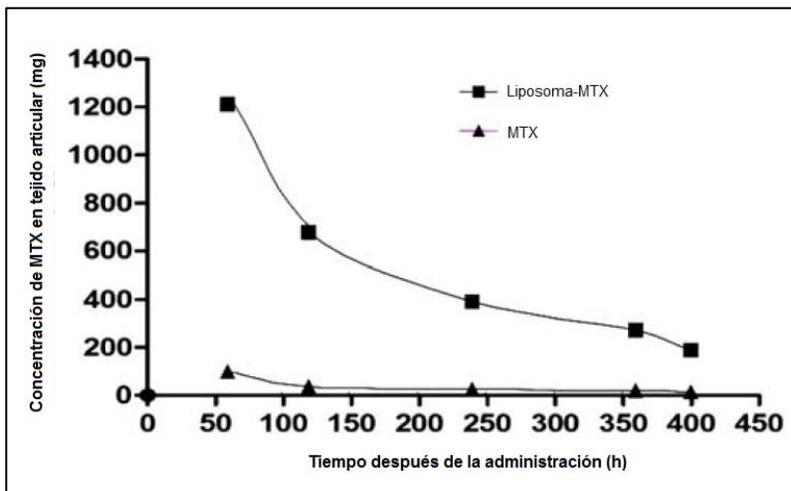


Figura 36. Concentración de metotrexato acumulada en tejido articular tras la administración del sistema liposomal y el fármaco libre.

[NOGUEIRA, E., *et al.*, (2015). *Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Article in press; 10 (Figura 6)]

Otro estudio, ha reportado la encapsulación de metotrexato en una formulación con base en liposomas, utilizando fragmentos hidrofóbicos de proteínas surfactantes conjugadas a ácido fólico para aumentar su tolerancia y eficacia. A diferencia del sistema anterior, los liposomas brindan protección al fármaco que acarrean. La evaluación de este sistema en ratones con artritis reumatoide inducida muestra su acumulación mayoritariamente en las articulaciones. Los análisis en poblaciones celulares de articulaciones inflamadas revelaron que los macrófagos que expresan altamente FR- β captaron una mayor cantidad del sistema ligado a ácido fólico, en comparación a los liposomas convencionales.

Para probar la habilidad del sistema, éste fue administrado en ratones sanos antes de inducirles la artritis reumatoide, observándose un efecto profiláctico¹³⁵ (Fig. 36).

También se han generado nanopartículas a partir de HSA con una superficie modificada por la adición de ácido fólico. La HSA provee varios grupos funcionales en su superficie, que son aprovechados para generar esta unión. Para la fabricación de este sistema fue necesario el uso de agentes entrecruzantes como el glutaraldehído. Los resultados obtenidos *in vivo* muestran una unión e internalización específica de los sistemas a macrófagos con sobre-expresión de FR β , en comparación con la obtenida al administrar las nanocápsulas sin conjugarse al ácido fólico¹³⁵.

5.6.2 Receptor CD44

El receptor CD44 es una glicoproteína multiestructural que se encuentra en la superficie de varias células. Está relacionado en muchas funciones normales de tipo celular, tales como su interacción entre ellas y el tejido extracelular, su migración a los vasos sanguíneos y al interior de los tejidos, la presentación de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y enzimas a otras células o a los tejidos cercanos y la transmisión de la señal superficial celular a su interior; permitiendo la supervivencia de las células en procesos de apoptosis y proliferación¹³⁶.

Las células relacionadas en actividades patológicas; como células cancerígenas e inflamatorias usan CD44 para mantener las acciones anteriormente mencionadas, pero con un enfoque destructivo. Por ejemplo, CD44 puede apoyar la migración de células metástasicas a un sitio del tumor en crecimiento o permitir la migración de células a sitios potenciales de inflamación¹³⁷.

Teóricamente cientos de isoformas de CD44 se pueden generar por *splicing* alternativo. Sin embargo, el número de variantes identificadas hasta el momento es muy pequeño. Estas formas han sido detectadas mayoritariamente en células epiteliales, queratinocitos, leucocitos activados y muchos tipos de células tumorales¹³⁷.

La estructura múltiple natural de CD44 tiene influencia en un amplio repertorio de ligandos, el principal es el ácido hialurónico. Adicionalmente, CD44 puede interactuar con otras moléculas como: colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, sulfato de condroitina, adhesina vascular, osteopontina y cadenas invariables de MHC de clase II. En muchos de los casos CD44 no se une a su ligando si no existe la activación por un estímulo externo. Como tanto CD44 como sus ligando son ubicuos, este mecanismo debe evitar el compromiso innecesario del receptor¹³⁸.

Se han identificado 3 estados de activación de CD44. La forma activa, que une de forma constitutiva a CD44 con el ácido hialurónico; la forma inducible los liga con inducción de citocinas o factores de crecimiento; y la forma inactiva, que no genera ninguna clase de unión, aún en presencia de agentes de inducción¹³⁶.

Muchas actividades patológicas en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide, tienen una dependencia directa o indirecta en procesos de extravación celular sobre CD44. A pesar que existen muchos reportes que indican niveles bajos de CD44 en tejidos sinoviales artríticos y en fibroblastos en comparación a los sanos, se ha encontrado una expresión aumentada de CD44 en linfocitos sinoviales y macrófagos de ratas con artritis reumatoide inducida¹³⁸.

El ácido hialurónico se encuentra presente en concentraciones mínimas en el tejido sinovial artrítico en comparación con el no inflamado, sin embargo el radio de ácido hialurónico libre-no libre (unido al receptor) es 2.5 veces mayor en el patológico¹³⁶.

Recientemente, se han creado sistemas vectorizados para su uso en la artritis reumatoide. Se elaboraron nanopartículas de ácido hialurónico cargadas con un inhibidor de la Y-secretasa, un potente agente terapéutico empleado para el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias. Se realizó la administración *in vivo* del sistema generado teñido en ratas con artritis reumatoide inducida mediante nanopartículas teñidas. Los resultados mostraron que las nanopartículas se acumularon preferentemente en las articulaciones inflamadas. Además que se

presentó un atenuación significativa de la severidad de la enfermedad en comparación con el fármaco administrado de forma convencional, lo cual fue comprobado con los resultados de daño en tejido e infiltración de neutrófilos¹³⁹ (Fig. 37).

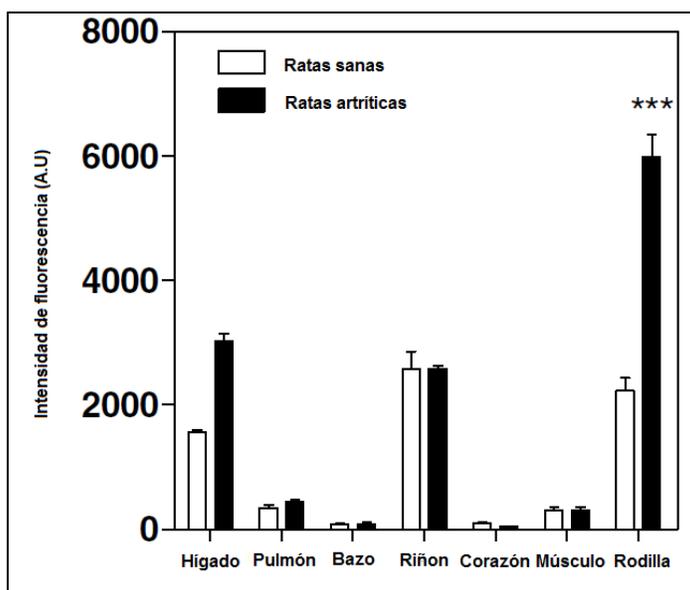


Figura 37. Distribución de nanopartículas de ácido hialurónico marcadas fluorescentemente en órganos de ratas sanas y artríticas.

[HEO, R., *et al.*, (2014). *Hyaluronan nanoparticles bearing γ -secretase inhibitor: In vivo therapeutic effects on rheumatoid arthritis*. Journal of Controlled Release. 192; 298 (Figura 3D)]

5.6.3 Integrina $\alpha_v\beta_3$

Las integrinas son una familia de glicoproteínas heterodiméricas transmembranales que tienen función en la adhesión y migración celular y la traducción de señal. Estos receptores consisten en una subunidad α y una β , que se asocian no covalentemente en diferentes combinaciones. A la fecha, 17 subunidades α y 8 subunidades β , han sido identificadas, pudiéndose asociar en por lo menos 23 diferentes integrinas¹⁴⁰.

La integrina $\alpha_v\beta_3$, también denominada como receptor vitronectina, consta de una subunidad α_v de 125 kDa y una subunidad β_3 de 105 kDa. Se expresa en una variedad de tipos celulares, tales como los osteoclastos, células del tejido muscular, células endoteliales y varias células tumorales. En general, el nivel de expresión de $\alpha_v\beta_3$ es bajo en la mayoría de las células mencionadas¹⁴¹.

El receptor vitronectina media numerosos procesos biológicos relevantes, como la adhesión de los osteoclastos a huesos, la migración de células musculares y la angiogénesis¹⁴¹.

La integrina $\alpha_v\beta_3$ se une a varias proteínas de la matriz extracelular, como los fibrinógenos, fibronectina, osteopontina, trombospondina y vitronectina, a través de la interacción con la secuencia de tripéptidos Arg-Gli-Asp (RGD)¹⁴².

La integrina $\alpha_v\beta_3$ es importante en la progresión del cáncer y algunos procesos inflamatorios, en donde se encuentra sobrerregulada, debido a que participa activamente en el proceso de angiogénesis¹⁴¹.

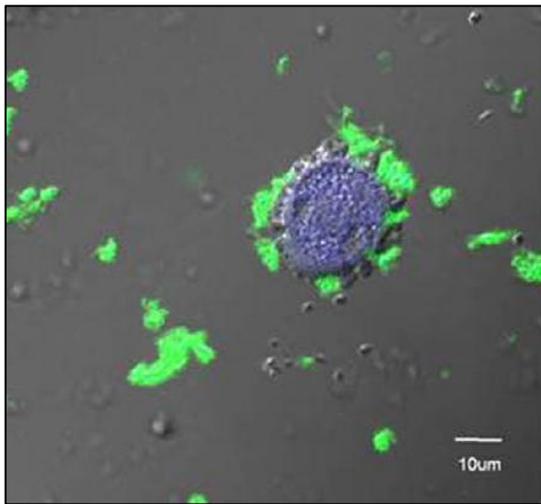


Figura 38. Unión de liposomas ligados a RGD marcados fluorescentemente a fibroblasto patológico vista mediante microscopía electrónica.

[VANNIASINGHE, A.S., *et al.*, (2014). *Targeting fibroblast-like synovial cells at sites of inflammation with peptide targeted liposomes result in inhibition of experimental arthritis*. *Clinical Immunology*. 151; 48 (Figura 2D)]

Un número considerable de estudios experimentales se han realizado para direccionar sistemas farmacéuticos, aprovechando la sobrerregulación de las integrinas, mediante la unión con RGD. Sin embargo, el uso de este tipo de acarreadores es muy escaso aún para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide¹⁴².

Un estudio muestra la fabricación de liposomas PEGilados a partir de DPPC y colesterol en proporción 85:15 que fueron unidos al péptido RGD, de manera que fuera capaz de direccionarse a sitios de inflamación, donde se encuentra sobrerregulada la integrina $\alpha_v\beta_3$. Se administraron sistemas marcados

fluorescentemente para evaluar la eficacia del acarreador en ratas con artritis reumatoide inducida. Mediante técnicas de microscopía, se comprobó la acumulación de los liposomas en los sitios de inflamación¹⁴³ (Fig. 38).

5.6.4 E-Selectina

La familia selectina está representada por 3 receptores compuestos de glicoproteínas transmembranales calcio dependientes con un dominio extracelular a lectina. Se clasifican de acuerdo a la ubicación del sitio de expresión en E-selectina, cuando está en el endotelio; P-selectina, en la placenta; y la L-selectina en los linfocitos¹⁴⁴.

Las selectinas permiten la adhesión de los leucocitos y plaquetas con el endotelio vascular durante procesos de inflamación o cuando el tejido está dañado. A nivel molecular son capaces de reconocer glucanos de las glucoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos, que median el flujo libre de los leucocitos a los vasos para su adhesión reversible. La expresión fisiológica de las selectinas es controlada para limitar reacciones inflamatorias, permitiendo la adherencia de los leucocitos¹⁴⁴.

La E-selectina está profundamente relacionada en muchas enfermedades inflamatorias, pero también en problemas cardiovasculares, cáncer y metástasis. Esta adhesina no es expresada constitutivamente por las células endoteliales. Su expresión es estimulada por moléculas inflamatorias como TNF- α , IL-1 y el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Su expresión ocurre alrededor de 4 horas después de la estimulación con citosinas y decrece rápidamente después de eso. La E-selectina está expresada en la superficie de las células y es gradualmente internalizada por endocitosis y degradada en liposomas, por lo que no se detecta después de 24 horas¹⁴⁴.

Una forma soluble de E-selectina (sE-selectina) se genera enzimáticamente cuando las células endoteliales son activadas en las zonas dañadas de su superficie. Aparentemente la concentración de sE-selectina está correlacionada directamente con la expresión superficial de la célula. Su papel exacto no se

conoce aún, sin embargo algunos estudios han encontrado que ejercen una señal química hacia los neutrófilos, lo que favorece su proceso de migración. Otros reportes sugieren que podría limitar la activación de leucocitos mediados por E-selectina al competir por sitios de unión en la superficie celular¹⁴⁵.

La expresión de E-selectina en el endotelio durante reacciones de inflamación crónicas han sido extensamente estudiado. A pesar que ha sido encontrada expresada en niveles muy bajos en tejidos no inflamados, incluyendo el tejido sinovial, su expresión está sobrerregulada durante la artritis reumatoide¹⁴⁵.

Por otro lado, la expresión de E-selectina ha sido detectada en las células endoteliales de vasos que conforman a los tumores cancerosos, lo cual sugiere que se involucra en la patogénesis de esta enfermedad¹⁴⁶.

Como resultado de la expresión sobrerregulada de E-selectina en procesos de inflamación, se han generado diversas estrategias para el diagnóstico médico con técnicas de imagenología, así como para el desarrollo de sistemas vectorizados en cáncer y artritis reumatoide. La estrategia que se ha empleado para generar el reconocimiento de E-selectina emplea sistemas de anticuerpos (anti-E-selectina), donde la E-selectina funge como el antígeno.¹⁴⁶ Uno de los sistemas fabricados, emplea a la dexametasona, que es covalentemente unida al anticuerpo H18/7 Anti-E-selectina. Este conjugado se une selectivamente a las células endoteliales estimuladas, se internaliza y por acción de lisosomas, libera su contenido. Con este modelo, se observó que los anticuerpos ligados a dos moléculas de dexametasona, conservan la capacidad de reconocer al antígeno. Sin embargo altos radios de carga del fármaco (más de 10 moléculas de dexametasona por anticuerpo), reducen la solubilidad del conjugado, pudiendo desfavorecer el reconocimiento a E-selectina¹⁴⁷.

Otro estudio realizado, genera liposomas cargados igualmente con dexametasona, pero ligados a anticuerpos anti-E-selectina. De igual manera, estos sistemas son internalizados por células endoteliales activadas, sin embargo se determinó que su unión a E-selectina se satura a una baja concentración. En un modelo *in vivo* de

ratón con artritis inducida se aprecia una acumulación de ambos acarreadores en el área inflamada, además de presentarse en menor grado en el hígado y riñón¹⁴⁸ (Fig. 39).

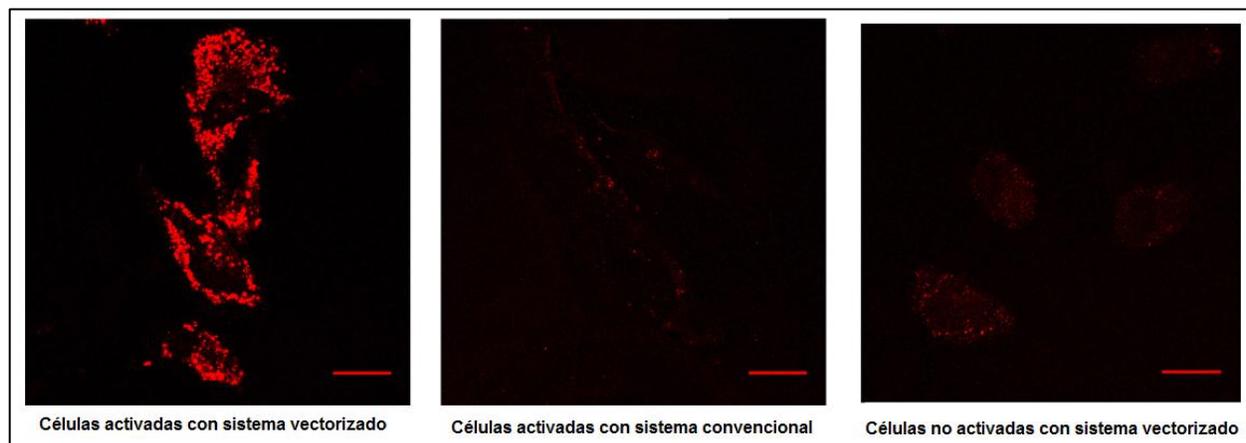


Figura 39. Unión de sistema vectorizado vía E-selectina y sistema convencional con diferente grado de activación de células endoteliales.

[JUBELI, E., *et al.*, (2012). *Preparation of E-selectin-targeting nanoparticles and preliminary in vitro evaluation*. International Journal of Pharmaceutics. 426; 298 (Figura 6)]

5.6.5 ICAM-1

La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación. Este proceso está mediado por la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)¹⁴⁹.

El ICAM-1 es una proteína transmembranal que funge como ancla para los leucocitos durante procesos inflamatorios. Se expresa predominante en una variedad de células inflamatorias e inmunes, como células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales y se encuentra sobreexpresado en condiciones patológicas. Por otro lado, ICAM-1 juega un papel crítico en la metástasis y progresión de un tumor cancerígeno¹⁴⁹.

Las moléculas específicas afines a ICAM-1, incluyen anticuerpos (anti-ICAM) y algunos péptidos, mismas que han sido explorados para el desarrollo de sistemas de vectorización. Mediante la unión de anti-ICAM a un polímero, se pueden formar

acarreadores que se direccionen a sitios inflamados o células cancerígenas, liberando el fármaco mediante un proceso en de fagocitosis-lisosomal¹⁵⁰.

Los estudios de sistemas vectorizados que considera a ICAM-1 han sido generados exclusivamente para el tratamiento del cáncer, pero debido a la gran similitud en la sobre-expresión de esta molécula, en otras enfermedades como la artritis reumatoide, muchos autores han señalado que estos estudios podrían tomarse como modelo para el desarrollo de sistemas direccionados a tejidos inflamados en esta enfermedad¹⁵⁰.

Un ejemplo es la fabricación de nanopartículas de PLGA unidas al anticuerpo anti-ICAM cargadas con el fármaco anticancerígeno doxorubicina. Para generar los estudios de distribución del sistema, las nanopartículas fueron marcadas con moléculas fluorescentes. Los resultados mostraron una mayor acumulación de estos acarreadores en células cancerígenas, en comparación de la obtenida en células sanas, por lo que constituye un sistema de vectorización¹⁵¹.

5.7 Sistemas activos artificiales desarrollados

5.7.1 Estímulo magnético

Los acarreadores magnéticos ofrecen la posibilidad de administrar un fármaco directamente a un sitio específico en el cuerpo humano, por la aplicación de un campo magnético externo que lo conduce a dicha zona (Fig. 40).

Idealmente los sistemas usados para estos fines deben tener altos valores de magnetización a las temperaturas de operación. Debido a sus propiedades magnéticas específicas, los materiales

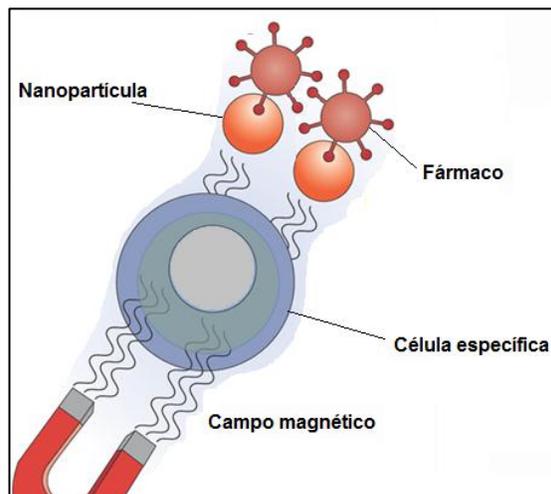


Figura 40. Vectorización vía estímulo magnético.

[Plank, C., (2009). *Magnetic targeting in drug and gene delivery*. Nature Nanotechnology. 4; 544 (Figura 1)]

más comúnmente empleados para el desarrollo de estos acarreadores incluyen metales puros como el hierro y cobalto, así como óxidos de hierro como la magnetita (Fe_3O_4). Es importante mencionar, que los estudios de toxicidad realizados en modelos animales con este tipo de sustancias han demostrado biocompatibilidad, además los análisis histológicos han mostrado que su acumulación en los tejidos pero no produce alteraciones considerables¹⁵².

El desarrollo de sistemas magnéticos está sujeto a una serie de factores críticos, que dificulta su fabricación, tales como el bajo control en el tamaño y forma de los acarreadores, que por lo general son nanopartículas. Además, es importante la correcta selección del soporte o medio con la que se elaboran¹⁵².

Comúnmente, estos sistemas tienen núcleos magnéticos con un recubrimiento externo de un polímero, otro metal o una sustancia no metálica como la sílica. Los polímeros más utilizados son el dextrano, utilizado por su alta biocompatibilidad y afinidad por el hierro; PEG, con gran capacidad antiadherente que reduce la captación de las partículas por los macrófagos, aumentando su tiempo de circulación en sangre; PVA, debido a sus buenas propiedades emulsionantes; y el quitosán que proporciona una envoltura biocompatible, catiónica e hidrofílica¹⁵³.

Los materiales no poliméricos, que incluyen oro y sílice, son también utilizados para recubrir nanopartículas magnéticas. El oro protege los núcleos de óxido de hierro de la oxidación y una superficie con buena capacidad para ser biofuncionalizada. La sílica es un material que forma una cubierta de diferentes grosores alrededor de los núcleos magnéticos de las nanopartículas, confiriéndoles estabilidad¹⁵³.

Una vez que el sistema magnético ha sido administrado al organismo, los acarreadores son direccionados al sitio específico, mediante la aplicación de un campo magnético externo que es suministrado por el acercamiento de imanes o magnetos sobre la zona¹⁵³.

A pesar que la creación de gradientes de campo magnético, genera la vectorización del sistema, el efecto conseguido podría no ser igual para los sitios

profundos dentro del organismo, puesto que la intensidad del campo magnético decae drástica y rápidamente con la distancia. Para lidiar con este problema, algunos grupos han propuesto, la implantación de magnetos en el cuerpo cerca del sitio específico¹⁵⁴.

Dentro de los sistemas más sencillos fabricados para el tratamiento de la artritis reumatoide, se encuentra el desarrollo de nanopartículas cargadas con metotrexato y hierro, empleando como polímero soporte al PLGA. Se comprobó que el fármaco es liberado en un sitio específico al aplicar un estímulo magnético. Adicionalmente, los estudios *in vivo* muestran mayor efectividad terapéutica de este acarreador, en comparación con la administración libre del fármaco. Por otro lado, los estudios citotóxicos no muestran daño a los tejidos biológicos cuando están en contacto con las nanopartículas magnéticas. Finalmente se observa el direccionamiento hacia los tejidos inflamados y una acumulación preferencial en el sitio en el que se ejerce el campo magnético, confirmando la vectorización del sistema¹⁵⁴.

En un estudio más reciente, se desarrollaron y evaluaron microcápsulas de poli-(4-estirenosulfato de sodio (CaCO₃-PSS) cargadas con metotrexato, que fueron recubiertas con poli-(alilamina-hidroclorato) y poli (4-estirenosulfonato). El hierro fue incorporado entre las capas de la cubierta. Las nanopartículas elaboradas fueron evaluadas empleando ratas artríticas. Los resultados obtenidos mostraron el direccionamiento del sistema al sitio de inflamación al aplicar un estímulo magnético, de modo que el fármaco mostró mayor eficacia en comparación con la administración de estas mismas partículas sin estímulo magnético y la formulación convencional del metotrexato¹⁵⁵.

5.8 Control de la liberación

Las estrategias de direccionamiento son buenas técnicas para la vectorización de los fármacos. Sin embargo, la liberación del fármaco *in vivo*, puede ser deficiente si no existe un modo de controlar su especificidad en los sitios deseados, es por ello que se debe considerar el uso de sistemas de liberación sensibles ante

determinados estímulos, que aunados al direccionamiento del acarreador, ya sea de manera pasiva o activa, permita la liberación selectiva del principio activo en la zona afectada. Para lidiar con estos problemas, se toman en cuenta las características del ambiente patológico de la enfermedad, es decir los cambios químicos, físicos o biológicos que genera.

Como se ha revisado, el desarrollo de la artritis reumatoide genera afectaciones estructurales en el tejido articular, que van ligadas a cambios en el microambiente de la zona, como resultado de los procesos de inflamación y angiogénesis.

Los procesos inflamatorios están ligados al desarrollo de acidosis e hipertermia en los tejidos involucrados. El valor de pH de las articulaciones artríticas es significativamente diferente a las sanas. Se ha observado que existe una disminución de pH de aproximadamente 7.4, en tejidos sanos a 5 en tejidos artríticos¹⁵⁶. Del mismo modo, el tejido articular dañado puede alcanzar temperaturas cercanas a 40°C, cuando los valores en tejidos sanos oscilan entre 36.5 y 37.2°C¹⁵⁷. Del mismo modo, como resultado del proceso de angiogénesis, el tejido articular de pacientes con artritis reumatoide presenta una disminución de oxígeno tanto en la membrana basal como en el líquido sinovial, lo cual conlleva a presiones de hasta 20 mmHg en comparación con los 74 mmHg presentados en individuos sanos¹⁵⁸.

5.8.1 Sistemas sensibles a hipoxia

Dado que las condiciones de hipoxia son raramente presentadas en tejidos sanos, se puede tomar como estímulo para la liberación de fármacos en zonas artríticas. La hipoxia ha sido utilizada como técnica de direccionamiento para el desarrollo de agentes diagnósticos y terapéuticos¹⁵⁸.

Los compuestos utilizados para el diseño de estos sistemas son capaces de reaccionar frente a la ausencia de oxígeno, tales como los derivados nitroaromáticos y de quinonas. El compuesto más ampliamente usado es el, 2-nitroimidazol¹⁵⁸. Se ha demostrado que bajo condiciones de hipoxia, el 2-

nitroimidazol se convierte en el compuesto hidrofílico, 2-aminoimidazol, a través de una serie de bioreducciones, las cuales son altamente reactivas con las macromoléculas que conforman a los tejidos hipóxicos. Esto se debe a que los compuestos nitroaromáticos son reducidos por enzimas nitroreductasas bajo condiciones hipóxicas. De este modo, el reordenamiento electrónico de la molécula, provoca la liberación del fármaco¹⁵⁹ (Fig. 41).

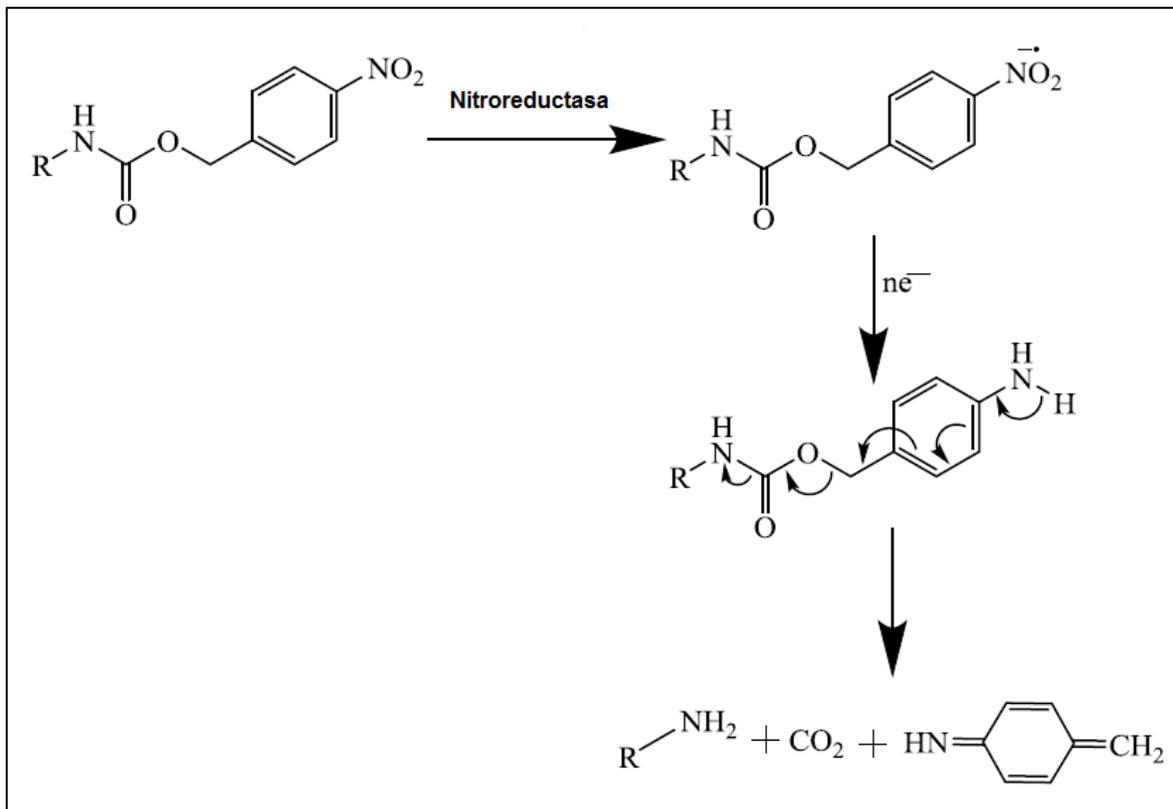


Figura 41. Mecanismo de reacción de reducción de un compuesto nitroaromático por acción de la nitroreductasa en condiciones de hipoxia.

[THAMBI, T., et al., (2016). *Poly (ethylene glycol)-b-poly (lysine) copolymer bearing nitroaromatics for hypoxia-sensitive drug delivery*. Acta Biomaterialia. 29; 267 (Figura 7)]

En la fecha de elaboración de dicho documento, no se encontraron sistemas aplicados para la artritis reumatoide, pero sí para el cáncer. Como es sabido, existen semejanzas entre ambas enfermedades. El proceso de neovascularización en la formación de tumores cancerígenos, provoca un grado similar de hipoxia, por

lo que pueden considerarse los sistemas elaborados para el cáncer como modelos que pueden posteriormente ser aplicados en la artritis reumatoide¹⁶⁰.

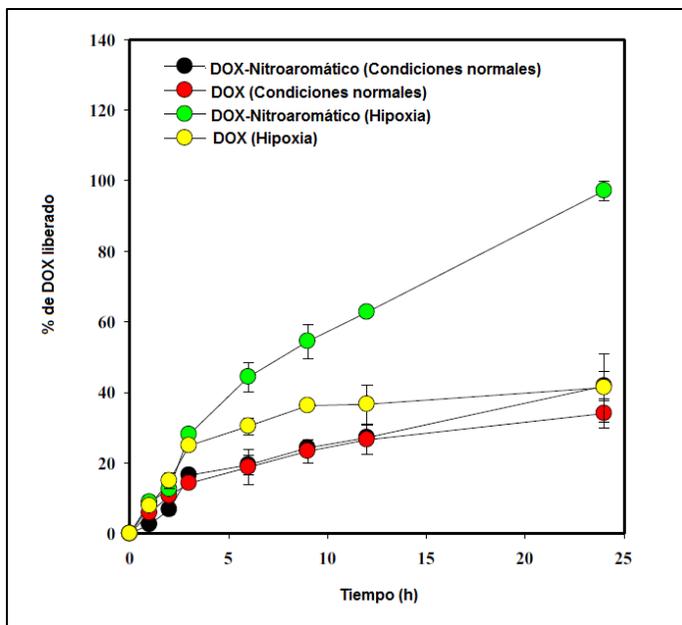


Figura 42. Porcentaje de doxorubicina liberada de sistemas convencionales y sistemas sensibles a hipoxia en condiciones normales de oxígeno y de hipoxia.

[THAMBI, T., *et al.*, (2016). *Poly(ethylene glycol)-b-poly(lysine) copolymer bearing nitroaromatics for hypoxia-sensitive drug delivery*. *Acta Biomaterialia*. 29; 267 (Figura 8)].

mismo modo, la liberación de este último fue mayor, en comparación a la administración convencional del principio activo (Fig. 42). Estudios de biodistribución *in vivo* demostraron que el sistema fabricado se acumuló preferentemente en tumores hipóxico por vectorización pasiva¹⁶¹.

Otro grupo de investigación genera bloques anfifílicos de un copolímero compuesto de PEG y poli- ϵ -(4-nitro)benziloxycarbonil-L-lisina, como los componentes hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente. Debido a la naturaleza anfifílica del copolímero, en condiciones acuosas se forma micelas, lo que provoca la encapsulación del fármaco doxorubicina. La liberación del sistema generado

Uno de los estudios más recientes contempla la preparación de nanopartículas a partir de un derivado modificado de 2-nitroamidazol, que es conjugado vía una reacción de amidación con carboximetildextrano. El fármaco empleado en este modelo fue la doxorubicina, que fue efectivamente encapsulado. Se encontró que el sistema presentó una liberación casi nula en tejidos sometidos a condiciones normales de oxígeno, mientras que la liberación de los tejidos bajo condiciones hipóxicas fue marcadamente mayor. Del

mostró un incremento de la liberación en tejidos hipóxicos en comparación a los oxigenados. Adicionalmente, el uso de este sistema ocasionó que el fármaco se aglomerara en los tumores cancerígenos, mientras que la acumulación para otro tipo de órganos fue mínima, en comparación a la obtenida con la administración libre de doxirrubicina¹⁶² (Fig. 43).

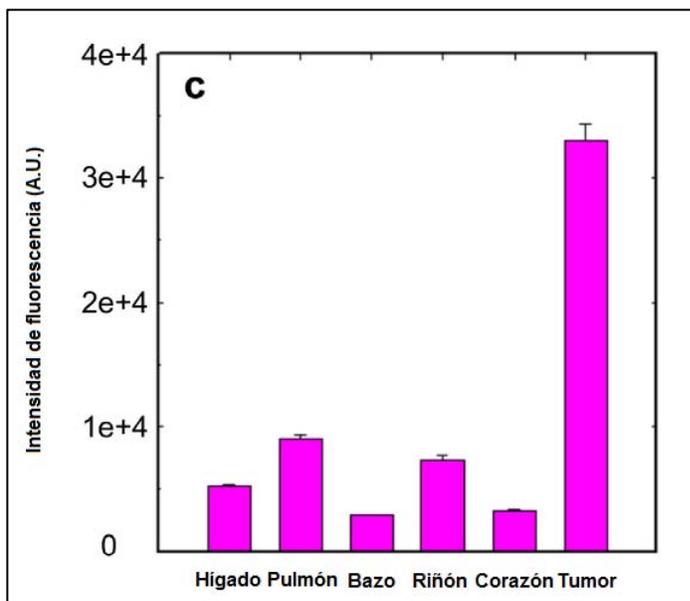


Figura 43. Acumulación de doxorrubicina en distintos órganos empleando un sistema sensible a hipoxia.

[THAMBI, T., *et al.*, (2014). *Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery*. *Biomaterials*. 35; 1741 (Figura 9C)].

5.8.2 Sistemas sensibles a pH

Es bien conocido que los valores de pH varían significativamente en diferentes tejidos y órganos cuando existe un estado de inflamación en la artritis reumatoide, o en la formación de tumores cancerígenos. Este gradiente de pH permite el desarrollo de sistemas de liberación estímulo-sensibles.

Las estrategias empleadas para el desarrollo de estos sistemas incluyen la introducción de grupos funcionales ionizables al acarreador, tales como las aminas, ácido fosfórico, ácido carboxílico, principalmente. Estos grupos pueden aceptar o donar protones, lo que ocasiona que se sometan a cambios de sus propiedades físicas y químicas como su hinchamiento o solubilidad, que resulta en la liberación del principio activo¹⁶³.

Los polímeros pH-sensibles empleados para el desarrollo de estos poseen grupos ionizables en sus estructuras. Los más comúnmente usados son los aniónicos, que contienen grupos carboxílicos, como ácido poli-acrílico (PAA), ácido poli-metacrílico (PMAA), ácido poli-etilacrílico (PEAA), ácido poli-propilacrílico (PPAA), ácido poli-butirilacrilato (PBAA), N-isopropilacrilamida (NIPAM) y ácido poli-glutámico (PGA), anhídrido poli-alilamina hidrociorato-citracónico (PAH-Cit) y polímeros que contienen grupos sulfonamida (Fig. 44).

En condiciones ácidas estos polímeros están protonados y su estructura es relativamente hidrofóbica. Cuando el pH y la composición iónica del medio cambian, los polímeros se ionizan y existe un cambio, que puede ser su disociación; su desestabilización, que incluyen el colapso o hinchamiento de su estructura; además de cambios en el coeficiente de partición entre el fármaco y el vehículo¹⁶⁴.

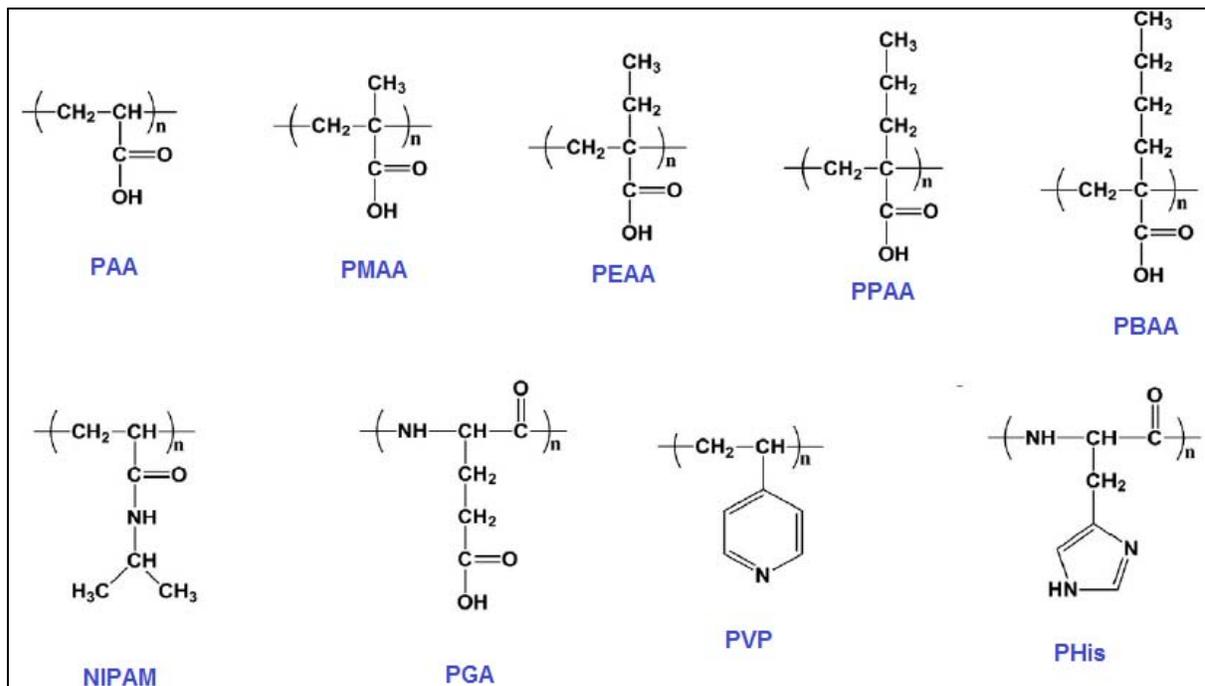


Figura 44. Polímeros aniónicos y catiónicos sensibles a pH.

[LIU, J., et al., (2014). *pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy*. Biotechnology Advances. 32; 697 (Figura 3)].

Otra clase de polímeros son los catiónicos, que incluyen a la poli-4-vinilpiridina (PVP) y a la poli-L-histidina (PHis), que contienen grupos piridina o imidazol. La respuesta del PVP depende de la desprotonación de los grupos piridina, mientras que el anillo imidazol del PHis es una base débil que tiene la habilidad de adquirir carga catiónica cuando el pH baja¹⁶⁴.

Otra estrategia para el diseñar de sistemas pH-sensibles, se basa en el uso de puentes o ligandos ácidos químicamente lábiles que se unen de manera covalente al fármaco. Estos ligandos son estables a pH fisiológico, pero se degradan o hidrolizan en un medio ácido. Los más empleados incluyen a los grupos acetal, ortoester, hidrazona e imina¹⁶⁴.

También se ha optado por la fabricación de liposomas pH-sensibles. La adición de los grupos protonables al sistema, causa repulsión electrostática entre las bicapas lipídicas. Dado que la formación de la estructura lipídica sólo se favorece a pH fisiológico, cuando el sistema está en un medio ácido, los grupos carboxilo se protonan y desestabilizan la formación del liposoma, permitiendo la salida del fármaco¹⁶³.

Dentro de los sistemas fabricados para el tratamiento de la artritis reumatoide se encuentra el desarrollo de nanopartículas cargadas de dexametasona, basadas en un copolímero de HPMA. Los estudios iniciales *in vitro* demostraron que la liberación del fármaco tuvo una dependencia con el pH del medio. A un pH de 5 y 37°C, se observaron los mayores niveles de liberación de dexametasona. Cuando el sistema fue administrado a un modelo de ratas con artritis reumatoide inducida, los efectos antiinflamatorios observados fueron menores en comparación al fármaco libre administrado intravascularmente. Los datos obtenidos por el estudio muestran que el efecto diferencial de las nanopartículas se debe a su acumulación selectiva y liberación pH-sensible en las articulaciones artríticas¹⁶⁵.

En estudios con metotrexato, se han fabricado nanogeles como acarreadores de fármaco. Estos sistemas se fabricaron vía autoensablaje de lisozima, pectina y metotrexato, a través de interacciones electroestáticas, que son evaluadas por sus

propiedades fisicoquímicas, perfil de liberación, citotoxicidad in vitro, captación celular y acumulación en zonas artríticas. Los estudios realizados mostraron una liberación del metotrexato preferentemente en medios ácidos (Fig. 45). Se observó que el nanogel fue fácilmente endocitado por macrófagos, lo que llevó a una acumulación del fármaco en zonas de inflamación, a diferencia de la administración libre del metotrexato¹⁶⁶.

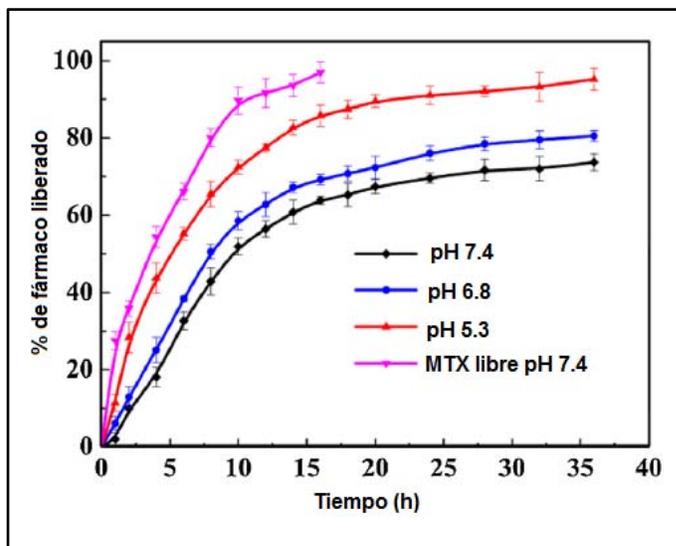


Figura 45. Porcentaje de fármaco liberado del nanogel contra tiempo a diferentes pH del nanogel y metotrexato libre.

[LIN, L., *et al.*, (2015), *Construction of pH-sensitive lysozyme/pectin nanogel for tumor methotrexate delivery*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 126; 462

5.8.3 Sistemas sensibles a temperatura

Los polímeros termosensibles responden a los cambios de temperatura del medio, que resulta en una modificación en su conformación, solubilidad y balance hidrofóbico e hidrofílico. Estos fenómenos son descritos por la temperatura crítica mínima de solución (LCST). LCST se define como la temperatura crítica en la que la solución polimérica muestra una separación de fase, yendo desde una sola fase (estado isotrópico), a dos fases (estado anisotrópico)¹⁶⁷ (Fig. 46).

La temperatura LCST puede ajustarse a través de la copolimerización de monómeros hidrofóbicos o a través del control del peso molecular del polímero. De este modo, un incremento en los monómeros hidrofóbicos o en el peso molecular, implican una disminución de LCST. Por otro lado, la incorporación de monómeros

hidrofílicos favorece la creación de puentes de hidrógeno, por lo que aumenta la LCST¹⁶⁷.

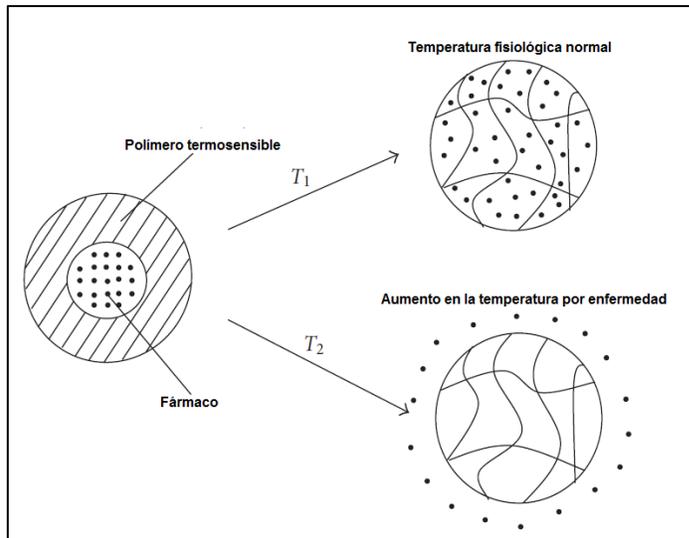


Figura 46. Comportamiento de sistema termosensible LCST a diferentes temperaturas.

[SHAO, P., *et al.*, (2011). *The application of thermosensitive nanocarriers in controlled drug delivery*. Journal of Nanomaterials. 201; 6 (Figura 5)].

Los polímeros con una baja LCST son los más usados para los sistemas de entrega de fármaco, destacando NIPAM y los poloxámeros. NIPAM es el polímero termosensible más estudiado y usado en la fabricación de sistemas, porque es soluble a temperatura ambiente. Presenta un valor de LCST de 32°C, muy similar a la temperatura normal del cuerpo humano. Encima de LCST, las soluciones poliméricas de NIPAM se vuelven opacas,

puesto que los puentes de hidrógenos se separan y el polímero expulsa moléculas de agua y se deshidrata¹⁶⁸.

El uso de bloques de copolímeros basados en secuencias de polioxietileno-polioxipropileno (PEO-PPO), constituyen una familia de polímeros ampliamente comercializados, que incluye los poloxámeros. Los poloxámeros son polímeros no iónicos ($PEO_n-PPO_n-PEO^n$) con muchos usos farmacéuticos. Presentan una transición de fase sol-gel abajo o cerca de la temperatura corporal y una transición gel-sol cerca de 50°C en relativamente altas concentraciones¹⁶⁸.

También se pueden generar acarreadores termosensibles a partir de lípidos. Los liposomas usan lípidos con temperaturas de transición de fase gel-líquido cristalino entre 40 y 45°C. Un aumento en la temperatura del medio, puede llegar a superar la temperatura de transición de fase, provocando la desestabilización de las bicapas lipídicas del liposoma, permitiendo la salida de fármaco. Para obtener

mejores resultados cinéticos, una estrategia ha sido la conjugación de polímeros termosensibles de cadenas altamente hidratadas al liposoma. De este modo, el liposoma se mantendrá estable cuando la temperatura ambiental esté debajo de LCST, pero cuando el liposoma se encuentre sobre esta temperatura, las cadenas poliméricas se contraen y deshidratan. Un sistema sensible a la temperatura se acumulará en el sitio inflamado debido al efecto EPR. Cuando la temperatura incrementa, se promueven cambios en la microestructura del sistema polimérico, el cual cambia a un estado de gel, que facilita la liberación del fármaco¹⁶⁸ (Fig. 47).

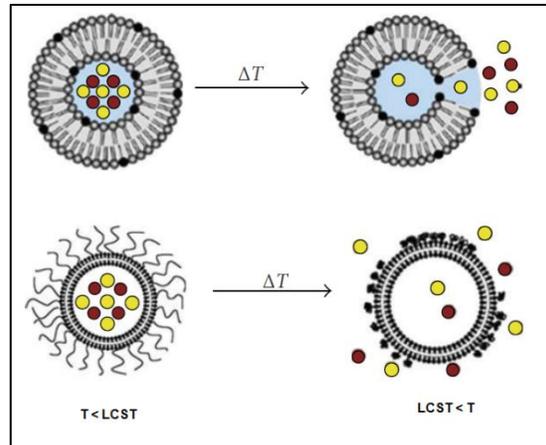


Figura 47. Estrategias de liberación de fármaco en liposomas termosensibles.

[SHAO, P., *et al.*, (2011). *The application of thermosensitive nanocarriers in controlled drug delivery*. Journal of Nanomaterials. 201; 6 (Figura 6)].

Los sistemas termosensibles para el tratamiento de la artritis reumatoide que se han desarrollado con mayor frecuencia son los hidrogeles y nanogeles. Por ejemplo en uno de los estudios modelos se han preparado copolímeros basados en sistemas de hidrogeles compuestos de PLGA-PEG-PLGA que pueden ser administrados vía interarticular. Los estudios generados con el sistema muestran la liberación del fármaco en los sitios de inflamación cuando la temperatura se incrementa, del mismo modo se comprobó una acumulación del fármaco en dichas zonas¹⁶⁹. Por otro lado, se formuló un hidrogel de aplicación transdérmica a partir del copolímero PLA-PLGA cargado con extractos naturales de *Aconitum vilmorinianum* Kom y *Urtica dioica*, los cuales median la inflamación generada por la artritis reumatoide. Este hidrogel fue evaluado *in vivo*, de modo que se comprobó que no es irritante para la piel. Además, el hidrogel mostró una inhibición en la inflamación de los edemas inducidos en patas de ratas, pues se comprobó su liberación específica en dichas zonas debido a un posible aumento en la temperatura¹⁷⁰.

Discusión

El desarrollo patogénico de la artritis reumatoide genera la formación de estructuras y microambientes únicos, como los procesos de angiogénesis, formación del *pannus*, degradación del cartílago y erosión del hueso; que pueden ser empleados para la generación de sistemas direccionados a sitios inflamados.

En los sistemas de vectorización pasiva, la enfermedad por sí misma crea las condiciones de direccionamiento y retención de los acarreadores en determinado sitio. La artritis reumatoide se vale del efecto EPR para conseguir estos objetivos. La permeabilidad y retención de los sistemas farmacéuticos se consigue solamente cuando su tamaño es adecuado, con el fin de poder evitar la captura por células del sistema retículo-endotelial, que los eliminan fácilmente. Para poder evadir este problema, la gran mayoría de las investigaciones realizadas emplean sistemas PEGilados. Los estudios realizados con sistemas pasivos muestran su acumulación preferente en zonas inflamadas, lo cual evita la toxicidad de órganos no específicos. Desafortunadamente, la generación de estos sistemas nanométricos requiere de la adecuación de las técnicas de fabricación, puesto que a pesar que se han propuesto numerosos y variados métodos, aún es poco práctico conseguir acarreadores estables, de tamaño uniforme, adecuada capacidad de carga, que sean fácilmente escalables y económicamente viables para poder producirlos y comercializarlos.

Como se ha mencionado, la sobreexpresión en los receptores folato, CD44 e integrina $\alpha_v\beta_3$, de los macrófagos; y las moléculas de adhesión, como E-selectina e ICAM-1, permite la vectorización activa los sistemas farmacéuticos, al incluir una molécula afín o anticuerpo. La investigación realizada hasta la fecha ha mostrado el correcto desempeño de estas estrategias, aumentando la eficacia del fármaco y acumulación en sitios específicos. Sin embargo, existen algunas desventajas que se pueden presentar. Por un lado, a pesar que la expresión de los receptores es superior durante los procesos inflamatorios en la artritis reumatoide, no son totalmente exclusivos. Algunos como el receptor folato, se encuentran ubicados de

Discusión

forma inaccesible, impidiendo la llegada del sistema, otros como la E-selectina se encuentran expresado en otros sitios pero de manera muy escasa, lo que quita la probabilidad que los acarreadores puedan llegar ahí, sin embargo para el caso de los receptores CD44, integrina $\alpha v\beta 3$ y la adhesina ICAM-1 no pueden evitar el direccionarlos a zonas no específicas, en donde también están expresados. Esto aunado a lo caro que resulta la obtención de los anticuerpos, en el caso de los sistemas en donde no se puede emplear una molécula afín, que ya de entrada resulta problemático desde el mismo periodo de investigación. Y si bien en la actualidad existen numerosos tratamientos biotecnológicos, lo ideal es poder generar un sistema eficaz y accesible para la mayoría de la población. Del mismo modo, al igual que los sistemas vectorizados por medios pasivos, no existe la estandarización de los métodos para su fabricación.

Los sistemas vectorizados basados en la aplicación de estímulos externos como el magnético conducen al acarreador farmacéutico a un sitio específico. Se ha comprobado que la inclusión de materiales magnéticos en estos sistemas no genera problemas toxicológicos al organismo, por lo que han resultado de factible utilidad. En especial, para la artritis reumatoide estos sistemas serían bastante adecuados, dado que a lo largo del desarrollo patológico de la enfermedad, no se ven afectadas todas las articulaciones, sino que los episodios de dolor pueden variar, localizándose en diferentes sitios, pudiendo ser a veces intensos en determinadas zonas y nulos en otras. De esta manera, a través de la aplicación de un campo magnético externo, el paciente podría direccionar los sistemas farmacéuticos a las zonas donde existe dolor o incomodidad. Los estudios generados hasta el momento con nanopartículas magnéticas han mostrado la funcionalidad del sistema, pero del mismo modo que se ha comentado en los casos anteriores, es necesario poder optimizar los procesos para su desarrollo.

Las desventajas que se han mencionado para la fabricación de sistemas vectorizados no son una limitación, únicamente son dificultades que pueden ser superadas con la generación de nuevos materiales o la implementación de mejores métodos de fabricación.

Discusión

Las estrategias de vectorización son indispensables para favorecer la acumulación de un sistema en determinada zona, sin embargo, para poder aumentar la concentración de fármaco en estos lugares, no solamente basta con poder direccionarlos hasta ahí, también es necesario asegurar que su liberación sea única y exclusivamente en las células o los tejidos enfermos. Esto se logra mediante el uso de sistemas estímulo-sensibles, en los cuales se aprovechan los cambios en el microambiente de la zona, que son generados por la enfermedad. Gracias al comportamiento de algunos materiales, que sufren modificaciones tanto estructurales como moleculares ante determinadas condiciones, pueden diseñarse acarreadores que mantengan al fármaco y lo liberen solamente bajo el entorno patológico. Como se ha visto, en la artritis reumatoide existen alteraciones en el pH, temperatura y concentración de oxígeno en la articulación inflamada, que han sido excelentes estímulos para la generación de estos sistemas.

Las formas farmacéuticas convencionales administradas de forma oral o intravenosa no brindan la eficacia que se requiere para el correcto tratamiento del padecimiento. Las altas dosis administradas incrementan la posibilidad de contraer efectos adversos en otras zonas. Paralelamente, no es práctica la administración constante del fármaco puesto que disminuye la adherencia del paciente al tratamiento. Otros tipos de administración como la intraarticular, favorecen la acumulación del principio activo en el tejido articular, sin embargo es muy poco recurrida debido a que se trata de un método invasivo que genera eventos traumáticos y dolor. Por estas razones el uso de sistemas farmacéuticos vectorizados de liberación controlada podría revolucionar el tratamiento de la artritis reumatoide.

Si se combinan las estrategias de vectorización y los sistemas sensibles a estímulos se podrían generar medios que acarreen al principio activo al tejido articular y lo liberen únicamente cuando se requiera. De este modo se pueden disminuir las dosis aplicadas, minimizar los efectos adversos, aumentar la eficacia del tratamiento, pero sobre todo mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Conclusiones

Los fármacos empleados para el tratamiento de la artritis reumatoide son poco específicos, por lo que su administración a través de formas farmacéuticas convencionales ocasiona su alta biodistribución sistémica, generando efectos adversos de manera frecuente y la baja eficacia del mismo. El desarrollo de sistemas vectorizados de liberación modificada, pretende mejorar los tratamientos disponibles.

Los sistemas vectorizados direccionan acarreadores farmacéuticos a los sitios específicos en donde se desarrolla la enfermedad. Las estrategias empleadas en la artritis reumatoide, contemplan el direccionamiento pasivo, mismo que está ligado a procesos angiogénicos y al desarrollo de estructuras como el *pannus*, que favorecen el direccionamiento de los sistemas a las zonas inflamadas, a través del efecto EPR. Además, la sobreexpresión de receptores en células enfermas, permite la vectorización activa de los sistemas, mediante el uso de moléculas afines o anticuerpos. Finalmente, la aplicación externa de campos magnéticos propicia el traslado de acarreadores magnéticos a un lugar determinado. Estas técnicas han sido implementadas en varios estudios, obteniéndose sistemas funcionales que favorecen la acumulación de los principios activos en los tejidos artríticos.

Para asegurar que la liberación del fármaco se da exclusivamente en el sitio específico, las técnicas de vectorización deben ser aplicadas junto con un sistema estímulo-sensible, el cual se elabora con materiales cuyo comportamiento depende del medio en el que se encuentre. La disminución del pH, el incremento de temperatura e hipoxia son condiciones aprovechadas en la artritis reumatoide para el desarrollo de estos sistemas inteligentes.

Los estudios realizados hasta el momento han mostrado la funcionalidad de los sistemas vectorizados de liberación modificada, en cuanto al aumento de eficacia y disminución de la toxicidad en otros órganos, convirtiéndolos en mejores estrategias para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Bibliografía

1. GORONZY, J., WEGAND C. (2000). *Artritis reumatoide: Epidemiología, Patología y Patogenia*. En Klippel JH, Principios de las Enfermedades Reumáticas. 4° Edición. Editorial Intersistemas. México. 2000; 179-186.
2. PRETE, M., *et al.* (2011). *Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update*. Autoimmunity Reviews.11; 123-131.
3. ZUIDEMA, R.M., *et al.* (2015). *What do we know about rheumatoid arthritis patients' support needs for self-management? A scoping review*. International Journal of Nursing Studies. 52; 1617-1624.
4. JEFFERY, R. (2014) *Clinical features of rheumatoid arthritis*. Medicine. 45; 231-236.
5. COMBE. B., LUKAS. C, MOREL. J. (2015). *Artritis reumatoide del adulto: epidemiología, clínica y diagnóstico*. EMC-Aparato Locomotor. 48; 1-17.
6. ROIG, D. (2000). *Clinical articular manifestation in rheumatoid arthritis*. Revista Clínica Española. 1; 39-45.
7. ARNETT, *et al.* (1988). *The American Rheumatism Association Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 31; 315–324.
8. KHURANA, R., BERNEY, S.M. (2005). *Clinical aspects of rheumatoid arthritis*. Pathophysiology. 12; 153-165.
9. RÍOS M. (2002). *Manifestaciones articulares de la artritis reumatoide*. Revista Mexicana de Reumatología.17; 211-219.
10. PRETE, M., *et al.* (2011). *Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update*. Autoimmunity Reviews. 11; 123-131.
11. DÍAZ, C. (2000), *Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis*. Revista Clínica Española. 1; 46-58.
12. QUINTERO, H., *et al.* (2008). *Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis*. Revista Archivo Médico de Camaguey. 1; 225-255.
13. MORCO, S., BOWDEN A. (2015) *Ulnar drift in rheumatoid arthritis: a review of biomechanical etiology*. Journal of Biomechanics. 48; 725-728.
14. GONZALO E., GALINDO M. (2014) *Papel del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) en la fisiopatología de la artritis reumatoide*. Reumatología Clínica. 3; 174-179.

Bibliografía

15. KOCHI, Y., SUZUKI, A., YAMAMOTO, K. (2014) *Genetic basis of rheumatoid arthritis: A current review*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 452; 254-263.
16. BENNETT, S. et al. (2008). *Antigen-specific T cells in rheumatoid arthritis*. Current Rheumatology Reports. 5; 255-263.
17. GARCÍA, R. ORTIZ A. (2005) *Artritis reumatoide (I): Etiopatogenia*. Medicine. 28; 1805-1814.
18. TAYLOR, P. (2014). *Aetiopathology of rheumatoid arthritis*. Medicine. 42; 227-230.
19. SÁNCHEZ-RAMÓN, S., LÓPEZ-LONGO, F., CARREÑO, L. (2011). *Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias*. Reumatología Clínica. 63; S20-S24.
20. CARDIEL, M., et al. (2013). *Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología*. Reumatología Clínica. 14 (4); 227-240.
21. ESTRACH, C. (2005). *The use of corticosteroids in early rheumatoid arthritis*. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 6 (3); 125-129.
22. ZAMPELLI, E., et al. (2015). *Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum*. Journal of Autoimmunity. 65: 1-18.
23. GARCÍA-MAGALLÓN, B., SILVA-FERNÁNDEZ, L., ANDREU-SÁNCHEZ J., (2013). *Update on the use of steroids in rheumatoid arthritis*. Reumatología Clínica. 9 (5); 297-302.
24. FONSECA, J., et al., (2016). *Glucocorticoids and rheumatoid arthritis*. Rheumatic Disease Clinics of North America. 42; 33-46.
25. LÓPEZ, J., VELA, P., (2009). *Glucocorticoids in rheumatoid arthritis*. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología 10 (2); 44-47.
26. BOHÓRQUEZ, C., et al., (2014). *Actualización en el tratamiento de la artritis reumatoide*. Medicine. 11 (69); 4112-4121.
27. CORREIA, C., CUADROS, E., (2007). *Tratamientos de la artritis reumatoide*. Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina. 173; 7-9.
28. STEINER, M., MÚÑOZ-FERNÁNDEZ, S., (2013). *Artritis reumatoide: fármacos modificadores de la enfermedad*. Jano: Medicina y Humanidades. 9 (5); 297-302.
29. HERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ-PRADA, C., (2009). *Uso de fármacos modificadores de la enfermedad en artritis reumatoide*. Revista Terapéutica. 33 (4); 99-109.

Bibliografía

30. VENTURA-RÍOS, L., (2012). *Patient survival and safety with biologic therapy. Results of the Mexican National Registry Biobadamex 1.0.* Reumatología Clínica. 6 (4); 189-194.
31. CHIM, H., *et al.*, (2014). *Update on the surgical treatment for rheumatoid arthritis of the wrist and hand.* Journal of Hand Therapy. 27; 134-142.
32. CLARKE, B., (2008). *Normal Bone Anatomy and Physiology.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 3 (3) S131-S139.
33. LEVANGIE, P., NORKIN, C., (2011). *Joint Structure and Function: A Comprehensive Analysis.* 5° edición. F.A. Davis Company. Capítulo 2, p. 64-76
34. KOLLET, O., DAR, A., LAPIDOT, T., (2007). *The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization.* Annual Review of Immunology. 25; 51-69.
35. HADJIDAKIS, D.J., ANDROULAKIS, I., (2006). *Bone remodeling.* Annals of the New York Academy Sciences. 1092:385-3296.
36. GARCÍA-GERMÁN D., CALME, J., (2011). *Anatomofisiología de las articulaciones.* Segundo Programa de actualización en Cirugía Ortopédica y Traumatología.
36. CHEVALIER, X. (2009). *Fisiopatología de la artrosis.* EMC-Aparato Locomotor. 42 (1); 1-11.
37. RALPHS, J.R., BENJAMIN, M., (1994). *The joint capsule: structure, composition, ageing disease.* Journal of Anatomy. 184 (3); 503-509
38. IZQUIERDO, E., PABLOS, J.L., (2013). *Fibroblastos sinoviales.* Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 14 (4); 121-128.
39. EA, A.K., BAZILLE, C., LIOTÉ, F., (2008). *Histología y fisiología de la membrana sinovial.* EMC-Aparato Locomotor. 41 (4); 1-6.
40. GALLO, F., GINER, V., (2014). *Diagnóstico: Examen del líquido sinovial.* Atención primaria. 46 (1); 29-31.
41. MARTÍNEZ, A., NÚÑEZ C., BABIEDES, J., (2010). *Análisis del líquido sinovial.* Reumatología Clínica. 6 (6); 316-321.

Bibliografía

42. ANDREU, J.L., (2001). *Protocolo de interpretación de los hallazgos en líquido sinovial de una artrocentesis*. *Medicine* 8 (33); 1749-1750.
43. MURPHY, J.M., *et al.* (2002). *Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cell from patients with advanced osteoarthritis*. *Arthritis and Rheumatology*. 46 (3); 704-513.
44. BOTTINI, M., *et al.*, (2015). *Nanodrugs to target articular cartilage: An emerging platform for osteoarthritis therapy*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Article in press.
45. CLAVEL, G., BESSIS, N., BOISSIER, M.C., (2003). *Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine* 70; 321-326.
46. SZEKANECZ, Z., KOCH, A. *Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis*. *Vascular Pharmacology*. 51; 1-7.
47. MARRELLI, A., *et al.*, (2011). *Angiogenesis in rheumatoid arthritis: A disease specific process or a common response to chronic inflammation*. *Autoimmunity Reviews*. 10; 295-598.
48. FOSTER, W., *et al.*, (2009). *Relationships between endothelial, inflammatory and angiogenesis markers in rheumatoid arthritis: Implications for cardiovascular pathophysiology*. *Thrombosis Research*. 123; 659-664.
49. AINOLA, M., (2009). *Pannus invasion into cartilage and bone in rheumatoid arthritis*. Faculty of Medicine of the University of Helsinki. p. 13-28
50. GLYNN, L.E., (1971). *Pathology, pathogenesis, and aetiology of rheumatoid arthritis*. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 31; 412-419.
51. IZQUIERDO, E., (2011). *Los fibroblastos sinoviales en la patogenia de la angiogénesis reumatoide*. Universidad Complutense de Madrid. p 15-20.
52. DAMIANO, J., BARDIN, T., (2004). *Líquido sinovial normal y patológico*. *Enciclopedia Médico-Quirúrgica-E14-036*.p. 1-9.
53. HAMPEL, U., *et al.*, (2013). *Chemokine and cytokine levels un osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid*. *Journal of Immunological Methods*. 396; 134-139.
54. FOUQUE-AUBERT, *et al.*, (2010). *A comparative review of the different techniques to assess hand bone damage in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*. 77; 212-17.

Bibliografía

55. KARMAKAR, S., KAY, J., GRAVALLESE, E., (2010). *Bone damage in rheumatoid arthritis: Mechanistic insights and approaches to prevention*. Rheumatic Disease Clinics of North America. 36; 385-404.
56. GOLDRING, S.R., (2003). *Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis*. Rheumatology. 42; ii11-ii16.
57. DOMÍNGUEZ, P., (2006). *Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia*. Servicio de Salud de Castilla la Mancha.1576-2416.
58. SÁEZ, V., HERNÁEZ, E., LÓPEZ, L., (2003). *Liberación controlada de fármacos: Aplicaciones biomédicas*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 4 (2); 111-122.
59. PATEL, J., *et al.*, (2008). *Novel Drug Delivery Technologies for the treatment of rheumatoid arthritis*. The Internet Journal of Medical Technology. 5 (1), p. 1-9.
60. NASR, M. (2008). *Intra-articular drug delivery: A fast Growing Approach*. Recent Patents on Drug Delivery and Formulation. 2; 231-237.
61. CHIEN, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2° edición. Informa Medical p.2-38.
62. KUSHAL, M., *et al.*, (2013). *Oral controlled release drug delivery system: An overview*. International Research Journal of Pharmacy. 4 (3); 70-76.
63. PUNDIR, S., BADOLA, A., SHARMA, D., (2013). *Sustained release matrix technology and recent advance in matrix drug delivery system: A review*. International Journal of Drug Research and Technology. 3 (1); 12-20.
64. SRIKANTH, P., *et al.*, (2013). *A review on oral controlled drug delivery*. International Journal of Advanced Pharmaceutics. 3 (1); 51-58.
65. BHOWMIK, D. (2012). *Controlled release drug delivery systems*. The Pharma Innovation. 1 (10); 24-32.
66. CULLEN, T., (2001). *Advances in drug delivery systems*. Nanotechnology. 4 (4); 49-502.
67. MANSOUR, H. M., (2010). *Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects*. 11 (9); 3298-3322.

Bibliografía

68. SHRESTHA, H., BALA, R., ARORA, S., (2014). *Lipid-Based Drug Delivery Systems*, Journal of Pharmaceutics. p. 1-10.
69. MD, A., AHMED, M., (2013). *Novel Approaches in lipid bases drug delivery Systems*. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 3 (4); 124-130.
70. MANISH, G., VIMUKTA, S., (2011). *Targeted drug delivery system: A review*. Research Journal of Chemical Sciences. 1 (2); 135-138.
71. RANI, K., PALIWAL, S., (2014). *A review on targeted drug delivery: Its entire focus on advanced therapeutics and Diagnostics*. Scholars Journal of Applied Medical Sciences. 2 (1C); 328-331.
72. MARTÍNEZ-SOLER, G.I., *et al.*, (2010). *Drug delivery strategies base on the enhanced permeation and retention effect*. ARS Pharmaceutica. 51 (3); 113-116.
73. LAMMERS, T., *et al.*, (2010). *Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumor-targeted combination therapy*. Nano today. 5; 197-212.
74. HAN, Y., PARK, K., (2011). *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility*. Journal of Controlled Release. 153; 198-205.
75. PHAM, C., (2011). *Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis*. Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology. 3 (6); 607-619.
76. MAHAMAD, S., (2011). *Nanomedicine and use of nanotechnology in drug delivery systems. A novel approach*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2 (3); 925-929.
77. MARTÍN DEL VALLE, E. M., (2003). *Cyclodextrins and their uses: A review*. Process Biochemistry. Article in press.
78. NASIR, A., HARIKUMAR, S., AMANPREET, K., (2012). *Cyclodextrins: An excipient tool in drug delivery*. International Research Journal of Pharmacy. 3 (4); 44-50.
79. TIWARI, G., TIWARI, R., RAI, A., (2010). *Cyclodextrins in delivery systems: Applications*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2 (2); 72-79.

Bibliografía

80. KUMAR, S., *et al.*, (2013). *Cyclodextrins: The molecular container*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 4 (2); 1694-1720.
81. SINGH, R., *et al.*, (2010). *Characterization of cyclodextrin inclusion complexes: A review*. Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2 (3); 171-183.
82. MADAAN, K., *et al.*, (2014). *Dendrimer in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 6 (3); 139-150.
83. NORIEGA-LUNA, B., *et al.*, (2014). *Applications of dendrimers in drug delivery agents, diagnosis, therapy and detection*. Journal of Nanomaterial. p-1-19.
84. CHENG, Y., *et al.*, (2007). *Dendrimers as drug carriers: Application in different routes of drug administration*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 97 (1); 123-143.
85. INA, M., (2011). *Dendrimer: A novel drug delivery system*. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 1 (2); 70-74.
86. WILCZEWSKA, A., *et al.*, (2012). *Nanoparticles as drug delivery system*. Pharmacological Reports. 64; 1020-1030.
87. MUDSHINGE, S., *et al.*, (2011). *Nanoparticles: Emerging carrier for drug delivery*. Saudi Pharmaceutical Journal. 19 (3); 129-141.
88. JOYE, I., McCLEMENTS, D., (2014). *Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application*. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 19 (5); 417-427.
89. GÓMEZ-CURRET, I., (2012). *Nanoparticle fabrication and characterization for biomedical research application*. Technical Summary. p. 1-5
90. OTSUKA, H., NAGASAKI, Y., KATAOKA, K., (2003). *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews. 55 (3); 403-419.
91. JOKERST, J., *et al.*, (2012). *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy*. Nanomedicine. 6 (4); 715-728.

Bibliografía

92. OLIVEIRA, J., *et al.*, (2014). *Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drug: strategies to enhance encapsulation and delivery*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 123; 345-363.
93. GOYAL, P., *et al.*, (2005). *Liposomal drug delivery systems: Clinical application*. Acta Pharmaceutica. 55; 1-25.
94. SHARMA, A., SHARMA, U., (1997). *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*. International Journal of Pharmaceutics. 154; 123-140.
95. TORRES, D., SEIJO, B., (2011). Nanosistemas lipídicos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. P. 133-140.
95. SAMAD, A., SULTANAM Y., AQIL, M., (2007), *Liposomal drug delivery systems: an update review*. 4; 297-305.
96. KALEPU, S., *et al.*, (2013). *Liposomal drug delivery system: A comprehensive review*. International Journal of Drug Development and Research. 5 (4); 62-75.
97. ALLEN, T., CULLIS, P., (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical application. Advanced Drug Delivery Reviews. 65; 36-48.
98. BERGUEIRO, J., *et al.*, (2015). *Aplicaciones biomédicas de nanogeles dendríticos termosensibles*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 16 (3); 164-271.
99. ESCALONA, O, QUINTANAR, D., (2014) Polymeric nanogels: a new alternative for drug delivery. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 45 (3); 17-38.
100. SULTANA, F., *et al.*, (2013). *An overview of nanogel drug delivery system*. Journal of applied Pharmaceutical Science. 3 (8); S95-S105.
101. AKIYOSHI, K., (2007). Nanogel-based materials for drug delivery systems. European Cells and Materials. 14 (3); 36-40.
102. CHACKO, R., *et al.*, (2012). *Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform*. Advanced Drug Delivery Reviews. 64 (9); 936-851.

Bibliografía

103. KWON, J., *et al.*, (2008). *The development of microgels-nanogels for drug delivery applications*. Progress in Polymer Science. 33 (4); 449-477.
104. PATHAK, Y., SIMON, B., (2012). *Antibody-mediated drug delivery systems: Concepts, Technology, and Applications*. 1° edición. A John Wiley and Sons Inc. Publication. P. 1-10.
105. MACHADO, N., TÉLLEZ, G., CASTAÑO, J. (2006). *Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas*. Asociación Colombiana de Infectología. 10 (3); 186-197.
106. HERNÁNDEZ, E., GÓNZELEZ, C., (2011). *Conjugados anticuerpo-fármaco: El estado de arte*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 42 (3); 7-15.
107. BAIRAGI, U., MITTAL, P., MISHRA, B., (2015). *Albumin: A versatile drug carrier*. Austin Therapeutics. 2 (2); 1021-1027.
108. REN, K., *et al.*, (2013). *Albumin as a delivery carrier for rheumatoid arthritis*. Nanomedicine and Nanotechnology. 4 (4); 175- 178
109. CRIELAARD, B. J., *et al.*, (2011). *Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one*. Journal of Controlled Release. 161; 225-234.
110. SEMERANO, L., *et al.*, (2011). *Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis*. Joint Bone Spine. 78; 118-123.
111. MASOOD, F., (2016). *Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy*. Materials Science and Engineering C. 60; 569-578
112. FANG, J., NAKAMURA, H., MAEDA, H. (2011). *The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Advanced Drug Delivery. 63 (3); 136–151.
113. MAEDA, H., *et al.*, (2000). *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review*. Journal Control Release. 65 (1–2) 271–284.
114. KOCH, A. E. (2003) Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 62 (2); ii60–ii67.

Bibliografía

115. VAN DEN HOVEN, J.M., *et al.*, (2011). *Optimizing the therapeutic index of liposomal glucocorticoids in experimental arthritis*. International Journal of Pharmaceutics. 16 (2); 471–477.
116. ANDERSON, R., *et al.*, (2010). *Liposomal encapsulation enhances and prolongs the anti-inflammatory effects of water-soluble dexamethasone phosphate in experimental adjuvant arthritis*. Arthritis Research and Therapy. 12 (4); R147.
117. SRINATH, P., VYAS, P., DIWAM, P.V., (2000). *Preparation and pharmacodynamics evaluation of liposomes of indomethacin*. Drug Development Industry Pharmacy. 26 (3); 313–321.
118. WILLIAMS, R., *et al.*, (2000). *The suppression of rat collagen-induced arthritis and inhibition of macrophage derived mediator release by liposomal methotrexate formulations*. Inflammation Research. 49 (4); 155–161.
119. QUAN, L., *et al.*, (2016). *The Evaluation of the Therapeutic Efficacy and Side Effects of a Macromolecular Dexamethasone Prodrug in the Collagen-Induced Arthritis Mouse Model*. Pharmaceutical Research. 33(1); 186-193.
120. HIGAKI, M., *et al.*, (2005). *Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate*. Annals of the Rheumatic Diseases. 64 (8); 1132–1136.
121. LISO, P.A., *et al.*, (1996). *Polymeric drugs derived from Ibuprofen with improved anti-inflammatory profile*. Journal of Biomedical Materials Research. 32 (4); 553–560.
122. THAKKAR, H., *et al.*, (2004). *Albumin microspheres as carriers for the antiarthritic drug celecoxib*. AAPS Pharm SciTech. 6 (1); E65–E73.
123. WUNDER, U., *et al.*, (2003). *Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis*. The Journal of Immunology. 170 (9); 4793–4801.
124. FIEHN, C., *et al.*, (2004). *Albumin-coupled methotrexate (MTX-HSA) is a new anti-arthritic drug which acts synergistically to MTX*. Rheumatology. 43 (9); 1097–1105.
125. CHAUHAN, A.S., *et al.*, (2004). *Solubility enhancement of indomethacin with poly (amid amine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats*. Journal of Drug Targeting. 12 (9); 575–583
126. PRABHU, P., *et al.*, (2012). *Investigation of nano lipid vesicles of methotrexate for anti-rheumatoid activity*. International Journal of Nanomedicine. 7; 177-186.
127. ISHIHARA, T., *et al.*, (2009). *Treatment of experimental arthritis with stealth-type polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 329 (2) (2009) 412–417.

Bibliografía

128. DANHIER, F., FERON, O., PREAT, V., (2010). *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. Journal of Controlled Release. 148: 135–46.
129. SHAJI, J., LAL, M., (2013). *Nanocarriers for targeting in inflammation*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 6 (3); 3-12.
130. SANTOS, G., *et al.*, (2013). *Physical and chemical stimuli-responsive drug delivery systems: targeted delivery and main routes of administration*. Current Pharmaceutical Design. 19 (41); 7169-7184.
131. XIA, W., *et al.*, (2009). *A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages*. Blood. 113 (2); 438-46.
132. HILGENBRINK, A., LOW, P., (2005). *Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 94 (10); 2135-2146.
133. LU, Y., LEAMON, C., (2011). *Targeting activated macrophages via a functional folate receptor for potential treatment of autoimmune/inflammatory disorders*. Targeted Drug Strategies for Cancer and Inflammation. P. 195-216.
134. PAULO, C., *et al.*, (2003). *Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis*. Advanced Drug Delivery Reviews. 56; 1205-1217.
135. NOGUEIRA, E., *et al.*, (2015). *Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. Article in press; 15.
136. NAOR, D., NEDVETXKI, S., (2003). *CD44 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Research and Therapy. 5 (3); 105-115.
137. ARABI, L., *et al.*, (2015). *Targeting CD44 expressing cancer cells with anti-CD44 monoclonal antibody improves cellular uptake and antitumor efficacy of liposomal doxorubicin*. Journal of Controlled Release. 220; 275-286.
138. ZHONG, Y., *et al.*, (2015). *Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44+ human breast tumor xenografts*. Journal of Controlled Release. 205; 144-154.
139. HEO, R., *et al.*, (2014). *Hyaluronan nanoparticles bearing Y-secretase inhibitor: In vivo therapeutic effects on rheumatoid arthritis*. Journal of Controlled Release. 192; 295-300.

Bibliografía

140. WILDER, R. L., (2002). *Integrin alpha V beta 3 as a targeted for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases*. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 61; ii96-ii99.
141. MILLER, W., *et al.*, (2000). Identification and in vivo efficacy of small-molecule antagonist of integrin $\alpha_v\beta_3$ (*the vitronectin receptor*). *Therapeutic focus*. 5; 397-408.
142. SZABO, A., *et al.*, (2012). *Development and validation of competition binding assays for affinity to the extracellular matrix receptors, $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin*. *Analytical Biochemistry*. 423; 70-77.
143. VANNIASINGHE, A.S., *et al.*, (2014). *Targeting fibroblast-like synovial cells at sites of inflammation with peptide targeted liposomes results in inhibition of experimental arthritis*. *Clinical Immunology*. 151; 43-54.
144. DOLEZALOVA, P., *et al.*, (2002). *Soluble adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin in juvenile arthritis: Clinical and laboratory correlations*. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 20; 249-254.
145. EVERTS, M., *et al.*, (2002). *Selective intracellular delivery of dexamethasone into activated endothelial cells using an E-selectin-directed immunoconjugate*. *The Journal of Immunology*. 168; 883–889.
146. BEVILACQUA, M.P., *et al.*, (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 243; 1160–1165.
147. HIRAI, M., *et al.*, (2010). *Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells*. *International Journal of Pharmaceutics*. 391; 274–283.
148. JUBELI, E., *et al.*, (2012). *Preparation of E-selectin-targeting nanoparticles and preliminary in vitro evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*. 426; 291-301.
149. GHAFARIAN, R., BHOWMIICK, T., MURO, S., (2012). *Transport of nanocarriers across gastrointestinal epithelial cells by a new transcellular route induced by targeting ICAM-1*. *Journal of Controlled Release*. 163; 25-33
150. DAVIES, M. E., SHARMA, H., PIGOTT, R., (1992). *ICAM-1 expression on chondrocytes in rheumatoid arthritis: Induction by synovial cytokines*. *Mediators of Inflammation*. 1; 71-74.
151. CHITTASUPHO, C., *et al.*, (2009). *ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37; 141-150

Bibliografía

152. TIETZE, R., *et al.*, (2015). *Magnetic nanoparticle-bases drug delivery for cancer therapy*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 468; 463-470.
153. GAJJAR, S. *et al.*, (2011). *A review on targeted drug delivery: Magnetic drug delivery System*. Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific research. 1 (2); 125-133.
154. VEISEH, O., GUNN, J., ZHANG, M., (2010). *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging*. Advanced Drug Delivery Reviews. 62; 284-304.
155. CHAKKARAPANI, P., *et al.*, (2015). *Encapsulation of methotrexate loaded magnetic microcapsules for magnetic drug targeting and controlled drug release*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 380; 285-294.
156. FARR, M., *et al.*, (1985). *Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in rheumatoid arthritis*. Clinical and Experimental Rheumatology. 3; 99-104.
157. COLLINS, A.J., COSH, J.A., (1970). *Temperature and biochemical studies of joint inflammation: A preliminary investigation*. Annals of the Rheumatic Diseases. 29 (4); 386-392.
158. NG, C.T., *et al.*, (2010). *Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo*. Annals of the Rheumatic Diseases. 69 (7); 1389-1395.
159. NAUGHTON, D.P, (2001). *Drug targeting to hypoxic tissue using self-inactivating bioreductive delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews. 53; 229-233.
160. KIZAKA-KONDOH, S., KONSE-NAGASAWA, H., (2009). *Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia*. Japanese Cancer Association. 100 (8); 1366-1373.
161. THAMBI, T., *et al.*, (2014). *Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery*. Biomaterials. 35; 1735-1743.
162. THAMBI, T., *et al.*, (2016). *Poly (ethylene glycol)-b-poly (lysine) copolymer bearing nitroaromatics for hypoxia-sensitive drug delivery*. Acta Biomaterialia. 29; 261-270.
163. KANAMALA, M., *et al.*, (2016). *Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumor targeted drug delivery: A review*. Biomaterials. 85; 152-167.
164. KRISHNA, K.L., *et al.*, (2011). *pH sensitive drug delivery systems: A review*. American Journal of Drug Discovery and Development. 1 (1); 24-48.
165. LIU, J., *et al.*, (2014). *pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy*. Biotechnology Advances. 32; 693-710.
166. LIN, L., *et al.*, (2015). *Construction of pH-sensitive lysozyme/pectin nanogel for tumor methotrexate delivery*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 126; 459-466.

Bibliografía

167. SHAO, P., *et al.*, (2011). *The application of thermosensitive nanocarriers in controlled drug delivery*. Journal of Nanomaterials. P. 1-12.
168. ALMEIDA, H., AMARAL, M., LOBAO, P., (2012). *Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2 (6); 1-10.
169. ALEXANDER, A., *et al.*, (2013). *Poly (ethylene glycol)-poly (lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications*. Journal of Controlled Release. 172; 715-729.
170. ZHENG, L., *et al.*, (2015). *Preparation and in vitro, in vivo characterization of thermosensitive transdermal hydrogel for arthritis*. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. 5 (10); 818-821.