

Sistemas nanoparticulados de administración intraarticular para vectorización de macrófagos sinoviales.

Autora: Rebeca Martínez Borrajo.

Directoras: Mariana Landín Pérez y Patricia Díaz Rodríguez.

Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Grupo I+D Farma.

Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela, 15705, Santiago de Compostela.

Resumen

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular de alta prevalencia mundial que cursa con dolor e incapacidad funcional caracterizándose por la inflamación del sinovio consecuencia de la destrucción progresiva del cartílago. Los macrófagos son actores fundamentales en el inicio y el desarrollo de esta patología, implicados en el proceso inflamatorio. Ante una lesión en el cartílago, los macrófagos liberan grandes cantidades de mediadores proinflamatorios contribuyendo así a un incremento en su degradación. La terapia actual de la OA incluye la administración intraarticular de corticoesteroides y ácido hialurónico, mejorando la sintomatología de la patología, pero sin observarse mejoría en la regeneración del cartílago debido, parcialmente, al rápido aclaramiento de la cavidad articular. Por todo ello, el objetivo de este trabajo es la vectorización de macrófagos sinoviales implicados en la OA mediante la administración intraarticular de sistemas nanoparticulados. Con este fin, se desarrollaron y caracterizaron transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs) cargados con un fármaco antiinflamatorio utilizando modelos de redes neuronales (ANN) y evaluando la respuesta celular a los mismos en macrófagos y condrocitos humanos procedentes de pacientes con OA. Los resultados mostraron que los sistemas desarrollados presentan unas adecuadas características en cuanto a tamaño y potencial Zeta y mostraron capacidad para cargar el fármaco antiinflamatorio β -Lapachona. El empleo de redes neuronales ha permitido seleccionar la composición de la formulación que cumple las características deseadas para administración intraarticular. La formulación optimizada mostró unas características similares a lo predicho por las redes neuronales y es estable al menos durante dos semanas. Además, la funcionalización de las NLCs optimizadas con manosa incrementa su internalización por los macrófagos.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is highly prevalent disease worldwide, curses with pain and functional disability characterized by synovium inflammation as a result of the progressive cartilage destruction. Macrophages seem to have a pivotal role at the onset and development of this disease involved in the inflammatory process. When a cartilage lesion occurs, macrophages release pro-inflammatory mediators leading to cartilage destruction. Current OA therapy includes intraarticular corticosteroids and hyaluronic acid administration aiming at improving the pathology symptomatology, but without improvement in the cartilage regeneration due to, partially, the rapid clearance on the joint cavity. The aim of this work is to target synovial macrophages involved in OA through the intraarticular administration of nanoparticulated systems. To this end, nanostructured lipid carriers (NLCs) loaded with an anti-inflammatory drug were developed using artificial neural networks (ANN), the cellular response of those systems was analyzed in human macrophages and chondrocytes from patients with OA. The experimental results showed the developed systems had adequate characteristics of size and zeta potential with capacity to load the anti-inflammatory drug β -Lapachone. The use of neural networks has allowed to choose the formulation composition able to fulfill the desired characteristics for intra-articular administration. The optimized formulation showed similar characteristics to neural networks prediction and is stable for at least two weeks. In addition, functionalization of optimized NLCs with mannose increases macrophages internalization.

Palabras clave

Osteoartritis; Macrófagos; β -Lapachona; Intraarticular; Transportadores lipídicos nanoestructurados.

Keywords

Osteoarthritis; Macrophages; β -Lapachone; Intraarticular; Nanostructured lipid carriers.

1. Introducción

La osteoartritis (OA) es una enfermedad de alta prevalencia mundial que afecta a 250 millones de personas mayores de 50 años y que cursa con dolor, rigidez articular e incapacidad funcional a consecuencia de la destrucción progresiva del cartílago y hueso, así como por la inflamación sinovial de las articulaciones afectas [1]. Las causas por las que se inicia la OA todavía están por dilucidar, pero se sabe que hay factores de riesgo reconocidos como el sexo siendo más frecuente en mujeres que en hombres, la obesidad, el envejecimiento o el trauma articular [1,2]. El tratamiento actual es sintomático y busca la ralentización en la progresión de la enfermedad, pero en estados avanzados es necesario el reemplazo articular [3].

La OA se caracteriza por un error en el proceso de regeneración del cartílago dañado por cambios mecánicos y químicos en la articulación [4]. Los condrocitos son las principales células responsables del mantenimiento de su matriz extracelular y cuando se produce una lesión, son los encargados de reparar ese daño. Sin embargo, en la OA se produce un desequilibrio entre la degradación y la regeneración del cartílago y los condrocitos y los macrófagos sinoviales se activan en respuesta al daño articular, produciendo proteínas de respuesta inflamatoria y enzimas que degradan la matriz extracelular entre las que se incluyen citoquinas como la interleuquina-1 β , interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Ello a su vez provoca la muerte de condrocitos y células del sistema inmune estableciendo una inflamación sinovial crónica y el desarrollo de su sintomatología característica [3].

La cavidad sinovial se divide en dos capas, la capa externa o subíntima y la capa interna o íntima que está constituida por macrófagos y sinoviocitos encargados de mantener la homeostasia de la articulación. Los macrófagos sinoviales desempeñan una función importante en el desarrollo y progresión de la OA. Tal y como demostraron Wood et al., un mayor número de macrófagos en la cavidad sinovial está relacionado con una mayor inflamación debido a la liberación de mediadores proinflamatorios que contribuyen en el desequilibrio entre la degradación y la regeneración del cartílago [4,5]. Ante una lesión o inflamación, los macrófagos se activan dividiéndose en dos fenotipos mayoritarios: proinflamatorios (M1) y antiinflamatorios (M2). Los macrófagos con

fenotipo tipo M1 segregan grandes cantidades de mediadores proinflamatorios como citoquinas y quimiocinas especialmente en las etapas iniciales del desarrollo de la OA. Por otro lado, los macrófagos tipo M2 producen una serie de factores antiinflamatorios que promueven la regeneración del tejido dañado y la secreción de: factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento TGF- β y arginina que contribuyen en la regeneración tisular. Además, se sabe que los macrófagos sinoviales activados a M1 contribuyen en la destrucción del cartílago articular debido a la liberación de mediadores proinflamatorios y por eso se podría emplear la transformación de macrófagos M1 a macrófagos M2 como posible tratamiento de la enfermedad [2].

Actualmente, se prescriben inyecciones de corticoesteroides o ácido hialurónico para el tratamiento de la OA de rodilla con el fin de disminuir la inflamación y reducir la sintomatología, pero, la mejoría clínica de los pacientes suele ser mínima debido al rápido aclaramiento de los fármacos de la cavidad articular. Existe en la zona un sistema linfático altamente eficiente. El líquido de la cavidad articular se reemplaza por completo varias veces al día. La administración de formulaciones que permitan retener en el lugar de acción fármacos antiinflamatorios y cederlos durante un tiempo prolongado pueden resultar una estrategia prometedora para esta patología [10].

La β -Lapachona es un fármaco muy poco soluble que presenta propiedades antiinflamatorias y antineoplásicas [8,9]. Su inclusión en transportadores de tamaño lo suficientemente pequeño para ser fagocitados por los macrófagos presentes en la cavidad articular puede ser una estrategia prometedora para el tratamiento de la OA [6,7,10]. Debido a la naturaleza localizada de la OA se propone la administración intraarticular ya que ofrece muchas ventajas permitiendo la administración dirigida y localizada de los fármacos a los tejidos afectados reduciendo así la exposición sistémica y los posibles efectos secundarios. Al administrar el fármaco mediante una inyección intraarticular se consiguen altas concentraciones del fármaco de forma localizada y se favorece que los macrófagos sinoviales presentes en la membrana sinovial fagociten el sistema administrado. Además, si formulamos un sistema de cesión de fármaco controlado, el tiempo de permanencia del fármaco en la cavidad articular será mayor y se conseguirá mejorar los efectos anti-atrósicos locales. Para solucionar algunos de

los problemas de los fármacos como pueden ser la baja absorción, baja solubilidad o el rápido metabolismo se pensó en su administración en nanotransportadores lipídicos [10-12].

Utilizando nanotransportadores lipídicos se puede mejorar la estabilidad del fármaco, conseguir su cesión prolongada, reducir su dosis, o incrementar su biocompatibilidad [13]. Los nanotransportadores lipídicos sólidos (SLN) surgieron a finales de los años 1990 y son la primera generación de nanotransportadores lipídicos, pero tienen la desventaja de que, debido a la presencia de una matriz lipídica perfectamente ordenada, presentan una baja carga del fármaco y, además, este es expulsado fácilmente [13]. La nueva generación de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son una buena alternativa frente a los SLN. Están formados principalmente por lípidos sólidos, lípidos líquidos, surfactantes y agua. Una parte del lípido sólido se reemplaza por un aceite permitiendo generar una matriz lipídica desordenada donde fármacos lipofílicos como la β -Lapachona podrán permanecer por más tiempo en su interior, mejorando así la capacidad de carga en el interior de estas estructuras y reduciendo la expulsión del fármaco a la circulación sistémica [13,14].

El diseño de formulaciones farmacéuticas es complejo ya que conlleva el uso de muchas variables que afectan al proceso. En la actualidad se utilizan técnicas computacionales que permiten procesar resultados, hacer predicciones e incluso, optimizar el proceso a partir de un conjunto de datos experimentales [15,16]. Las redes neuronales (ANN, por sus siglas en inglés), son una tecnología de inteligencia artificial (IA) que imita el funcionamiento del cerebro humano. Puede ser combinada con otras herramientas de IA como la lógica difusa (NLF, por sus siglas en inglés) o los algoritmos genéticos, para generar herramientas híbridas capaces de modelizar los procesos de fabricación permitiendo predecir y/u optimizar los resultados sin necesidad de que el investigador tenga profundos conocimientos matemáticos [17]. Estas técnicas computacionales pueden ser una buena herramienta en el proceso de optimización de las NLC estableciendo su composición, tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y capacidad de carga como variables en el diseño [18].

El objetivo de este TFM es el desarrollo de una formulación optimizada de NLCs cargadas con β -Lapachona, capaz de ser internalizada por condrocitos y macrófagos humanos que resulte de potencial utilidad en el tratamiento de la OA mediante su inyección intraarticular. Se seleccionaron NLCs para conseguir fagocitosis por parte de los macrófagos promoviendo así su internalización y disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias pudiendo obtener un efecto antiinflamatorio en el lugar deseado [10-12]. Además, se evaluará el efecto de la funcionalización de las NLCs con manosa para incrementar la internalización de las nanopartículas ya que los macrófagos presentan una gran cantidad de receptores de manosa en su superficie que permiten la captación e internalización de compuestos por fagocitosis [19-20].

2. Material y métodos

Se utilizaron como lípidos sólidos (LS) Precirol® ATO (Glyceryl Palmitostearate), Compritol® 888 ATO (Glyceryl Behenate) y Glyceryl Tristearate de Gattefossé (Francia). Como lípidos líquidos (LL), Miglyol, Transcutol CG, Labarazol ALF, Labrasol Val, Labrasol Lipophile WL, Transcutol HP de Gattefossé (Francia) y Ácido Oleico de Merck (Portugal). Como surfactantes, el polisorbato 80 (Tween® 80) de Sigma Aldrich (Germany) y Epikuron® 145 V (fosfatidilo destilado de lecitina enriquecida con colina) que fueron regalo de Gattefossé (Francia). Agua milliQ (MilliQ plus, Millipore Iberica, España).

La estearilamina y la D-(+)-Manosa para la funcionalización de las formulaciones se compraron en Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Como fármaco se utilizó la β -Lapachona donado por el Laboratorio Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LAFEPE (Recife, Brazil).

2.1. Estudios de solubilidad de la β -Lapachona en los lípidos líquidos

Para evaluar la solubilidad de la β -Lapachona en los diferentes lípidos líquidos, se mezclaron 200 mg de fármaco con 1 mL de cada uno de los aceites. La mezcla se dejó en agitación durante 48 horas. La cantidad de fármaco solubilizado se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Visible en un espectrofotómetro UV-VIS 8453 de Agilent Technologies (España) a 257 nm empleando una recta de calibrado previamente validada.

2.2. Estudios de solubilidad de la β -Lapachona en los lípidos sólidos

Para medir la solubilidad de la β -Lapachona en los diferentes lípidos sólidos, se calentaron 200 mg de cada lípido sólido en un baño de agua a 80°C (5°C por encima de su temperatura de fusión) y una vez fundido el lípido sólido, se añadieron 5 mg de fármaco hasta que apareció un precipitado correspondiente al fármaco no solubilizado [21].

2.3. Estudios de miscibilidad de lípidos líquidos y lípidos sólidos

Se mezclaron los diferentes lípidos líquidos y lípidos sólidos en diferentes proporciones (50:50, 25:75, 72:25). Las mezclas se calentaron en un baño de agua a 80°C en continua agitación durante 5 minutos y se observó la aparición de separación de fases.

2.4. Diseño experimental

Se hizo un estudio preliminar de formulación con los lípidos seleccionados en NLCs blancas en proporción 50:50 (LS:LL) con un 2% de Tween respecto a la fase acuosa, un 1% de lecitina respecto a la fase lipídica y sin fármaco, siguiendo el procedimiento descrito por Rouco et al. [18]. En base a los resultados experimentales y mediante el software Dataform® v3.1 (Intelligensys LTD, Reino Unido), se estableció un diseño experimental balanceado para tres variables: la proporción lípido líquido:líquido sólido, porcentaje de Tween® 80 referido a la fase acuosa y el porcentaje de lecitina referido a la fase lipídica total. Las condiciones del diseño experimental se presentan en la Tabla 1.

NLC	(LL:LS)	% Tween® 80	% Lecitina
1	30:70	2	2
2	50:50	0,5	1,5
3	10:90	1,25	1
4	30:70	1,25	1,5
5	50:50	2	1
6	10:90	0,5	2
7	50:50	2	2
8	10:90	1,25	1,5
9	30:70	0,5	1

Tabla 1. Diseño experimental de las NLC.

2.5. Preparación de las NLC

Se utilizó un método de homogeneización en caliente de alta cizalla (HSH). En base a la solubilidad de la β -Lapachona en los lípidos se seleccionaron el Compritol® 888 ATO y Transcutol HP como componentes lipídicos. Además, se emplearon como surfactantes el Tween®80 y la lecitina.

Se prepararon 300 mg de fase lipídica constituida por LS y LL siguiendo la composición indicada en la Tabla 1. Se incorporó a esta fase una cantidad de β -Lapachona en función de su solubilidad en el LL y de la proporción del LL en la formulación.

Por otro lado, se preparó la fase acuosa añadiendo lecitina a 10 mL de una disolución de Tween® 80 en agua milliQ en las proporciones indicadas en la Tabla 1.

Ambas fases se calentaron en un baño a 80°C durante 5 minutos. Luego, se añadió la fase acuosa sobre la fase lipídica y se homogeneizó utilizando un Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Alemania) durante 10 min a 14800 rpm manteniendo la temperatura a 80°C. Finalmente, la dispersión de NLC obtenida se enfrió en un baño de agua-hielo durante dos minutos con ligera agitación. Las dispersiones se almacenaron en nevera a 4°C [18].

2.6. Caracterización de NLC

Se determinaron los tamaños de partícula de las dispersiones de NLC, las cargas superficiales y la estabilidad física utilizando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se diluyeron en agua milliQ y se utilizaron cubetas de poliestireno para la determinación del tamaño de partícula y del índice de polidispersión. Las medidas se realizaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y los resultados se expresaron en tamaño promedio (Pico 1 o pico de mayor intensidad) y desviación del pico (SD Pico 1). Se caracterizaron tras 15 minutos y 14 días después de su elaboración.

La carga superficial se determinó a través de la movilidad de las partículas en un campo eléctrico para calcular el potencial Zeta (ZP). Las muestras también fueron diluidas en agua milliQ y las medidas se llevaron a cabo utilizando una cubeta DTS 1070 de Malvern donde se estableció un potencial de ± 150 mV.

2.7. Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco

Las dispersiones de NLC se purificaron por diálisis en membrana de celulosa (MWCO: 3,5 kDa de Spectra/Por®), dejando las membranas en agitación durante 24 horas en agua milliQ. La dispersión dializada se disolvió en acetonitrilo usando una dilución 1:2 y se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 30 minutos con la finalidad de que se rompan las NLCs para que salga el fármaco encapsulado hacia el sobrenadante y que precipite el lípido. La cuantificación de la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 280 nm en un lector de placas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany) y se calculó la eficiencia de encapsulación siguiendo la ecuación 1 y la carga del fármaco siguiendo la ecuación 2. Se siguió el mismo procedimiento con las formulaciones no purificadas.

$$EE (\%) = \left[\frac{\text{Peso de fármaco cargado}}{\text{Peso total de fármaco}} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$DL (\%) = \left[\frac{\text{Peso de fármaco cargado}}{\text{Peso total de lípidos}} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

2.8. Modelización mediante herramientas IA

Se utilizó el software INForm® v5.01 (Intelligensys Ltd, Reino Unido) para modelizar la base de datos generada. Se introdujeron como variables de entrada (inputs) el LL:LS, el % lecitina y el % Tween y como outputs, el tamaño, el índice de polidispersión, el potencial Zeta, la eficiencia de encapsulación y la carga del fármaco de las NLCs tras 14 días de almacenamiento. La modelización se llevó a cabo con los parámetros por defecto del software.

Se seleccionó la composición y las condiciones de operación adecuadas para producir una formulación óptima en función de los requerimientos siguientes: tamaño e índice de polidispersión con los valores más bajos posibles y el potencial Zeta con los valores más negativos a los 14 días. La eficiencia de encapsulación y la carga del fármaco máximas.

Se llevó a cabo experimentalmente la formulación estimada como óptima cargada con β -Lapachona por triplicado (n=3) y no cargada por duplicado (n=2) a modo de validación del modelo.

2.9. Funcionalización de la formulación optimizada de NLC

Las NLC optimizadas se funcionalizaron con manosa. Para ello, en la fase lipídica se añadió un 2% p/p de estearilamina respecto a la fase lipídica total y se llevó a cabo la formulación como se describe en el punto 2.5. A continuación, se incubó la formulación con una disolución de D-(+)-manosa 50 mM preparada en un tampón de acetato a pH 4 y en una dilución 1:2 respecto al volumen total de la formulación que se dejó en agitación vigorosa durante 48 horas tal y como describen Vieira et al. A continuación, la formulación se dializó en una membrana de celulosa (MWCO: 3,5 kDa) con agitación y en agua milliQ durante 30 minutos para eliminar posibles impurezas [22-23].

2.10. Extracción y digestión de cartílago

Con un bisturí se extrajo el cartílago de la muestra de cartílago obtenido de pacientes con OA que se sometieron a cirugía de reemplazo total de rodilla (donación del servicio de traumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela tras la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Santiago). Las muestras de cartílago extraídas se lavaron 2 veces con 20 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). Se pasaron a una placa de cultivo con medio (DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) + 2% FBS + 1% penicilina/estreptomomicina), todos ellos de Gibco, (USA) y se dejaron en la incubadora a 37°C, 5% CO₂ y en atmósfera húmeda durante 12 horas. A continuación, se retiró el medio, se añadió 1 mg/mL de pronasa (Roche Molecular Biochemicals) y la muestra se colocó en un baño con agitación a 37°C durante 30 minutos. Después se retiró la pronasa, se hizo un lavado con DPBS y se añadió 1mg/mL de colagenasa P (Roche Molecular Biochemicals). La muestra se colocó en un baño con agitación a 37°C durante 8 horas. La suspensión celular resultante se filtró con un filtro de nailon de 40 μ m. El filtrado celular se centrifugó dos veces a 1200 rpm durante 4 minutos haciendo lavados con DPBS entre centrifugaciones. El pellet resultante de condrocitos se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en placas de 6 pocillos siguiendo el procedimiento descrito por Scotece et al. [24].

2.11. Cultivo y diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos

Para la diferenciación de los monocitos THP-1, monocitos humanos derivados de una leucemia linfocítica aguda y adquiridos en ATCC, que se encuentran en suspensión en un medio RPMI1640 + 10 %FBS + 1% penicilina/estreptomicina y de los que se utilizó una concentración de 2×10^5 células/mL, se le añadió una concentración 200 nM de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) y se dejaron durante 48 horas en la incubadora para que se diferenciase a macrófagos, induciendo así su adherencia antes de proceder al siguiente ensayo tal y como indican Gaspar et al. [19, 25].

2.12. Ensayo de viabilidad celular en macrófagos humanos

Se sembraron macrófagos (2×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos haciendo 6 replicados por concentración, a las 24 horas se le incorporaron las NLC optimizadas en diferentes concentraciones. Como control, se utilizaron 6 pocillos que contenían células sin NLC a las que se le añadió una cantidad equivalente de agua milliQ y se dejaron en el incubador 24 horas. Transcurrido ese tiempo se midió la viabilidad celular mediante un método espectrofotométrico a 450 nm y utilizando el kit "Cell Proliferation Reagent WST-1" de la Roche, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para este ensayo se utilizó un medio de cultivo sin rojo fenol de Gibco y el reactivo WST-1 se aplicó en oscuridad, añadiendo el reactivo en 6 pocillos sin células para utilizarlos como blanco de absorbancia. Se incubó la placa con el reactivo 1 hora a 37°C y después, antes de hacer las medidas, la placa se agitó durante 1 minuto en el lector de placas (Bio-Rad 680, Barcelona, Spain). La viabilidad celular se calculó utilizando la ecuación 3.

$$\text{Viabilidad muestra (\%)} = \left[\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

2.13. Ensayo de internalización celular en macrófagos humanos y condrocitos

Se sembraron los macrófagos y los condrocitos procedentes de la extracción de cartílago (2×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos haciendo 6 replicados por concentración y a las 24 horas se le incorporaron las NLC optimizadas marcadas con cumarina 6 (40 μ L de cumarina 6 por formulación) con el fin de cuantificar la internalización con un método fluorimétrico. Se hizo una medida inicial de la fluorescencia en el lector de placas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany) y se dejó la placa en la incubadora durante dos horas. Después se hicieron 3 lavados con una disolución 20 mM de glicina de Fluka BioChemika y DPBS a pH 7,4. Tras los lavados se añadieron 100 μ L por pocillo de triton x-100 al 1% de Merck (Portugal) para provocar la lisis celular y que la formulación que contiene cumarina 6 internalizada se libere y se pueda cuantificar siguiendo el método descrito por Gaspar et al. [25]. Se hizo la medida de fluorescencia post-lisis en el lector de placas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Para determinar el porcentaje de internalización se empleó la ecuación 4.

$$\text{Internaliz. (\%)} = \left[\frac{\text{Fluorescencia post-lisis}}{\text{Fluorescencia inicial}} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

2.14. Análisis estadístico

Se hizo el análisis estadístico utilizando el programa SPSS donde las variables obtenidas se compararon utilizando un test ANOVA de una vía. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. También se utilizó el programa GraphPad Prism 8 para la realización de las figuras.

3. Resultados y discusión

3.1. Selección de los componentes de las NLC

La β -Lapachona es un fármaco muy insoluble en agua y cuya solubilidad en lípidos no ha sido previamente establecida [9]. Los resultados de solubilidad de la β -Lapachona en los diferentes lípidos líquidos se presentan en la figura 1. En base a ellos se eligieron como lípidos líquidos, el Transcutol CG (TCG), el Labrasol ALF (LALF), Labrasol Val (LVAL) y el Transcutol HP (THP), por ser aquellos en los que el fármaco presenta mayor solubilidad.

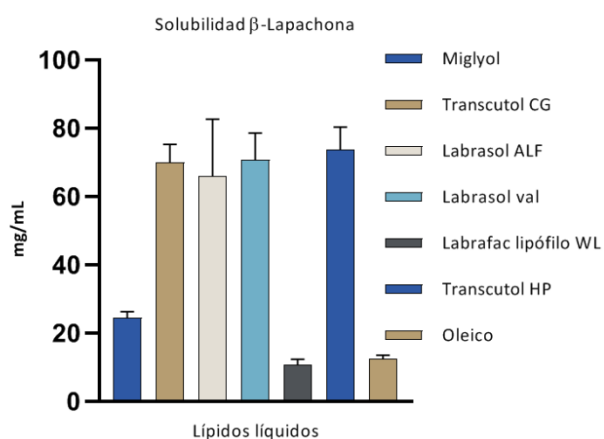


Figura 1. Solubilidad de la β -Lapachona en diferentes lípidos líquidos.

Los resultados de los estudios de solubilidad en los lípidos sólidos pusieron de manifiesto que la β -Lapachona no se solubiliza en el Precirol® ATO.

Además, se descartó el Glyceril Tristearate por su inmiscibilidad con los cuatro lípidos líquidos seleccionados. No se observó separación de fases con Precirol® ATO (PRE) ni con Compritol® 888 ATO (COMP), por lo que se realizó un estudio preliminar de formulación utilizando una proporción 50:50 (LS:LL) un 2% de Tween respecto a la fase acuosa, un 1% de lecitina respecto a la fase lipídica y sin fármaco, metodología desarrollada por Rouco y colaboradores para determinar la combinación lípido líquido:lípido sólido con mejores resultados en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Zeta [18]. Las muestras se analizaron tras el proceso de formulación y tras 14 días almacenadas mostrando los resultados que se describen en la tabla 2.

En base a los estudios de solubilidad de la β -Lapachona y este estudio preliminar de formulación, se seleccionaron el Transcutol HP y el Compritol® 888 ATO como componentes lipídicos ya que con esta combinación se obtienen unas NLCs con los menores valores de tamaño, estables tras 14 días de almacenamiento en nevera, con índices de polidispersión adecuados y valores de potencial Zeta negativos que indican mayor estabilidad de las NLCs.

NLC	Tamaño (nm)	Tamaño 14 días (nm)	Pdl	Pdl 14 días	ZP (mV)	ZP 14 días (mV)
TCG-PRE	263,00	267,50	0,25	0,41	-9,75	-9,39
TCG-COMP	178,40	173,90	0,19	0,20	-10,20	-8,90
LALF-PRE	219,60	467,75	0,36	0,50	-10,50	-14,18
LALF-COMP	230,20	253,45	0,17	0,16	-10,40	-10,30
LVAL-PRE	235,10	513,70	0,31	0,56	-9,83	-8,57
LVAL-COMP	236,60	259,48	0,21	0,24	-14,70	-11,70
THP-PRE	120,60	121,13	0,24	0,20	-11,10	-12,68
THP-COMP	98,75	105,25	0,16	0,21	-7,69	-10,98

Tabla 2. Resultados del estudio preliminar realizado con combinaciones de lípidos empleando la metodología de Rouco et al., [18]

3.2. Caracterización y optimización de NLC

Tras la selección de materiales y la definición del diseño experimental empleando los lípidos anteriormente mencionados, se elaboraron las formulaciones y se caracterizaron (recién elaboradas y tras 14 días de almacenamiento) en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Zeta (ZP). Los resultados se muestran en la tabla 3.

Como puede observarse, no existen cambios importantes en cuanto al tamaño, Pdl y ZP a los 14 días respecto a las formulaciones recién formuladas lo que indica que las formulaciones se mantienen estables tras su almacenamiento. Todas ellas fueron formuladas de acuerdo a las condiciones recogidas en la tabla 1 y como se puede observar, aquellas que llevan menor proporción de lípido líquido (10:90 LL:LS) tienen un tamaño de partícula mayor y un Pdl superior al 0,30 que indica la presencia de agregados de NLCs pudiendo afectar negativamente a su estabilidad.

NLC	Tamaño (nm)		Tamaño 14 días (nm)		ZP (mV)		ZP 14 días (mV)		Pdl		Pdl 14 días	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1	90,27	37,87	88,70	39,77	-12,95	6,19	-12,17	7,71	0,29	0,02	0,24	0,02
2	147,15	76,24	143,25	85,71	-18,80	6,05	-19,23	7,41	0,34	0,03	0,36	0,01
3	157,65	76,97	156,82	71,63	-15,67	5,02	-16,85	5,94	0,28	0,01	0,29	0,02
4	104,88	38,88	102,56	38,42	-18,48	6,68	-15,43	6,05	0,26	0,06	0,26	0,04
5	122,90	52,68	124,15	49,10	-11,47	6,69	-11,10	6,24	0,23	0,01	0,23	0,02
6	329,92	193,37	316,13	195,10	-18,60	6,55	-17,97	4,83	0,32	0,03	0,34	0,06
7	97,55	38,38	98,54	38,35	-14,90	5,19	-9,98	5,07	0,27	0,02	0,26	0,01
8	149,48	67,35	164,52	96,93	-15,93	6,29	-15,77	4,71	0,31	0,02	0,31	0,01
9	261,60	151,65	251,47	163,17	-18,08	5,78	-18,35	5,91	0,38	0,05	0,36	0,02

Tabla 3. Características de las formulaciones obtenidas en las condiciones del diseño experimental descritas en la tabla 1 para las formulaciones frescas y tras 14 días de almacenamiento en nevera.

Los resultados de la eficiencia de encapsulación y de carga del fármaco de las formulaciones frescas se recogen en la tabla 4. Como se puede apreciar, los valores de eficiencia de encapsulación y de carga de fármaco son muy bajos, es decir, apenas hay fármaco en el interior de las NLCs a pesar de que el β -Lapachona parecía solubilizarse en ambos lípidos.

Con el uso de INForm[®] se seleccionó la composición de una formulación que permita obtener los mejores resultados de eficiencia de encapsulación y de carga del fármaco. La composición de la formulación óptima en base a resultados predichos por INForm[®] se recoge en la tabla 5.

NLC	% EE		% DL	
	Media	SD	Media	SD
1	15,02	2,48	0,44	0,17
2	14,08	16,83	0,40	1,34
3	6,08	0,17	0,08	0,03
4	7,46	0,02	0,23	0,07
5	15,28	4,04	0,73	0,79
6	4,37	1,42	0,08	0,01
7	16,85	9,62	0,86	1,44
8	5,65	0,26	0,14	0,10
9	7,39	6,21	0,17	0,41

Tabla 4. Eficiencia de encapsulación y carga del fármaco en las formulaciones frescas.

El modelo de INForm[®] permitió seleccionar la composición de la formulación que cumpliría todas las premisas establecidas, es decir que presentase el tamaño más reducido y homogéneo a los 14 días de almacenamiento, un potencial Zeta que garantice su estabilidad y

que, simultáneamente, presente la mayor eficiencia de encapsulación y carga de fármaco. La formulación seleccionada por el software debe presentar la composición que se indica en la tabla 5.

Composición	%	Propiedad NLC	Predicha
Ratio (LL/LS)	50	Tamaño _{014d}	116,55 nm
Tween	1,12	ZP _{14d}	-18,49 mV
Lecitina	1,17	Pdl _{14d}	0,28
		%EE	15,84 %
		%DL	0,54 %

Tabla 5. Composición de la formulación óptima y resultados predichos por InForm®.

El modelo se validó mediante la producción de NLC en las condiciones señaladas, obteniéndose los resultados de las tablas 6 y 7.

Como se muestra en la tabla 6, el modelo predice bien el tamaño, el Pdl y el potencial Zeta, sin embargo, este modelo no es adecuado para predecir la carga del fármaco ni la eficiencia de encapsulación tal y como se puede observar en los datos recogidos en la tabla 7, además, sus valores aumentan ligeramente tras el almacenamiento lo que puede deberse a la presencia de cristales de fármaco en las dispersiones que pueden interferir en los resultados de estabilidad.

Los valores recogidos en la tabla 7 muestran que hay un problema en la cuantificación de la eficiencia de encapsulación y de la carga del fármaco.

Se obtuvieron unas NLCs de un tamaño inferior a los 100 nm lo que resulta interesante para asegurar su fagocitación por los macrófagos ya que de acuerdo con Edwards SHR, estos son capaces de fagocitar partículas con tamaño inferior a 10 μ m, aconsejando tamaños inferiores para asegurar la correcta fagocitación por parte de los macrófagos de la membrana sinovial [10]. En cuanto al potencial Zeta, como vemos sigue adoptando valores negativos lo que es una indicación de estabilidad viendo que no existen grandes diferencias entre las formulaciones frescas y las que se mantuvieron almacenadas durante 14 días. Finalmente, el valor del índice de polidispersión se mantiene estable con el paso de los días indicándonos que no hubo agregación de las NLCs durante el almacenamiento.

NLC	Tamaño (nm)		Tamaño _{14 días} (nm)		ZP (mV)		ZP _{14 días} (mV)		Pdl		Pdl _{14 días}	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blanca	85,37	33,39	76,02	25,26	-18,12	6,56	-14,83	5,27	0,28	0,02	0,28	0,03
Óptima	89,15	42,85	77,75	28,39	-14,40	7,85	-14,16	6,01	0,25	0,02	0,22	0,03

Tabla 6. Formulaciones optimizadas y blancas, obtenidas en las condiciones que se muestran en la tabla 2 para las muestras frescas y tras 14 días de almacenamiento en nevera.

NLC	% EE		% EE _{14 días}		% DL		% DL _{14 días}	
	Media	SD	Mean	SD	Media	SD	Media	SD
Óptima	4,42	0,70	37,77	7,52	0,01	0,00	0,14	0,02

Tabla 7. Eficiencia de encapsulación y carga del fármaco de la formulación optimizada para las muestras frescas y a los 14 días de almacenamiento.

3.3. Funcionalización de la formulación optimizada de NLC

Los macrófagos presentan unos factores de reconocimiento que incluyen receptores de manosa que se han relacionado con la mediación de la captación e internalización de compuestos en su interior mediante fagocitosis tal y como describen Mytar y colaboradores [20].

La funcionalización con manosa de las NLC tuvo como consecuencia que el potencial Zeta vire a valores positivos tanto en las que no incluyen fármaco ($32,63 \pm 5,93$) como en las cargadas con la β -Lapachona ($24,05 \pm 6,36$), lo que indica que la superficie se ha recubierto adecuadamente de acuerdo con otros autores [22-23].

3.4. Ensayo de viabilidad celular

Los valores obtenidos de viabilidad en macrófagos tras 24 horas de incubación con los sistemas elaborados a diferentes concentraciones se presentan en la Figura 2. Como puede observarse para todas las formulaciones están próximos al 100% lo que indica la citocompatibilidad de las formulaciones. El análisis estadístico de los resultados muestra, además, que no existen diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular de las diferentes formulaciones concluyendo que el uso de este tipo de NLC no influye negativamente en la viabilidad.

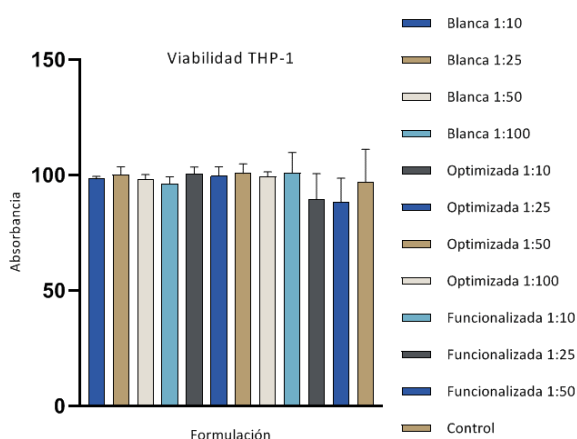


Figura 2. Viabilidad celular de THP-1 a las 24 horas de la administración de diferentes formulaciones y en diferentes concentraciones.

3.8. Ensayo de internalización celular.

Los resultados de internalización en macrófagos obtenidos mediante el método fluorimétrico se muestran en la Figura 3.

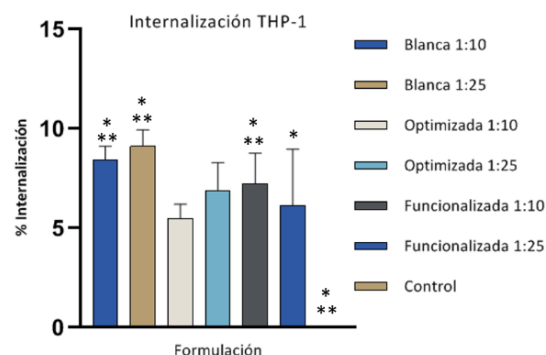


Figura 3. Porcentaje de internalización celular en la línea de macrófagos THP-1 (* $p < 0,05$ respecto a la formulación optimizada 1:10) (** $p < 0,05$ respecto a la formulación optimizada 1:25).

El análisis estadístico muestra la existencia de diferencias significativas entre las formulaciones funcionalizadas con manosa y las no funcionalizadas lo que confirma que los NLC se han recubierto correctamente y son reconocidos e internalizados con mayor intensidad, como era previsible en función de la hipótesis defendida por otros autores [22-23].

En el ensayo de internalización en condrocitos osteoartríticos humanos (OAC) procedentes de pacientes (Figura 4) nuevamente, la funcionalización con manosa favorece la internalización a pesar de que estos no contienen receptores de manosa en su superficie lo que puede ser debido al cambio del valor del potencial Zeta.

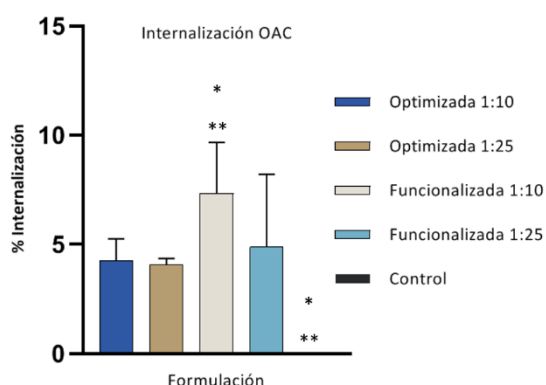


Figura 4. Porcentaje de internalización celular de los condrocitos (OAC) (* $p < 0,05$ respecto a la formulación optimizada 1:10) (** $p < 0,05$ respecto a la formulación optimizada 1:25).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de internalización obtenidos en la línea celular THP-1 y en los condrocitos osteoarthríticos humanos (OACs).

4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que el uso de ANN permite hacer una correcta predicción en cuanto al tamaño, Pdl y ZP de las formulaciones de las NLCs desarrolladas. No resulta lo mismo en cuanto a la eficiencia de encapsulación y carga del fármaco, lo que sugiere un problema en la metodología empleada para la cuantificación de este. Además, la funcionalización de las NLCs mejora la internalización de los sistemas elaborados por parte de macrófagos y condrocitos humanos procedentes de pacientes con OA. La baja dosis de fármaco cargada en las nanopartículas puede limitar el efecto antiinflamatorio que buscamos.

5. Agradecimientos

Agradecer en primer lugar a Patricia y a Mariana por darme la oportunidad de llevar a cabo este TFM con ellas. Me gustaría también agradecer a mis compañeros y compañeras del departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica por estar siempre dispuestos a ayudarme cuando lo necesitaba.

También quiero agradecer a José Ramón Caeiro del servicio de traumatología del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela por proporcionarnos las muestras de cartílago de pacientes con OA y que utilizamos en los experimentos.

Por último, pero no por eso menos importante, agradecerle a mi familia y amigos el apoyo y confianza que han depositado en mí todos estos meses ya que sin ellos esto no sería igual.

6. Bibliografía

[1] Bruyère O, Honvo G, Veronese N, Arden NK, Branco J, Curtis EM, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases

(ESCEO). *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2019 Apr 30,.

[2] Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019 Apr;46:36-44.

[3] Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet* 2015 Jul 25;386(9991):376-387.

[4] Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lefeber, Floris P. J. G. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011 Jun 18;377(9783):2115-2126.

[5] Wood MJ, Leckenby A, Reynolds G, Spiering R, Pratt AG, Rankin KS, et al. Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients. *JCI insight* 2019 Jan 24;4(2).

[6] Barrera Rico P, Blom AB, Lent, P. L. E. M. van, Bloois Lv, Beijen JJ, Rooijen Nv, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2000;43(9):1951-1959.

[7] Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Berg, W. B. van den. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2010;62(3):647-657.

[8] Kim I, Kim H, Ro J, Jo K, Karki S, Khadka P, et al. Preclinical Pharmacokinetic Evaluation of β -Lapachone: Characteristics of Oral Bioavailability and First-Pass Metabolism in Rats. *Biomol Ther (Seoul)* 2015 May;23(3):296-300.

[9] Ma X, Huang X, Huang G, Li L, Wang Y, Luo X, et al. Prodrug strategy to achieve lyophilizable, high drug loading micelle formulations through diester derivatives of β -Lapachone. *Adv Healthc Mater* 2014 Aug;3(8):1210-1216.

[10] Edwards SHR. Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint. *The Veterinary Journal* 2011;190(1):15-21.

[11] Kang ML, Im G. Drug delivery systems for intra-articular treatment of osteoarthritis.

Expert Opinion on Drug Delivery 2014 Feb;11(2):269-282.

[12] Rai MF, Pham CT. Intra-articular drug delivery systems for joint diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 2018 Jun;40:67-73.

[13] Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018 Jul;103:598-613.

[14] Saedi A, Rostamizadeh K, Parsa M, Dalali N, Ahmadi N. Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers as drug delivery system: Influence of liquid lipid types on loading and cytotoxicity. *Chemistry and Physics of Lipids* 2018 Nov;216:65-72.

[15] Landín M, Rowe RC, York P. Advantages of neurofuzzy logic against conventional experimental design and statistical analysis in studying and developing direct compression formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009;38(4):325-331.

[16] Colbourn EA, Roskilly SJ, Rowe RC, York P. Modelling formulations using gene expression programming – A comparative analysis with artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011;44(3):366-374.

[17] Gago J, Landín M, Gallego P. Strengths of artificial neural networks in modeling complex plant processes. *Plant Signaling & Behavior* 2010 Jun 1;5(6):743-745.

[18] Rouco H, Diaz-Rodriguez P, Rama-Molinos S, Remuñán-López C, Landin M. Delimiting the knowledge space and the design space of nanostructured lipid carriers through Artificial Intelligence tools. *Int J Pharmaceutics* 2018 Dec 20;553(1-2):522-530.

[19] Lin L, Huang S, Zhu Z, Han J, Wang Z, Huang W, et al. P2X7 receptor regulates EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK/MAPK signaling in PMA-induced macrophages. *Mol Med Rep* 2018 Sep;18(3):3027-3033.

[20] Mytar B, Woloszyn M, Macura-Biegun A, Hajto B, Ruggiero I, Piekarska B, et al. Involvement of pattern recognition receptors in the induction of cytokines and reactive oxygen intermediates production by human monocytes/macrophages stimulated with tumour cells. *Anticancer Res* 2004 Jul-Aug;24(4):2287-2293.

[21] Das S, Ng WK, Kanaujia P, Kim S, Tan RBH. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011;88(1):483-489.

[22] Vieira AC, Chaves LL, Pinheiro M, Ferreira D, Sarmiento B, Reis S. Design and statistical modeling of mannose-decorated dapson-containing nanoparticles as a strategy of targeting intestinal M-cells. *Int J Nanomedicine* 2016;11:2601-2617.

[23] Vieira AC, Magalhães J, Rocha S, Cardoso MS, Santos SG, Borges M, et al. Targeted macrophages delivery of rifampicin-loaded lipid nanoparticles to improve tuberculosis treatment. *Nanomedicine* 2017 Dec 1;12(24):2721-2736.

[24] Scotece M, Conde J, Abella V, López V, Francisco V, Ruiz C, et al. Oleocanthal Inhibits Catabolic and Inflammatory Mediators in LPS-Activated Human Primary Osteoarthritis (OA) Chondrocytes Through MAPKs/NF-κB Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018 Oct;49(6):2414-2426.

[25] Gaspar DP, Faria V, Gonçalves LMD, Taboada P, Remuñán-López C, Almeida AJ. Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. *Int J Pharmaceutics* 2016 Jan 30;497(1-2):199-209.

[26] Li X, Jia X, Niu H. Nanostructured lipid carriers co-delivering lapachone and doxorubicin for overcoming multidrug resistance in breast cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2018;13:4107-4119.