

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERIA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIECNCIAS E INGENIERÍA



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CARGADAS CON LEFLUNOMIDA
PARA SU EVALUACIÓN IN-VITRO COMO SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN Y
LIBERACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.F.B Noemí Arellano Villaseñor

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Roció Alejandra Chávez Santoscoy

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

ASESOR EXTERNO:

Dra. Carolina Gómez Gaete

TIJUANA, B.C

SEPTIMEBRE 2019

HOJA DE APROBACIÓN

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día”

INDICE GENERAL

	Página
Hoja de aprobación	I
Lista de tablas	V
Lista de figuras	VII
Agradecimientos	IX
Agradecimientos institucionales	XII
Resumen	XIII

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.	Antecedentes	1
2.	Justificación	3
3.	Hipótesis	4
4.	Objetivo General	5
5.	Objetivo Específicos	5
6.	Marco Teórico	6
	6.1 Artritis Reumatoide	6
	6.2 Prevalencia E Incidencia	7
	6.3 Impacto Socioeconómico	9
	6.4 Patogénesis	10
	6.5 Etiología De Artritis Reumatoide	12
	6.6 Diagnóstico De Artritis Reumatoide	15
	6.7 Tratamiento Farmacológico De Artritis Reumatoide	18
	6.8 Nanotecnología	23
	6.8 Nanopartículas en el Tratamiento De Artritis Reumatoide	26

CAPÍTULO II	METODOLOGÍA	
2.1	Materiales Y Métodos	33
2.2	Síntesis de nanopartícula de poli (D,L-láctico-co-glicólico) éster terminal(PLGA)	36
2.4	Caracterización de nanoparticulas de plga	¡Error! Marcador no definido.
2.5	Tamaño de Partícula Y Polidispersidad	40
2.6	Potencial Zeta	40
2.7	Análisis por Infrarrojo (Ftir-Atr)	41
2.8	Microscopía Electrónica de Transmisión (Tem)	42
2.9	Cinética De Liberación Invitro	44
3.0	Evaluación De Citotoxicidad De Nanopartículas De Plga Por Ensayo Mtt	45
CAPÍTULO III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1	Efecto inicial de leflunomida en la carga y eficiencia de encapsulación	50
3.2	Efecto del grupo terminal de plga sobre las características de las nanoparticulas cargadas con leflunomida	53
3.3	Efecto del contenido láctico de plga sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida	54
3.4	Efecto de la viscosidad del plga 75:25 sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida	56
3.7	Análisis por infrarrojo (ftir-atr)	61
3.8	Tamaño de partícula, morfología y potencial zeta	63
3.9	Cinética de liberacion in vitro de nanopartículas cargadas con leflunomida	66
4.0	Evaluación de viabilidad de nanopartículas de plga	67
CAPÍTULO IV	CONCLUSIÓN	72
CAPÍTULO V	REFERENCIA	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Criterios de clasificación para AR del American College of Rheumatology de 1987.	16
Tabla 1.2 Criterios de clasificación para artritis reumatoide de 2010 (ACR/EULAR)	17
Tabla 2.1 Condiciones óptimas para formulación de nanopartículas.	38
Tabla 2.1 Condiciones para curva de calibración.	39
Tabla 3.1 Efecto de la dosis inicial de leflunomida.	50
Tabla 3.2 Efecto del grupo terminal de PLGA sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.	53
Tabla 3.3 Efecto de la fracción láctica de PLGA sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.	54
Tabla 3.4 Efecto de la viscosidad del PLGA 75:25 sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.	56
Tabla 3.5 Tabla de resultados de curva de calibración de leflunomida.	58
Tabla 3.6 Asignación de bandas para componentes de formulación de nanopartículas	63
Tabla 3.7 Distribución de tamaño y potencial zeta	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de sinovitis en la articulación.	6
Figura 1.2 Prevalencia de enfermedades reumáticas en México.	8
Figura 1.3 Representación de patogénesis.	12
Figura 1.4 Etiología de artritis reumatoide.	13
Figura 1.5 Estructura de diclofenaco	19
Figura 1.6 Estructura de ibuprofeno	19
Figura 1.7 Estructura de naproxeno	19
Figura 1.8 Estructura de Prednisona	20
Figura 1.9 Estructura de Cortisona	20
Figura 1.10 Estructura de Dexametasona	20
Figura 1.11 Estructura de etanercept	21
Figura 1.12 Estructura de infliximab	21
Figura 1.13 Estructura de metotrexato	21
Figura 1.14 Estructura de Sulfasalazina	21
Figura 1.15 Síntesis de leflunomida a su metabolito activo	21
Figura 1.16 Tipos de nanopartículas.	22
Figura 1.17 Representación de tratamiento artritis reumatoide con nanopartículas permeabilidad y retención mejorada.	23
Figura 1.18 Estructura de PLGA.	25
Figura 2.1 Técnica de Emulsión evaporación solvente.	36

Figura 2.2 Dispersión dinámica de Luz (DLS)	40
Figura 2.3 Potencial zeta.	41
Figura 2.4 Infrarrojo (FTIR-ATR).	42
Figura 2.5 Microscopia de transmisión de barrido.	43
Figura 2.6 Cinética de liberación	44
Figura 2.7 Evaluación de viabilidad celular.	47
Figura 3.1 Dosis inicial de Leflunomida	52
Figura 3.2 Curva de Calibración de leflunomida	56
Figura 3.3 Suspensión de nanopartículas observadas a 40x, antes de filtración por membrana 1.2 μ M PVDF, donde se muestra presencia de cristales de leflunomida.	59
Figura 3.4 Suspensión de nanopartículas observadas a 40x, después de filtración por membrana 1.2 μ M PVDF, sin presencia de cristales de leflunomida.	60
Figura 3.5 Espectro infrarrojo de los componentes de la formulación. (a) PLGA, (b) Leflunomida, (c) Mezcla física, (d) Nanopartículas Cargadas, (e) Nanopartículas blancas	61
Figura 3.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas. (a) Nanopartículas blancas. (B) Nanopartículas cargadas con leflunomida	65
Figura 3.7 Cinética de liberación dependiente del tiempo para leflunomida encapsulado en nanopartículas y leflunomida como fármaco libre (disolución). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.	67
Figura 3.8 Efecto de la concentración a las 24 horas de las nanopartículas de PLGA cargadas con leflunomida y nanopartículas de PLGA blancas y fármaco libre leflunomida sobre la viabilidad celular. Los datos representan la media y desviación estándar, cada uno por quintuplicado.	69

Figura 3.9 Efecto de la concentración a las 24 horas de las nanopartículas de PLGA cargadas con leflunomida y nanopartículas de PLGA blancas sobre la viabilidad celular. Los datos representan la media y desviación estándar, cada uno por quintuplicado.

70

AGRADECIMIENTOS

El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas, obstáculos que se superan teniendo perseverancia, determinación, tenacidad ante cualquier meta o proyecto en la vida, cualidades que son inculcadas y que posteriormente nosotros mismo vamos puliendo. Eso lo he aprendido principalmente del ejemplo y apoyo de mi familia.

Agradezco principalmente a Jehová por las bendiciones que siempre me ha otorgado, por siempre ayudarme a lograr mis objetivos, por darme paciencia y paz cuando nomas lo necesite.

Agradezco principalmente a mi madre Gabriela Villaseñor Sánchez, quien es mayor ejemplo y motivación, por enseñarme, que cuando uno cae hay que levantarse, pero siempre hacerlo con más fuerzas, más nunca ser arrogante, a disfrutar día a día cada uno de mis logros, y de aquellos que no pueda lograr, tomarlos como una experiencia de la cual hay que aprender, a siempre ser humilde, pues el ser una persona arrogante nunca deja nada bueno, a que si llego a equivocarme siempre sacar el mayor provecho de esa experiencia, a no guardar odio en mi corazón a quien me lastime, si no solo aprender de la experiencia, pues el resentimiento solo crea un vacío y una soledad grande, por siempre estar en los momentos más difíciles, cuando sentía que no podría lograrlo, y ayudándome a levantarme con palabras de aliento, a escucharme cuando lo necesitaba, a demostrarme con su ejemplo que no hay imposibles, cuando un quiere lograr sus metas, es por ello que hoy estamos aquí, por enseñarme que "LOS LIMITES LOS PONEMOS NOSTROS MISMOS", por su amor incondicional, apoyo, por sus consejos y paciencia, simplemente por ser la excelente madre y persona que es, y que gracias a ella soy lo que soy

A mi abuela Gabina Sánchez Cortez, quien es mi segunda madre, por ese amor incondicional que me tiene, por enseñarme el amor más puro, y que a pesar del dolor causado aún se puede llegar perdonar de corazón sin guardar rencor, a ser perseverante y tenaz ante los obstáculos y mantener una sonrisa, y por apoyarme en todo y siempre creer en mí, aun sabiendo que tenía que irme lejos para cumplir mis metas.

Agradezco mi tío Jorge Villaseñor Sánchez, quien es un padre para mí, por estar en momentos difíciles, dándome palabras de aliento cuando más los necesitaba, a siempre tener valor para cualquier reto que se me presente, por siempre motivarme, por demostrarme con su ejemplo que, aunque la lucha ante cualquier meta puede ser difícil siempre saber que no hay imposibles, y por supuesto a su amor y apoyo como padre a lo largo de mi vida.

Agradezco a mis hermanos Bianca Zamanta Ramírez y Noe Alberto Ramírez no solo por estar presentes en los momentos felices de mi vida, si no por siempre estar ahí cuando los he necesitado, por siempre darme su apoyo y amor.

Agradezco a la Dra. Roció Alejandra Chávez Santoscoy, por su infinita paciencia, por su capacidad de guiar mis ideas el cual ha sido un aporte invaluable, por creer en mi proyecto y hacerme ver lo valioso que es, y darme la oportunidad de realizarlo bajo su dirección, por su tiempo y apoyo, desde el inicio para la realización de este proyecto, por siempre creer en mi en todo momento y bríndame palabras de aliento en momentos difíciles, de la cual he aprendido perseverancia, el interés y amor por la investigación, a exigirme a misma y siempre dar el cien por ciento en todo.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, agradezco su profesionalismo, tiempo y apoyo en el desarrollo de este proyecto, por disipar mis dudas, por creer en este proyecto y hacerme ver que vale la pena luchar por él.

A la Dra. Aracely Serrano Medina, agradezco su disposición para resolver mis dudas, por enseñarme a siempre dar lo mejor de mí, por ofrecerme sus conocimientos para lograr mis objetivos en este proyecto.

A la Dra. Carolina Gómez Gaete, le agradezco por darme la oportunidad de trabajar usted, por sus invaluable conocimientos, por todo el apoyo y afecto brindado en mi estancia en la Universidad de Concepción, de usted aprendí a enfrentar mis miedos y resolverlos en el aspecto profesional.

Agradezco a la Profesora Dinora Bernal Iribe, quien es la inspiración de este proyecto, que a pesar de de los obstáculos que se puede llegar a presentar nunca darne por vencida, a siempre mostrar una sonrisa y a dar lo mejor de ella misma a pesar de padecer esta condición.

A la Dra. Kenia Palomino Vizcaino, por su tiempo, por siempre motivarme a creer en misma, pero, sobre todo, apoyo moral e incondicional a través de estos años.

Agradezco a mis amigos, Jhoana Soto, Ana Verónica Martínez, Isabel Acosta, Cinthia Peralta, Monserrat Gutiérrez, Agustín Monterroza, Alitzel Rousseau, Litzy Guilbert, Marlen Posada, Karina Zapata, Susana López Doña Mary, Aldo Leyva, German Sánchez, quienes sin esperar nada a cambio me mostraron su apoyo incondicional, por siempre estar en los momentos de alegría y en mis momentos más difíciles, por siempre creer en mí e incitarme a seguir mis metas.

A todos mis académicos, por los conocimientos adquiridos a través de sus enseñanzas, así como todo lo positivo que dejaron hacia mi persona.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para lograr cambios extraordinarios”

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a mi universidad la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de posgrado, así mismo a la Facultad de Ciencia Químicas e Ingeniería (FCQI) y al programa Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI), por las instalaciones utilizadas para llevar a cabo este proyecto de investigación, donde fueron realizados parte de la síntesis de nanopartículas y medición de tamaño de estas. A todo el personal administrativo de UABC por su ayuda en todos los trámites realizados en este proyecto.

Agradezco a la Universidad de Concepción, Chile, donde se llevó a cabo parte de la síntesis de nanopartículas, caracterización de estas, así como estudios de viabilidad celular, para la determinación de citotoxicidad, como también agradezco su hospitalidad y amabilidad, tanto del personal docente, administrativo, como también auxiliares de laboratorio

Este proyecto fue apoyado por **SEP-CONACYT (CB2017-283558), XXVIII CONVOCATORIA DEL PROGRAMA DE INTERCAMBIO ESTUDIANTIL POSGRADO 2018 (UABC).**



**Universidad
de Concepción**

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica degenerativa, autoinmune, que afectan principalmente la membrana sinovial y articulaciones en donde la inflamación sinovial lleva a destrucción del cartílago, erosiones ósea y deformación articular e incapacidad funcional. Sin un diagnóstico a tiempo y un tratamiento temprano, se produce la discapacidad y deformidad articular lo que se ve reflejado en la economía y calidad de vida del paciente. Dentro del esquema de tratamiento para artritis reumatoide para alcanzar rápidamente un estado de remisión encontramos a los fármacos modificadores de la enfermedad (FARMES), al que pertenece leflunomida cuyas propiedades son inhibir la síntesis de pirimidinas a través de la inhibición de la enzima dihidro-orotato deshidrogenasa, impidiendo el ciclo celular de los linfocitos, debido a la baja solubilidad y los efectos adversos que este presenta es necesario suspender el tratamiento. Para poder solucionar las limitantes del tratamiento, el presente proyecto se enfocó en el desarrollo de un sistema de administración y liberación mediante la elaboración de nanopartículas de PLGA cargadas con leflunomida para su evaluación en el tratamiento de artritis reumatoide. Las nanopartículas fueron sintetizadas por la técnica emulsión evaporación de solvente, y fueron caracterizadas mediante las siguientes técnicas DLS donde fue medida la distribución del tamaño, obteniendo un tamaño dentro de los 200 nm, estos comparados con una Microscopia de transmisión de barrido que demostró que las nanopartículas presentaban una morfología esféricas y demostrando que existía un tamaño de 200 nm, para evaluar la carga de la superficie de las nanopartículas se utilizó obteniendo un potencial entre -20 mV lo que indica que existe una estabilidad de estas, para la caracterización también se utilizó un FTIR-ATR que confirmó la interacción molecular entre el polímero y principio activo, así mismo fueron realizados una cinética de liberación *in vitro*. También se realizó estudios de citotoxicidad *in vitro* utilizando células THP-1 para evaluar la viabilidad celular de las formulaciones.

Los resultados de la microscopia mostraron que las nanopartículas exhibían una forma esférica con una superficie lisa. La distribución del tamaño vario 208 y 218 con diámetro medio 1.99 ± 2.84 . la eficiencia de encapsulación de la formulación optima fue de $14.85 \pm 0.33\%$. Los resultados FTIR-ATR mostraba que existe una interacción molecular en PLGA y leflunomida lo que se nos da la certeza de una exitosa nanoencapsulación de leflunomida. La viabilidad celular mostro que tanto las nanopartículas blancas y cargadas al ser expuestas a las 24 horas no afectaron significativamente a la viabilidad celular (98%), mientras que leflunomida las 24 horas si presentaba una afectación a la viabilidad celular 68%. Posteriormente, al estimular las células por 48 horas ya se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad (75%), esto ocurre porque existe una liberación del fármaco. En conclusión, estas nanopartículas representan una estrategia eficaz para proteger moléculas hidrofóbicas bioactivas que potencialmente pueden ser utilizadas en el tratamiento de AR. Como proyecto a futuro se desarrollará un sistema en donde se implementará la utilización de nanopartículas de PLGA cargadas con teriflunomida, encapsulada en micropartículas Troyano mediante la utilización de spray drying con el uso de boquilla de 3 fluidos para mejorar las propiedades física y estabilidad de las nanopartículas, para una mejor administración y liberación de estas. Siendo *in vitro* en células e *in vivo* en un modelo animal para evaluar este sistema.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes de artritis reumatoide
Nanotecnología como sistema de liberación

Las enfermedades autoinmunes conocidas como enfermedades degenerativas, se relacionan con afecciones en las que el daño estructural o funcional de órganos y tejidos es producido por componentes inmunológicos o anticuerpos que atacan al cuerpo[1]. Durante las últimas décadas, las estrategias para el tratamiento de artritis reumatoide (AR) han cambiado de alivio sintomático a prevención de discapacidad y daño radiológico, desde la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para tratar el dolor, fármacos modificadores de la enfermedad (FARMES) que retasan o reducen el daño articular producido por la AR, glucocorticoides que tienen acciones supresoras de inflamación, y agentes biológicos que atacan componentes específicos del sistema inmunológicos que contribuyen a la enfermedad, favoreciendo el tratamiento intensivo temprano con el objetivo de lograr la remisión de los síntomas y el retorno a la función normal[2]–[6].

A pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, la farmacoterapia convencional tiene desventajas, como baja solubilidad y permeabilidad, escasa biodisponibilidad, degradación por enzimas gastrointestinales, metabolismo de primer paso, interacciones con alimentos y toxicidad, por lo cual después de dos años iniciado el tratamiento solo el 50% de los pacientes continua con él[7], [8]. El manejo a largo plazo del tratamiento puede causar dificultad en pacientes con artritis reumatoide, dando como la falta de adherencia[9]. Las razones más comunes de falta de adherencia al tratamiento incluyen, la prescripción de un régimen de medicamentos complejo, la presencia o ausencia de dolor, el paciente puede aumentar la dosis o suspender por dolor o suspende por ausencia, las diferencias entre las formulaciones farmacéuticas, la vía de administración y horarios de dosificación que pueden conducir a diferencias en el tratamiento, sin mencionar los altos costos del tratamiento[10].

| ANTECEDENTES

Para combatir estos problemas y optimizar la eficacia terapéutica, la utilización de nuevos sistemas de administración de medicamentos basadas en nanotecnología se ha convertido en una opción viable [11]. La nanotecnología se centra en la formulación de agentes terapéuticos en nano-transportadores biocompatible, utilizando nanopartículas como sistemas de administración de fármacos que varían aproximadamente entre 100 a 500 nm, que pueden fabricarse con diferentes de materiales [12]. Estos materiales incluyen polímeros (nanopartículas poliméricas, micelas o dendrímeros), lípidos (liposomas), compuestos organometálicos (nanotubos) y compuestos orgánicos (nanopartículas metálicas)[13].

En comparación con los medicamentos tradicionales, las nanopartículas presentan ventajas que incluyen, mejorar la administración de principios activos insolubles, maximizando la biodisponibilidad y la eficacia del tratamiento, reducir los efectos secundarios, aumentar la vida media en plasma de peptídicos, protegiéndolos de la degradación causada por componentes inmunológicos y enzimas presentes en el torrente sanguíneo, co-administración fármacos y agentes de direccionamiento para la administración en tejido específicos, actuar como sistema de liberación controlada durante un periodo de tiempo manejables en dosis precisas, facilitar el transporte de principios activos a través de tejidos y barreras biológica que son inalcanzables gracias a su diámetro[14]–[17].

Actualmente la artritis reumatoide constituye un problema de salud pública a nivel mundial, esto es debido a su alta prevalencia, las consecuencias funcionales el alto impacto económico y social. De acuerdo con la Guía Mexicana para el Tratamiento farmacológico de la Artritis reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología, tan solo en México se estima que la artritis reumatoide tiene una prevalencia del 1.6%, afectando principalmente a personas con mayor capacidad laboral y productividad, esto se ve reflejado en alto índices de discapacidad y pensión por invalidez y los costos del tratamiento que generan un alto impacto en la economía, y la disminución en la calidad de vida de los pacientes[18], [19].

En la actualidad existen tratamientos eficaces para controlar el dolor, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), fármacos modificadores de la enfermedad (FARMES) que retasan el daño articular, glucocorticoides para el control de la inflamación articular, **agentes biológico** que atacan componentes específicos del sistema inmunológicos, con el objetivo de lograr la remisión de los síntomas y el retorno a la función normal, sin embargo, el mayor inconveniente es la toxicidad o la pérdida de eficacia[20]–[22]. Por estas razones, la implementación del uso de nanotecnología ha desempeñado un papel importante en la administración y liberación de medicamentos para mejorar el efecto terapéutico de diversas enfermedades [23]. Empleando el uso de nanopartículas poliméricas, lipídicas, metálicas y liposómicas, diseñadas a través de metodologías que muestran un control sobre las propiedades fisicoquímicas, para la administración fármacos con el objetivo de transportar las dosis adecuadas a los sitios de acción (como tumores, órganos, tejido dañados), prolongar el efecto y maximizar su eficacia terapéutica, al mismo tiempo que minimiza las reacciones adversas de los medicamentos en otros tejidos[24], [25].

| HIPÓTESIS

El presente proyecto tuvo como objetivo el de implementar el diseño y caracterización de un sistema de administración y liberación de leflunomida (FARME) en base a nanopartículas poliméricas de PLGA éster terminal y evaluar la viabilidad celular en presencia de éstas, disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre, así como también actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre

3

HIPOTESIS

La encapsulación de leflunomida en nanopartículas poliméricas de PLGA elaboradas por emulsión evaporación de solvente, proporciona un sistema de liberación controlada del fármaco, con apropiadas características fisicoquímicas para una eventual administración intra-articular sin efectos citotóxicos.

4 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y caracterizar un sistema de administración y liberación de leflunomida (FARME) en base a nanopartículas poliméricas de PLGA y evaluar la viabilidad celular en presencia de éstas.

5 OBJETIVO ESPECIFICOS

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas por el método emulsión y evaporación de solvente.
- Encapsular de leflunomida (FARMEs) en las nanopartículas previamente sintetizadas.
- Evaluar la liberación *in vitro* de leflunomida desde las nanopartículas y compararla con el fármaco libre.
- Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas cargadas con leflunomida en líneas celulares THP-1.

6.1 ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica degenerativa, con características autoinmunes, de etiopatogenia desconocida, caracterizada por la inflamación persistente de la membrana sinovial e hiperplasia que forma el revestimiento de las vainas del tendón y de articulaciones[26], la inflamación sinovial lleva a destrucción del cartílago, erosiones ósea y deformación articular e incapacidad funcional[27]. La AR puede llegar a presentar manifestaciones extraarticulares, es decir aquellas que no son propias de la articulaciones, como vasculitis, glomerulonefritis, pericarditis, pleuritis, escleritis y nódulos reumáticos[28].

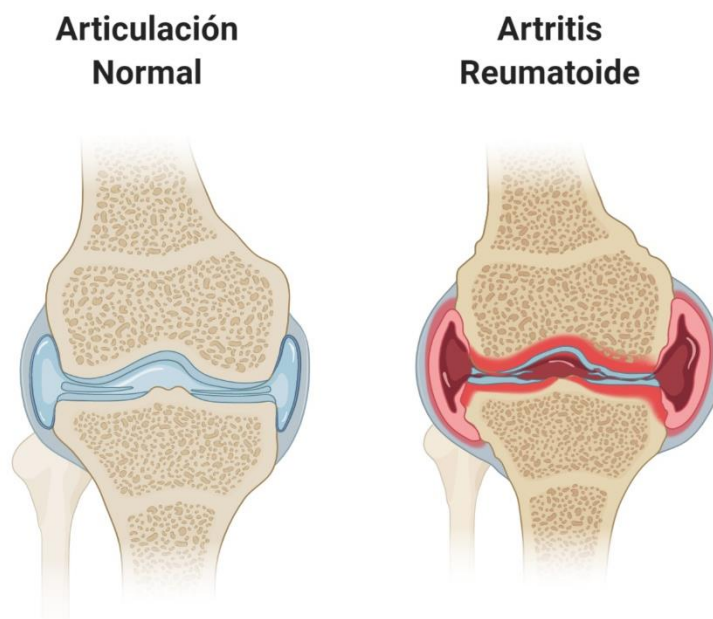


Figura 1.1 Representación esquemática de sinovitis en la articulación. Fuente: *Rheumatoid Arthritis: Recent Advances on Its Etiology , Role of Cytokines and Pharmacotherapy, Biomedicine et Pharmacotherapy* (2017): 615–633.

6.2 PREVALENCIA E INCIDENCIA

Las enfermedades reumáticas están dentro de los padecimientos con mayor prevalencia del sistema musculoesquelético y tejido conectivo, caracterizadas por el daño a huesos, articulaciones y órganos diana, comprenden más de 100 enfermedades clasificadas con patogénesis, cuadro clínico y tratamiento, como, por ejemplo; artritis reumatoide osteoartritis, gota, lupus, artritis reumatoide juvenil, por mencionar algunas, la prevalencia e incidencia pueden variar según sea el país de origen, población. De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), la artritis reumatoide presenta una prevalencia entre 0.5 a 1.5% a nivel mundial, afectando a personas entre 35 a 50 años de edad, siendo con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, con una relación 3:1[29]–[31]. La incidencia de artritis reumatoide puede variar entre poblaciones. En América del Norte y el Europa del Norte se estima los 20-a 50 casos por cada 100, 000 habitantes.

En México, un estudio realizado por Peláez-Ballestas en 2011 a 5 regiones mexicanas con una muestra de 19,213 persona, revelo que alrededor del 14% de la población de estudio padecía de alguna enfermedad reumática. Dentro de estas, la AR tuvo una prevalencia de 1.6% de estudio colocando a México dentro los países con alta prevalencia de AR, lo que es interpretado como como 2,690 individuos afectado[32].

| PREVALENCIA E INCIDENCIA

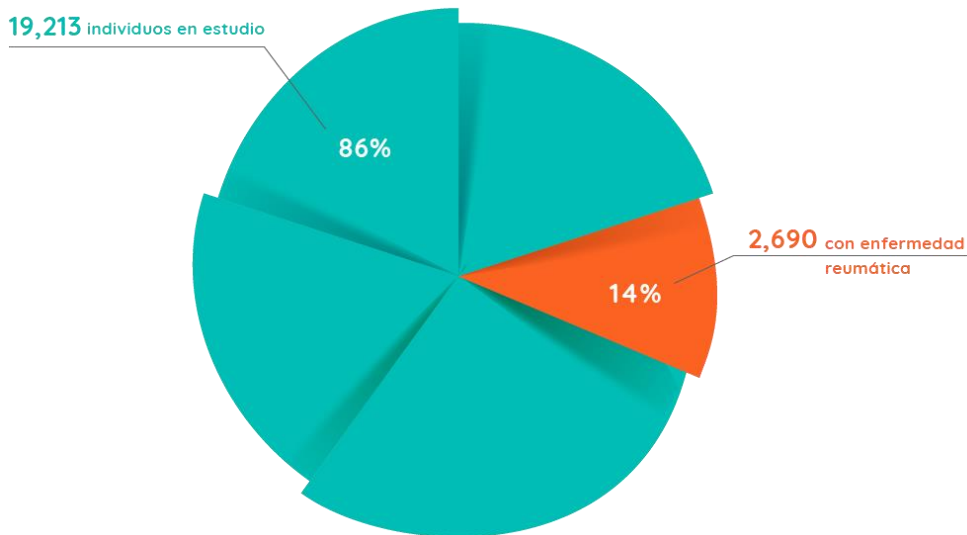


Figura 1.9 Prevalencia de enfermedades reumáticas en México. Fuente: “Epidemiology of the rheumatic diseases in México. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology,” J. Rheumatol., vol. 38, no. SUPPL. 86, pp. 3–6, 2011

En estudios realizados en Estados Unidos, anunciaron datos que estiman que 54.4 millones de adultos estadounidenses padecen artritis reumatoide, lo que equivale al 25% de la población, para el año 2040, se estima que 78 millones (26%) de los estadounidenses de 18 años o más padecerán AR diagnosticada por un médico[33]. En otro estudio realizado en Estados Unidos, datos reportados del 2004 a 2014 que fueron monitoreados mediante tres diferentes bases de datos mostraron una prevalencia de 0.55%, afectando de 1.28’1.36 millones en adultos[34].

En Chile, la Encuesta Nacional de Salud (ENS) realizó un estudio en agosto 2016 y marzo 2017 en donde participaron 6233 persona en un rango de 30 años ,en donde la prevalencia fue de 0.6%, lo que se asimila a la prevalencia reportada previamente en países desarrollados[35]. En 2010 en Buenos Aires, Argentina, se realizó un estudio en base a los criterio del Colegio Americano de Reumatología , don se encontró una tasa de prevalencia del 0.94% en la población encuestada , esta prevalencia fue mayor en mujeres que en hombres[36].

| PREVALENCIA E INCIDENCIA

En Colombia, se desarrolló un estudio descriptivo en 5 ciudades colombianas entre 2009 y 2013, utilizando registros médicos en un centro de atención para pacientes reumatológicos, con una muestra de 1364 pacientes, se estimó una prevalencia de 0.15% en pacientes de 50 a 13 años, donde el 81.9% fue en pacientes femeninos[37]. En Venezuela, se realizó un estudio transversal, analítico en el estado de Monagas a tres comunidades indígenas Warao, Kariña y Chaima, con la finalidad de estimar la prevalencia de trastornos musculoesqueléticos y enfermedades reumáticas, donde participaron 1537 personas \geq 18 años, aplicando el cuestionario de diagnóstico del Programa de Orientación Comunitaria para el Control de Enfermedades Reumáticas (COPCORD), de este estudio se obtuvo que la mayor tasa de prevalencia fue en la comunidad Caima con 2.0%[38].

En Canadá, de acuerdo con un estudio realizado en Ontario en los últimos 15 años para determinar la tasa de prevalencia AR, se determinó que para el 2010, había 97,499 Ontario con AR, lo que se traduce en una prevalencia de 0.9%, estandarizada por edad y sexo aumentando de manera constante con el tiempo de 473 por cada 100,000 habitantes (0.49%) en 1996 a 784 por cada 100,000 habitantes (0.9%) en 2010[39].

6.3 IMPACTO SOCIOECONÓMICO

Las enfermedades musculoesqueléticas desde el punto de vista económico la artritis reumatoide es la segunda enfermedad reumática que genera un alto costo de los medicamentos provoca un aumento en la destrucción de articulaciones, en donde afecta la calidad de vida y discapacidad laboral. Los padecimientos de origen reumático tienen una pesada carga económica y moral para el paciente, su familia y la sociedad. En México, la población más afectada en AR pertenece a niveles socioeconómicos bajo[40]. El diagnóstico y tratamiento en etapa avanzada se encuentra cubierto tanto a través del Seguro Popular, como el IMSS y el ISSSTE. Las Enfermedades Reumatoides afectan a aproximadamente 10 millones de personas en

México, siendo la Artritis Reumatoide y la Osteoartritis las dos más comunes, pues afectan a 1 y 8 millones de personas respectivamente. Después de la diabetes, las neoplasias malignas y la insuficiencia renal, las enfermedades reumáticas están dentro de las primeras 10 causas de atención médica ambulatoria[40].

En el 2011 se realizó un estudio con el fin analizar la incidencia, prevalencia, costos e impacto de 8 condiciones que causan discapacidad, donde se comparo el impacto de la discapacidad atribuible a estas condiciones sobre la actividad y la limitación del trabajo [41], [42]. Las condiciones analizadas fueron Accidente cerebrovascular, Lesión de la médula espinal, Lesión Cerebral Traumática, Esclerosis Múltiple, Artrosis, Artritis Reumatoide, Pérdida de Miembros y Dolor de espalda. Se estimó que 37,9 millones de personas, el 12.2% de la población de Estados Unidos, vivían con una discapacidad causada por alguna de las enfermedades analizadas[42]

6.4 PATOGÉNESIS

Aunque la patogénesis de la enfermedad no está esclarecida en su totalidad, existen factores genéticos y ambientales que predisponen a su desarrollo[43]

La AR es resultado de la activación de células T y B autorreactivas que actúan conjuntamente y producen una inflamación sinovial con infiltración celular junto a un proceso de remodelado y destrucción ósea[44]–[48]. Se manifiesta primeramente con la inflamación de la membrana sinovial, en el cual se produce una infiltración de células inflamatorias, el cual comprende células innatas como monocitos, células dendríticas, mastocitos y células adaptativas principalmente linfocitos Th1 y Th17, que son secretores de la citosina quien tiene un mayor efecto pro-inflamatorio, interleucina (IL-17), que desempeña un papel iniciador, interaccionando con células dendríticas, macrófagos y linfocitos B[44]–[48].

Lo que conlleva a una lesión microvascular y un aumento en células de revestimiento sinovial (fibroblastos sinoviales). Posteriormente los fibroblastos sinoviales junto con los linfocitos T y B son activados por el microambiente local que median el proceso inflamatorio crónico dando pie a la destrucción articular, erosión sea y una atrofia muscular[44]–[48]

La patogénesis se puede dividir en dos etapas que corresponde a artritis reumatoide temprana y establecida. En la articulación normal, el tejido sinovial está formado por la membrana sinovial y el tejido conectivo[38], [45]–[48]. Las células sinoviales se designan en tipo A (sinoviocitos que son similares a macrófagos) y tipo B (sinoviocitos similares a fibroblastos). En la artritis reumatoide temprana, la membrana sinovial se hace más gruesa debido a la hiperplasia e hipertrofia de células sinoviales. Los linfocitos T (Linfocitos CD4+) y linfocitos B infiltran la membrana sinovial, en esta etapa inicial de la artritis reumatoide la membrana sinovial empieza invadir el cartílago. En la artritis establecida, las células proliferan en un número y estado de activación, que es conocido como el pannus que contiene sinoviocitos Tipo A y B junto con otras células plasmáticas que es el que invade y destruye el cartílago y el hueso[38], [45], [47], [48]..

Patogénesis de Artritis Reumatoide

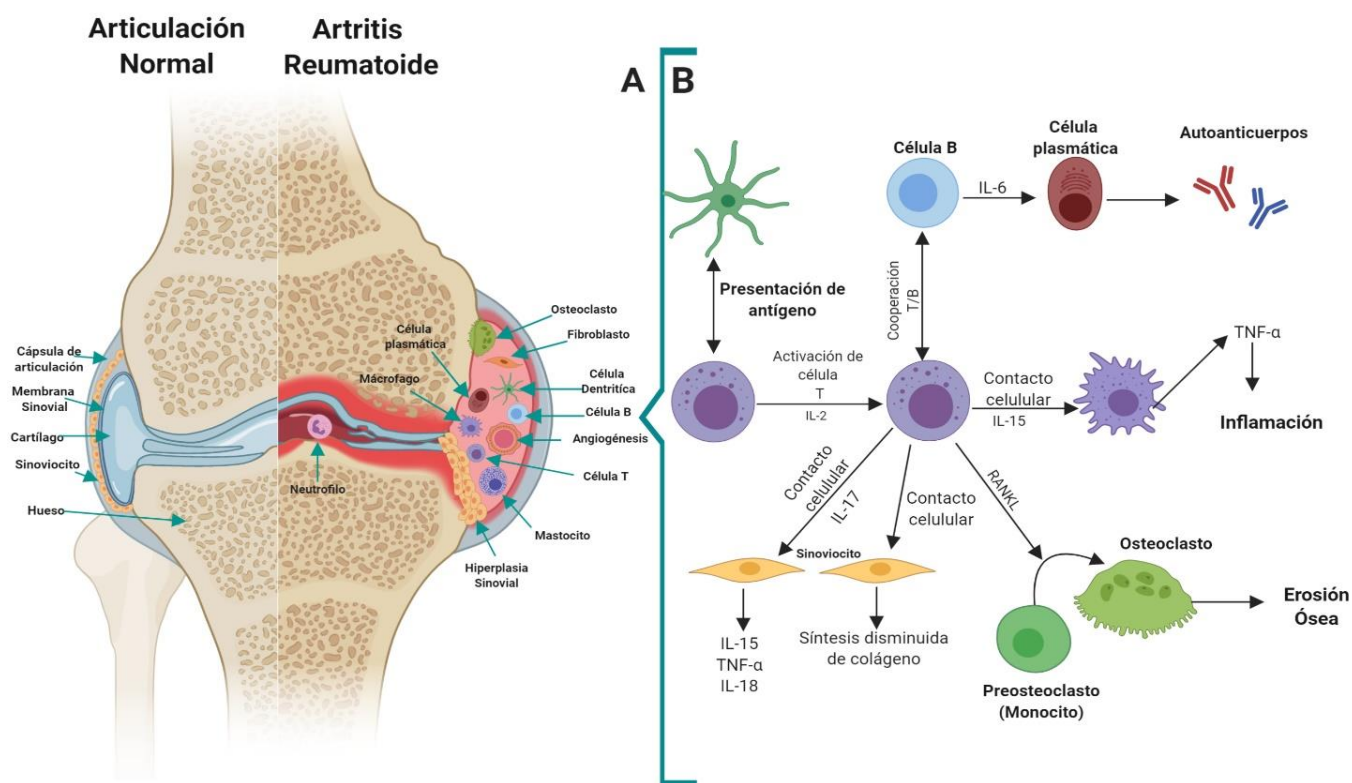


Figura 1.10 Representación de patogénesis. Fuente: " *Physiology and Pathology of Autoimmune Diseases: Role of CD4+ T cells in rheumatoid Arthritis,*" *Physiol. Pathol. Immunol,* 2017

6.5 ETIOLOGÍA DE ARTRITIS REUMATOIDE

A pesar de décadas de estudio y los grandes avances alcanzados sobre los mecanismos moleculares, celulares y genéticos que mantienen una respuesta inflamatoria en la AR, la etiología aún no se ha comprendido completamente, se considera que la combinación de factores genéticos, agentes iniciadores autoinmunes y agentes infecciosos[49], desarrollan mecanismos subyacentes que activan el sistema inmunológico para atacar las articulaciones, como resultado, causa inflamación y engrosamiento de la capsula articular, hueso y cartílago[49].

ETIOLOGÍA DE ARTRITIS REUMATOIDE

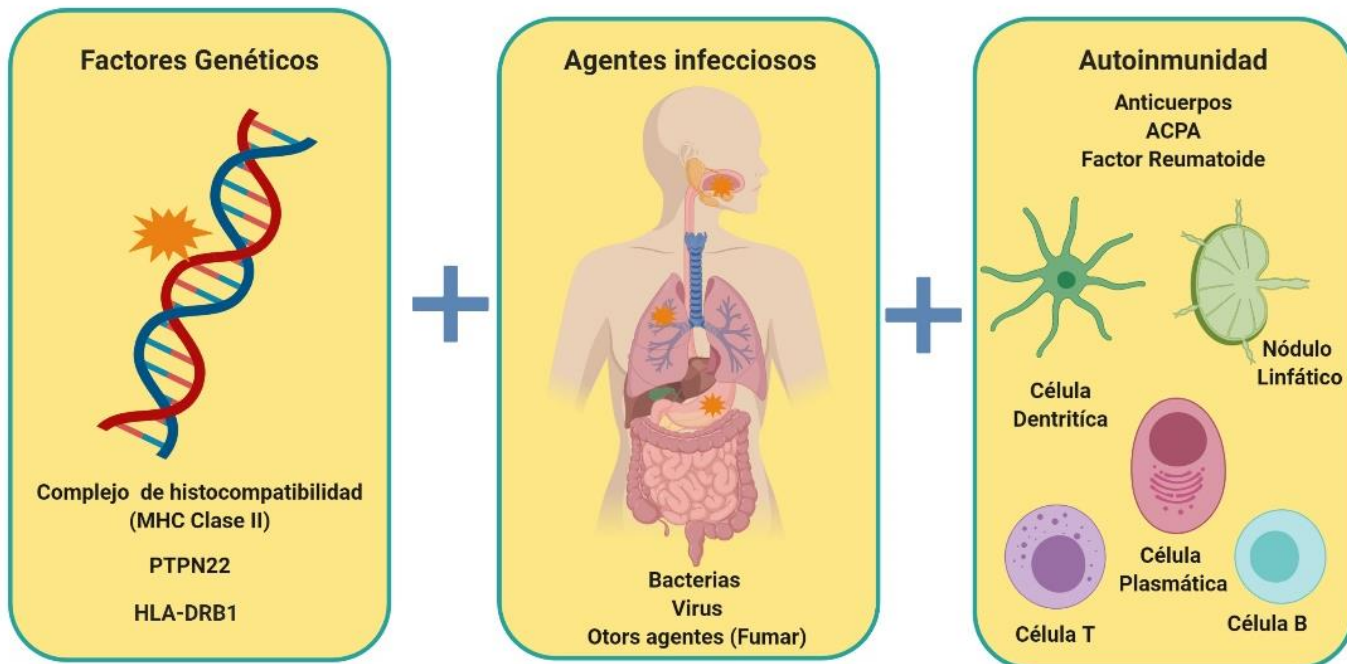


Figura 1.18 Etiología de artritis reumatoide. Fuente: “Rheumatoid arthritis : Recent advances on its etiology , role of cytokines and pharmacotherapy,” Biomed. Pharmacother., vol. 92, pp. 615–633, 2017

6.4.1 FACTORES GENÉTICOS

La susceptibilidad genética contribuye entre 50-60% en el desarrollo AR basada en la agregación familiar de la enfermedad y en la mayor concordancia en gemelos monocigoto (MC) que en dicigoto (DC). En gemelos monocigotos la tasa de concordancia de la enfermedad está entre 12% y el 15% comparado con el 3.5 % en gemelos dicigotos. Para familiares de primer grado la concordancia es de entre 2 y 4% por lo que el riesgo a desarrollar AR es 2 a 10 veces más que la población general[50], [51]. Diversas combinaciones de alelos susceptibles localizados en varios genes esta implicados en la predisposición de AR.

| ETIOLOGÍA DE ARTRITIS REUMATOIDE

El gen HLA-DRB1 es el principal factor genético asociado con la AR en el complejo de histocompatibilidad, donde los alelos específicos DRB1*0401 y 0404 codifican para una misma secuencia de aminoácidos de la tercera región hipervariable de la cadena beta de la molécula HLA, una región que es fundamental en el proceso de reconocimiento antigénico y conocida como epítipo reumatoide (ER) o epítipo compartido (EC), la HLA-DRB1 contribuye en un tercio de la susceptibilidad genética en la AR. Como segundo gen de susceptible para el desarrollo de AR es el PTPN22 que duplica el riesgo de AR seropositiva en heterocigotas y lo cuadriplica en homocigotas. Otros genes de susceptibilidad de AR es el STAT4, un factor de transcripción clave en la regulación inmune que interviene en la señalización de vías que promueven la diferenciación de linfocitos T CD4 a Th1 y Th17, los cuales están involucrados en la patogenia de la AR[52]–[54].

6.4.2 ANORMALIDADES INMUNORREGULADORAS Y AUTOINMUNIDAD

En 80% de los pacientes con artritis reumatoide existen los anticuerpos dirigidos contra la porción FC de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o el factor reumatoide (FR) son producidos por los linfocitos B en sangre y tejidos sinoviales. Los títulos altos el FR sérico se ha relacionado con una afección más grave y con manifestaciones extraarticulares, en especial nódulos subcutáneos. Otro factor que puede influye son las hormonas sexuales, sobre todo las hormonas femeninas son responsables de muchas enfermedades reumáticas, las suposiciones, que las hormonas sexuales pudieron ser implicadas patógeno se acentúan por la presencia de receptores distintos de la hormona en o dentro de las células inmunes. Un ejemplo de ello estradiol que actúa de manera dependiente de la dosis [55], [56].

6.6 DIAGNOSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE

Por ello antes de iniciar el tratamiento farmacológico, es necesario solicitar las siguientes pruebas complementarias:[57]–[59]

1. Pruebas analíticas con determinación de hemograma completo, bioquímica con determinación de creatinina sérica y perfil hepático, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva (PCR).
2. Serología de virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC): previo comienzo de terapia con metotrexato (MTX), leflunomida (LEF) y fármacos biológicos.
3. Estudio oftalmológico, incluyendo el examen de la retina y pruebas de campo visual, en caso de uso de hidroxicloroquina (HCQ) como terapia y posteriores revisiones anuales.
4. Pruebas para la detección de tuberculosis latente: se hará mediante la realización de una radiografía de tórax y pruebas de Mantoux/Booster y/o QuantiFERON, principalmente si existe intención de uso de terapia biológica.

CLASIFICACION DE ARTRITIS REUMATOIDE PARA SU DIAGNOSTICO

En 1987, el American College of Rheumatology (ACR) estableció criterios para clasificar pacientes con artritis reumatoide, y diferenciarlos de otras enfermedades reumáticas al utilizar criterios de clasificación, dentro los criterios evaluaron fueron rigidez, hinchazón, erosiones radiográficas en articulaciones en mano y muñecas, aunque estos criterios son pocos sensibles al diagnosticar pacientes en fase temprana de la enfermedad y no son útiles para el diagnóstico individual del paciente[60].

Tabla 1.1 Criterios de clasificación para AR del American College of Rheumatology de 1987.

Criterio	Definición
Rigidez matutina	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora.
Artritis de 3 o más grupos articulares	Al menos 3 grupos articulares debe presentar inflamación del tejido blando simultáneamente y observados por un médico. Las 14 áreas posibles son <i>PIP</i> , <i>MTP</i> , muñeca, codo rodilla, tobillo y articulaciones.
Artritis de las articulaciones de la mano	Al menos una articulación de muñeca debe estar inflamadas (Carpó, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales).
Artritis simétrica	La afectación simultanea del mismo grupo articular (definido en criterio 2) en ambos lados del cuerpo.
Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas, superficies de extensión o zonas yuxta-articulares observados por un médico.
Factor reumatoide positivo en suero	Presencia de valores elevados de factor reumatoide por cualquier método con un resultado en controles inferior al 4%.
Alteraciones radiológicas	Alteraciones radiológicas típicas de Ar en radiografías postero anteriores de las manos. Debe existir erosión o descalcificación ósea yuxta-articular clara y definida en articulares afectadas.

Fuente: "The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis," *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, vol. 77, no. 5, pp. 742–743,

| ETIOLOGÍA DE ARTRITIS REUMATOIDE

Los pacientes que cumplen $\geq 4/7$ criterios son clasificados con AR, los criterios de 1-4 deben estar presentes al menos durante 6 semanas. Los 14 grupos articulares a tener en cuenta en el criterio N° 2 que son: articulaciones interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas.

Posteriormente en 2010 la ACR y American College of Rheumatology and European League against Rheumatism (EULAR) realizaron una colaboración donde desarrollaron nuevos criterios de clasificación para la AR con la finalidad de facilitar la identificación temprana.

Tabla 1.2 Criterios de clasificación para artritis reumatoide de 2010 (ACR/EULAR)

Criterios de clasificación para AR de 2010 (ACR/EULAR)	Puntos
A. Afectación articular (0-5 puntos)	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas (con/sin afectación articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas afectada	3
> 10 articulaciones (al menos una articulación pequeña)	5
B. Serología (al menos una prueba necesaria para clasificación; 0-3 puntos)	
FR y Anti-CCP negativos	0
FR y/o Anti-CCP positivos bajo (< 3 VN)	2
FR y/o Anti-CCP positivos altos (> 3 VN)	3
C. Reactivos de fase aguda (al menos una prueba necesaria para la clasificación; 0-1 puntos)	
PCR y VSG normales	0
PCR y/o VSG elevados	1
D Duración de los síntomas	
Inferior a 6 semanas	0
Igual o superior a 6 semanas	1

Fuente: "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative," Arthritis Rheum.682

6.7 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE ARTRITIS REUMATOIDE

Si bien en la actualidad existen tratamientos farmacológicos para lograr la meta terapéutica, que es la remisión de síntomas y el retorno funcional normal del paciente, sin embargo, la falta de adherencia al tratamiento debido a las reacciones adversas, como lo es la hepatotoxicidad, por mencionar uno, que, a dos años de dar inicio, solo el 50% de los pacientes pueden continuar con el tratamiento. Dentro del esquema de tratamiento para artritis reumatoide existen cuatro clases de medicamentos son las utilizadas habitualmente[61]–[64]:

De acuerdo a la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide, European League Against Rheumatism (EULAR), American College of Rheumatology, han desarrollado una guía de tratamiento farmacológico para disminuir los síntomas y en algunos caso llegar a la remisión de la enfermedad. Siendo es esquema de tratamiento el siguiente[20], [65], [66]:

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA AR

- 1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's).**
- 2. Glucocorticoides.**
- 3. Agentes Biológicos**
- 4. Fármacos Modificadores de la Enfermedad (FARMEs).**

1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE'S)

El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES)son quienes constituyen el primer escalón en el tratamiento de la artritis reumatoide, y con frecuencia se inicia antes de llegar al diagnóstico de esta. Los cuales se encargan de aliviar el dolor y reducir la inflamación sin que tengan ningún efecto sobre la evolución de la sinovitis o la inflamación progresión del daño articular. Los AINES ejercen sus acciones inhibiendo

la actividad enzimática de la enzima ciclooxygenasa COX. Existen múltiples tipos de AINES pertenecientes a diferentes familias químicas ejemplos de ellos son[18], [20], [66], [67].

:

Diclofenaco

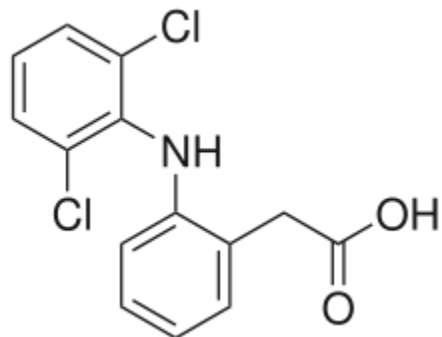


Figura 1.20 Estructura de diclofenaco

Ibuprofeno

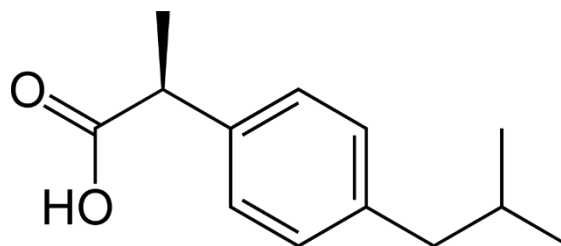


Figura 1.19 Estructura de ibuprofeno

Naproxeno

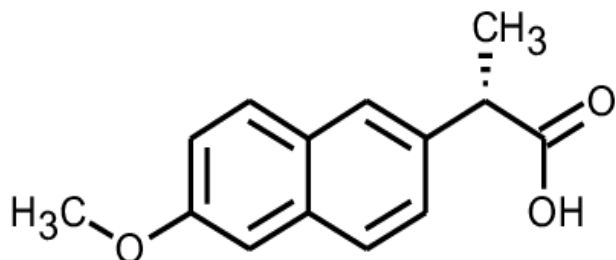


Figura 1.0.47 Estructura de naproxeno

Dentro las reacciones adversas que se han registrado al usar AINES se encuentra el daño gastrointestinal, fundamentalmente en relación con el descenso en la producción de prostaglandinas protectoras de la mucosa, la nefrotoxicidad y el desarrollo de úlceras[68].

2.- GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides tienen potentes acciones analgésicas y antiinflamatorias ya que suprimen la inflamación a través de múltiples mecanismos que interactúan, como la inhibición de la ciclooxigenasa- (COX-2) y la sintetasa inducible de ácido nítrico, el bloqueo de estos se debe a procesos mediados por el efecto sobre la inhibición del complejo AP-1. Como resultado de estos mecanismos retrasan la aparición de lesiones radiológicas y prevenir, con ello, la progresión del daño estructural, ejemplos de ellos son [69], [70]:

Prednisona

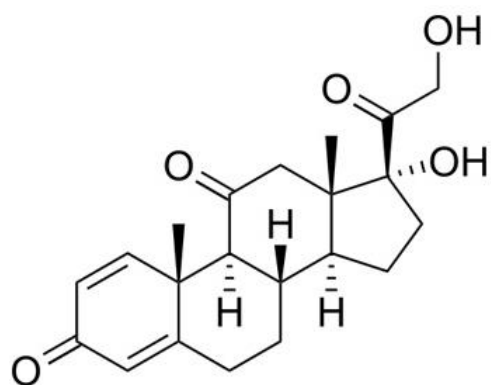


Figura 1.75 Estructura de Prednisona

Cortisona

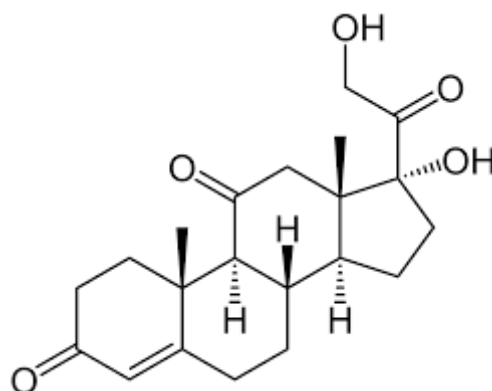


Figura 1.74 Estructura de Cortisona

Dexametasona

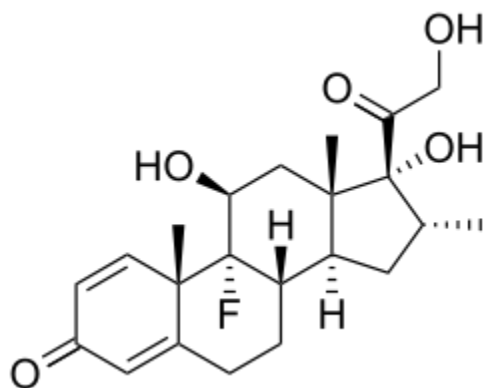


Figura 1.0.102 Estructura de Dexametasona

Las reacciones adversas reportadas al utilizar glucocorticoides en el tratamiento de artritis reumatoide son el síndrome de Cushing (aumento de peso, cara de luna, piel fina, debilidad muscular, huesos frágiles), cataratas, hipertensión, niveles elevados de azúcar en sangre, pérdida acelerada de masa ósea y alteraciones en la función celular[71].

4.- AGENTES BIOLÓGICOS

Estos agentes biológicos atacan a los componentes específicos de la respuesta del sistema inmunológico que contribuyen a la enfermedad mientras que preservan las funciones inmunológicas necesarias dejándolas intactas. Los tratamientos biológicos consisten en anticuerpos monoclonales, citocinas recombinantes y fusiones de receptores de citocinas con otras proteínas, desarrollados por medio de técnicas de biología molecular. Inicialmente los anticuerpos monoclonales eran de origen murino provocando producción de anticuerpos anti-inmunoglobulina de ratón al administrarlos al paciente. Ejemplos de agentes biológicos son[72], [73]:

Infliximab,



Figura 1.156 Estructura de infliximab

Etanercept,

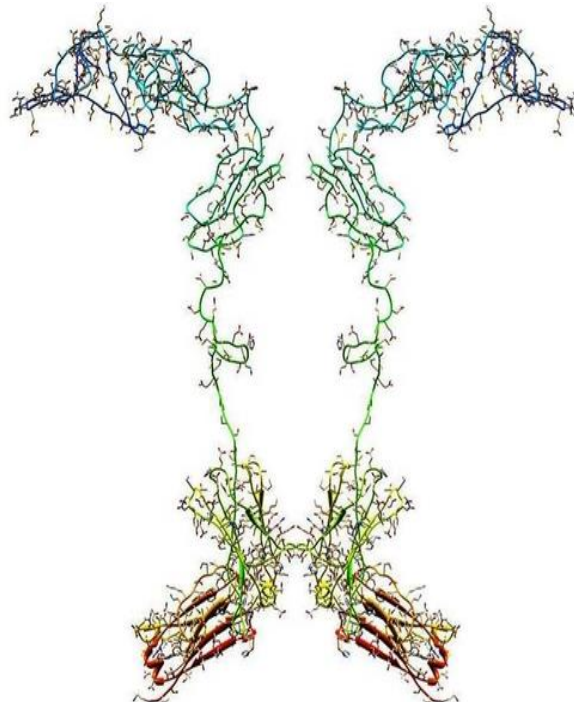


Figura 1.129 Estructura de etanercept

3.- FÁRMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD (FARMES)

Los Fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES) actúan retrasando o deteniendo la inflamación al suprimir la hiperactividad del sistema inmunológico. Esto ayuda a disminuir la inflamación, reducir el daño estructural, reducir la progresión radiográfica de la enfermedad y la sinovitis, de esta manera se preservar al máximo la función articular, actividad de la enfermedad, Sin embargo, el mayor inconveniente es la aparición de toxicidad gastro intestinal, hepática complicaciones hematológicas, perdida de eficacia, provocando que a los dos años de iniciar el tratamiento solo el 50% de los pacientes continúe con él. Ejemplos de los FARMES son:

Metotrexato

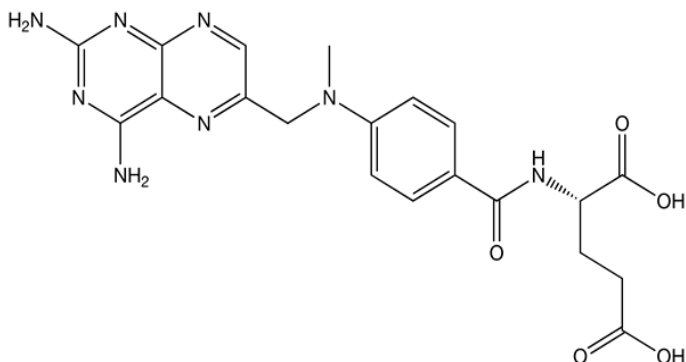


Figura 1. 183 Estructura de metotrexato

Sulfasalazina.

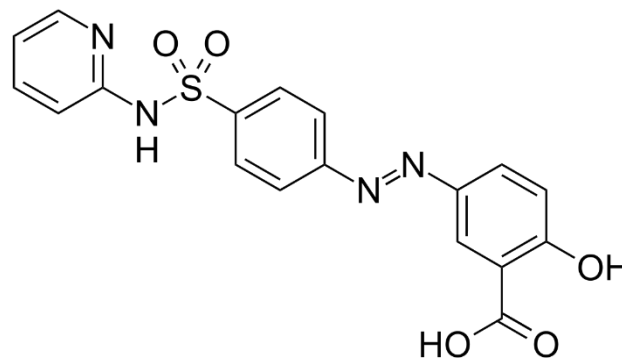


Figura 1.210 Estructura de Sulfasalazina

LEFLUNOMIDA

Leflunomida [N- (4-trifluorometilfenil) -metilsoxazol-4 carboxamida) es un pro-fármaco derivado de isoxazol, que tras ser metabolizado por la pared intestinal, así como también en un primer paso hepático, cambia así metabolito activo teriflunomida, el cual constituye el efecto terapéutico[74]. Se han descrito dos mecanismos de acción para leflunomida *in vitro*, Inhibición de la dihidro-orotato deshidrogenasa e inhibición de la activación del factor nuclear kB. El metabolito activo tiene una alta afinidad por la

enzima dihidro-orotato deshidrogenasa (DHODH), la cual inhibe de manera reversible a urin-monofosfato (UMP, un ribunocleotido pirimidínico, el cual se produce por síntesis novo[75], [76]. Esta enzima es utilizada por los linfocitos activados, proliferando rápidamente las células involucradas en la patogénesis de AR, en donde el bloqueo de la síntesis de pirimidina interrumpe la expansión clonal de los linfocitos T, deteniendo el ciclo celular entre las fases G1 y S[77], [78].

Otro mecanismo de acción es la inhibición de la activación del factor nuclear κ , un potente mediador de varios genes proinflamatorios inducidos por TNF. Este mecanismo inhibe la expresión de moléculas de adhesión celular, lo que facilita las interacciones celulares involucradas en la presentación del antígeno, secreción de citocinas y producción de metaloproteinasas matriciales que degradan el cartílago articular y el hueso[76], [79], [80]. Así mismo se ha demostrado que leflunomida reduce la quimiotaxis de neutrófilos, lo que resulta en una rápida reducción en el número de neutrófilos que se infiltran en la cavidad de la articulación reumatoide[80].

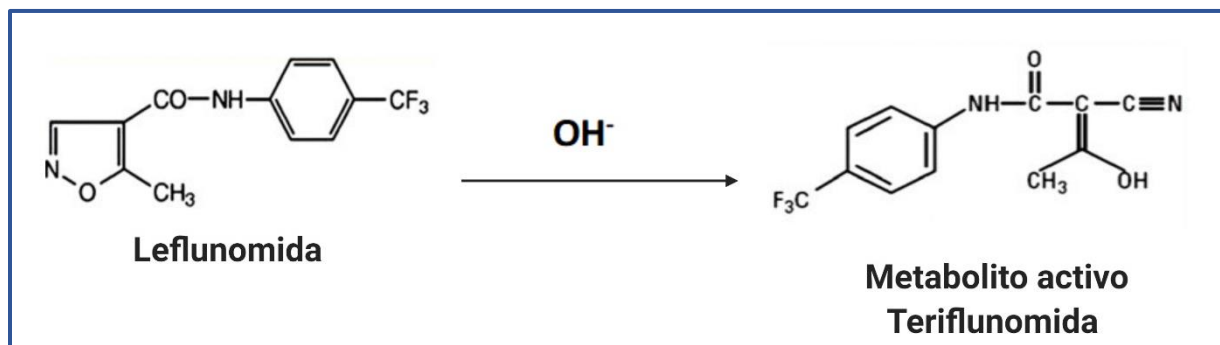


Figura 1.237 Síntesis de leflunomida a su metabolito activo . “Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis,” Clin. Ther., vol. 26, no. 4, pp. 447–59, 2004

6.8 NANOTECNOLOGIA

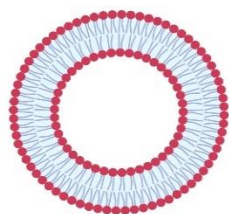
Actualmente la preparación de las formulaciones magistrales como suspensiones, emulsiones, tabletas, tienen ciertas limitaciones como, dosis altas en donde pueden producir reacciones adversas, efecto de primer paso, intolerancia, inestabilidad y

fluctuaciones en los niveles del fármaco en plasma, como también no proporciona un efecto sostenido, es por estas razones que surge la necesidad de la implementación de nuevos sistemas de liberación que cumpla con los requisitos ideales para la administración de fármacos[81]. La nanotecnología tiene una amplia gama de aplicaciones en las ciencias farmacéutica, alimentaria, biología y medicina[82]. Esta disciplina emplea el uso de nanopartículas (NP) con un tamaño entre 10 a 500 nm, que permite la fabricación de dispositivos en la misma escala que las células individuales y las biomoléculas, creando un enfoque único para la obtención de imágenes, la detección, la administración de fármacos y la caracterización de procesos biológicos básico[83][84].

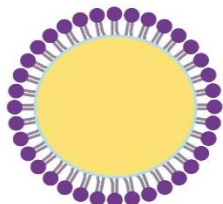
Siendo los más utilizados en la administración de fármacos liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanopartículas lipídicas sólidas [85]. Dentro las ventajas que tiene el uso de nanopartículas como sistemas de administración son[86], [87]:

- a) Mejorar la Biodisponibilidad al mejorar la solubilidad acuosa
- b) Aumentar el tiempo de permanencia en el cuerpo
- c) Aumentar la vida media para el aclaramiento
- d) Aumentar la especificidad para sus receptores
- e) Dirigir fármacos a una ubicación específica en el cuerpo (sitio de acción)

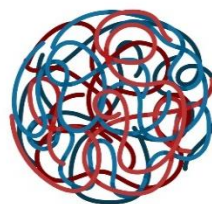
TIPOS DE NANOPARTÍCULAS



Liposoma



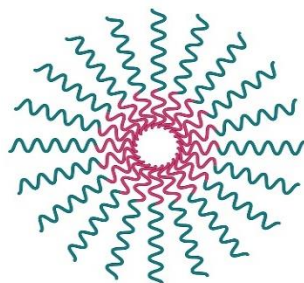
**Nanopartícula lipídica
sólida**



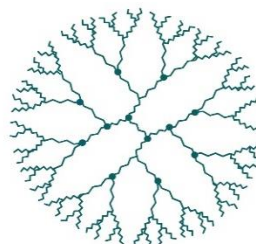
**Nanopartícula
poliméricas**



**Nanopartícula
de Oro**



Micela polimérica



Dendrímero

Figura 1.264 Tipos de nanopartículas. Fuent: n, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," I. Khan, K. Saeed, and I. KhaArab. J. Chem., 2017.

6.8 NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE

Actualmente el tratamiento de artritis reumatoide tiene diferentes propiedades fisicoquímicas, dosis y tiempo de administración, a pesar de los avances en el tratamiento como el progreso de la enfermedad y la prevención de la destrucción articular, aún existen inconvenientes como una administración continua y a largo plazo que, en la mayoría de los casos, utiliza rutas que no favorecen en el tratamiento, como la administración oral y las inyecciones intramusculares, lo que resulta en la acumulación de fármacos extrasinoviales y efectos secundarios sistémicos no deseados, es por estas razones que se necesitan sistemas de nanotransportadores que liberen medicamentos específicamente en el área sinovial inflamada de manera controlada o sostenida para reducir los efectos secundarios y mejorar el cumplimiento del paciente.[88]–[92].

Gracias a su tamaño y a sus propiedades fisicoquímicas y representan un lugar importante en el desarrollo de sistemas de administración y liberación en artritis reumatoide en la estabilidad del fármaco, la capacidad de carga del fármaco y los perfiles de liberación acumulándose pasivamente en los tejidos inflamatorios crónicos a través del fenómeno de permeabilidad y retención mejorada, conjugándose en la superficie con un ligando para unirse activamente a los receptores sobreexpresados por las células dentro de los tejidos inflamatorios crónicos, lo que aumenta la eficacia y reduce los efectos secundarios sistémicos[93]–[95].

NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE

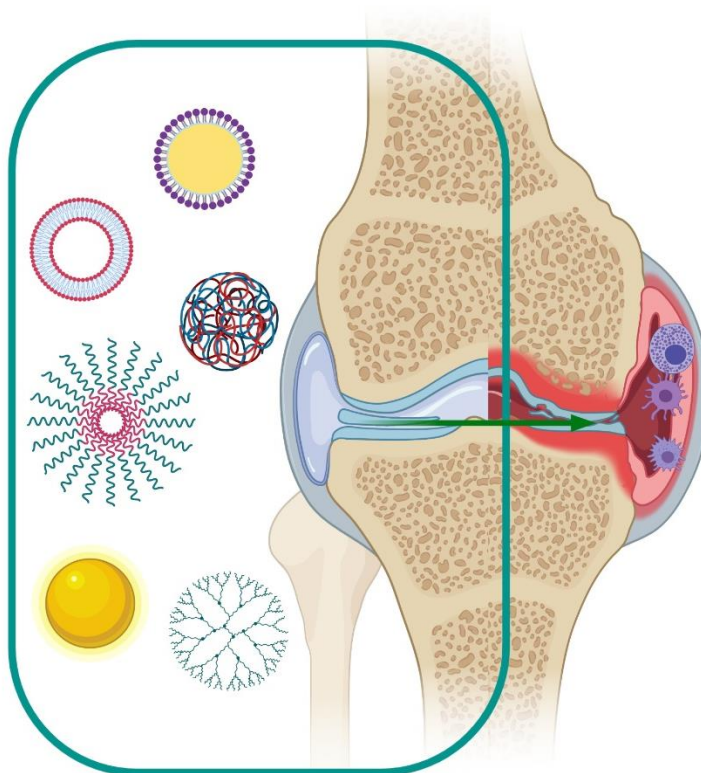


Figura 1.291 Representación de tratamiento artritis reumatoide con nanopartículas permeabilidad y retención mejorada “Engineering nanoparticles for targeting rheumatoid arthritis: Past, present, and future trends,” *Nano Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 4489–4506, 2018.

a) NANOPARTÍCULAS BASADAS EN LIPOSOMAS:

Los liposomas son estructuras vesiculares con un núcleo acuoso rodeado por una bicapa lipídica hidrófoba, creada con fosfolípidos. Los fosfolípidos son ingredientes GRAS lo que quiere decir que son seguros, poseen varias características, como transportar y proteger compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos sin modificación química, minimiza el potencial de efectos adversos, aumentan la biocompatibilidad y la biodegradación. Además, puede ser funcionado fácilmente con materiales para mejorar su estabilidad in vivo o ligandos dirigidos para permitir el suministro preferencial de liposomas. Debido a su superficie Estas ventajas han llevado a la caracterización de liposomas como agentes de transfección de material genético en las células en la investigación de biología. Un ejemplo donde fueron usadas liposomas en el tratamiento de artritis reumatoide, fue en un estudio donde estaba compuesto por PEG y liposomas cargados con prednisolona, donde se observó que persistió en circulación con una vida media de 50 h, y una sola administración sistémica de este formulación llevó a la remisión completa de la inflamación dentro de 2 días, con el efecto durable por 2 semanas.

b) NANOPARTÍCULAS BASADAS EN LIPOSOMAS:

Las nanopartículas basadas en lípidos están compuestas por lípidos fisiológicos; con un núcleo lipídico sólido en el que se encapsula el fármaco lipofílico. Son de naturaleza biocompatible y biodegradable y tienen el potencial de transportar fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos. Tiene la capacidad de controlar la cinética de liberación del fármaco, mayor estabilidad del fármaco y biodisponibilidad del fármaco atrapado, lo que los hace ideales en la entrega segura y efectiva de fármacos antiinflamatorios[96], [97].

En un estudio realizado se formularon nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) inyectables por vía intravenosa cargadas con actarit, un fármaco antirreumático poco soluble en agua. El objetivo de este estudio fue diseñar nanopartículas de focalización pasiva que pudieran mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios como la nefrotoxicidad y los trastornos gastrointestinales comúnmente asociados con la formulación oral de este. Los resultados indicaron que las nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con actarit inyectables eran agentes terapéuticos dirigidos pasivos prometedores para la artritis reumatoide[98].

c) NANOPARTICULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro debido a sus amplias propiedades como biocompatibilidad, síntesis simple, modificación superficial fácil, conjugación versátil con biomoléculas y propiedades ópticas ajustables. Se sabe que las nanopartículas de oro tienen un efecto antiangiogénico al unirse al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) , que desempeña un papel crucial en la patogénesis de la artritis reumatoide (AR). Así mismo en otros estudios realizados se han demostrado que estas nanopartículas son un antioxidante potencial. Ya que pueden reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS), pues inhiben el activador del receptor de la formación de osteoclastos inducida por el factor nuclear κ B ligando (RANKL), lo que resulta en la erosión ósea y del cartílago. Dado que VEGF, osteoclastos y ROS son los principales contribuyentes a la patogénesis de la AR, las nanopartículas de oro se han considerado como un agente terapéutico para el tratamiento de la AR.

-

d) NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Las nanopartículas poliméricas formadas a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables han sido estudiadas como transportadores de fármacos. Estas nanopartículas se formulan a través de co-polímeros de diferente hidrofobicidad, donde se juntan espontáneamente en una formación de micelas núcleo-capa en un entorno acuoso. Pueden encapsular moléculas pequeñas de fármacos hidrófilos e hidrófobos, además de proteínas y macromoléculas de ácidos nucleicos[99]–[102].

6.9 POLÍMEROS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Los polímeros biodegradables pueden ser de origen natural o sintético y degradarse in vivo, ya sea enzimáticamente o no enzimáticamente, con la producir biocompatibles, con baja toxicidad que se eliminan por vías metabólicas normales. La utilización de polímeros en la liberación controlada de medicamentos ha aumentado en la última década. Dentro de la categoría básica de biomateriales utilizados en la administración de fármacos se puede clasificar en términos generales como[103], [104]:

- 1) Polímeros biodegradables sintéticos, que incluyen materiales relativamente hidrófobos como los hidroxiácidos, tales como ácido poliláctico-co-glicólico, PLGA), polianhídridos
- 2) Polímeros naturales, como azúcares complejos (hialuronano, quitosano) e inorgánicos (hidroxiapatita)

6.10 POLI (LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) (PLGA)

El co-polímero de ácido láctico y glicólico (PLGA), es uno de los polímeros biodegradables ampliamente utilizados en la administración de fármacos debido a su comportamiento sensible a estímulos, probados por la FDA son físicamente fuertes y

altamente biocompatibles se ha demostrado que es ideal en la administración de medicamentos, proteínas y otras macromoléculas como el ADN, el ARN y los péptidos. La literatura ha demostrado que la degradación de PLGA puede emplearse en[103]–[106]:

- a) Elaboración de nanopartículas para ser cargadas con fármacos moléculas pequeñas o macromoléculas hidrófilas o hidrófobas.
- b) Protección del fármaco contra la degradación, (v) posibilidad de liberación sostenida.
- c) La posibilidad de modificar las propiedades de la superficie para proporcionar una mejor interacción con materiales biológicos.
- d) Dirigir nanopartículas a órganos o células específicos para la liberación sostenida[107]–[109].

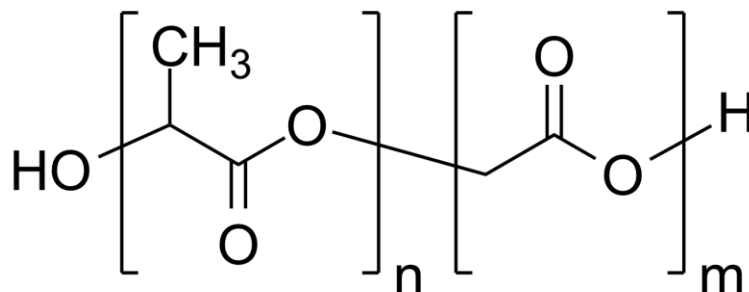


Figura 1.292 Estructura de PLGA. Fuente: “Synthesis and characterization of a poly(lactic-co-glycolic acid) core + poly(N-isopropylacrylamide) shell nanoparticle system.,” *Biomatter*, vol. 2, no. 4, pp. 195–201, 2012.

:

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartícula d PLGA por técnica emulsión
evaporación de solvente
Caracterización de nanopartículas
Cinética de liberación
Viabilidad celular

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVO Y PRINCIPIOS ACTIVOS

- 2, mercaptoetanol, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Acetona, Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Ácido Poli (D,L-láctico-co-glicólico) Resomer® RG 502 H, Evonik Industries Inc. (Darmstadt, Alemania)
- Buffer HEPES, Sigma-Aldrich, (MO, USA)
- Diclorometano, Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Kit MTT Vibrant®, Invitrogen (CA, USA)
- Leflunomida Sigma-Aldrich (USA)
- Línea celular de leucemia monocítica aguda humana THP-1
- Medio RPMI 1640, Invitrogen (CA, USA)
- Metanol, Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Penicilina/Estreptomina 100X, Invitrogen (CA, USA)
- Piruvato de sodio 100X, Invitrogen (CA, USA)
- Poli(D,I-Lactico) Resomer® RG 202 S, Evonik Industries Inc. (Darmstadt, Alemania)

| METODOLOGÍA

- Poli(D,L-láctico-co-glicólico) éster terminal Resomer® RG 502, 503, 504, 505 Evonik Industries Inc. (Darmstadt, Alemania)
- Poli(D,L-láctico-co-glicólico) Resomer® RG 752s, 753s, 756s Evonik Industries Inc. (Darmstadt, Alemania)
- Polivinil alcohol (PVA) hidrolizado 87-90%, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Solución de azul tripano al 0,4%, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Suero bovino fetal, Invitrogen (CA, USA)

EQUIPOS

- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc. (USA)
- Agitador magnético multistirrer 6, Velp Scientifica, (USA)
- Balanza analítica AA-200 Denver Instrument Company, (USA)
- Procesador de ultrasónico VCX 130, Sonics Vibra-Cell™, Sonics & Materials Inc, (USA)
- Centrífuga Sorvall™, Thermo Scientific™ RC 6 Plus, (Alemania)
- Rotor de ángulo fijo Fiberlite™ F13-14 x 50 cy, Thermo Scientific™, (Alemania)
- UV Cary® 50 UV-Vis spectrophotometer, Varian Inc, USA
- Equipo Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd. (Malvern, UK)
- Microscopio de luz invertida, Nikon. (Japón)
- Sanyo MCO-19AIC(UV) CO₂ Incubator

MATERIALES

- Tubos falco estériles de 50 ml
- Probeta volumétrica de 10 y 20 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml
- Membrana Durapore PVDF, 0.45 µm, 25mm (Merckmillipore, Alemania)

| METODOLOGÍA

- Membrana Durapore ésteres mezclados de celulosa, 1.2 μm , 25 mm (Merckmilipore, Alemania)
- Membrana PVDF 0.22 μ (Merckmilipore, Alemania)
- Spectrum™ Tubos de membrana de diálisis Spectra/Por™ 1 RC con MWCO de 12000 a 14000 daltons (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Jeringas desechables NIPRO de 1 y 5 mL
- Frascos de cultivo 25 ml (T 25) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Frascos de cultivo 75 ml (T 75) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Pipetas pasteur plásticas estériles de 3 mL
- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10 mL

2.2 SINTESIS DE NANOPARTICULA DE POLI (D,L-LÁCTICO-CO-GLICOLICO) ESTER TERMINAL(PLGA)

2.2.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

La síntesis de nanopartículas de POLI (D,L-LACTICO-CO-GLICOLICO) ESTER TERMINAL (PLGA), se basa en la técnica emulsión evaporación de solvente, el cual consiste en formar una emulsión a partir de dos fases inmiscibles. Una fase continua que contiene un emulgente para la estabilización de la emulsión y una fase dispersa que contiene el polímero y el principio activo en un disolvente orgánico volátil para la disolución de esto y destinado a la formación de una matriz. Mediante la aplicación de una fuente de energía por ultrasonido forma pequeñas gotas de la fase dispersa[110], [111]. Formada la emulsión, el solvente orgánico es evaporado mediante agitación continua a temperatura ambiente. La evaporación del solvente orgánico es seguida por la precipitación del polímero atrapando el fármaco, permitiendo la formación de nanopartículas, las nanopartículas se recuperan por ultracentrifugación[110], [111].

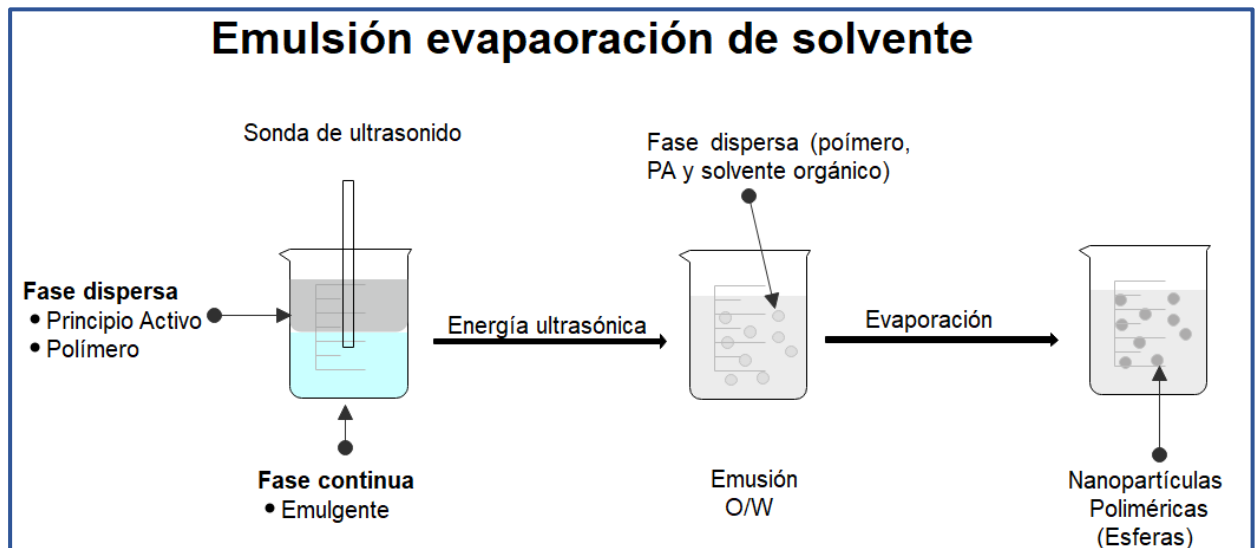


Figura 2.1 Técnica de Emulsión evaporación solvente. Fuente: Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas (Polymeric nanoparticles : technologie and pharmaceutical applications),” Rev. Farmacol. Chile, vol. 7, no. 2, pp. 7–16, 2014.

| SINTESIS DE NANOPARTICULA DE POLI (D,L-LACTICO-CO-GLICOLICO) ESTER TERMINAL(PLGA)

La síntesis de las nanopartículas de PLGA éster terminal, se llevó acorde al procedimiento descrito en [112]

En un tubo falco de 50 ml se disolvió 5 mg de leflunomida (Sigma aldrich, USA) en 2.5 ml de acetona, de la solución resultante se mezclaron 50 mg de PLGA (Resomer RG 756 S, Germany) disueltos en 2.5 ml de diclorometano siendo esta la fase dispersa, posteriormente la solución dispersa se emulsiono previamente en 20 ml de solución continua de polivinil alcohol (PVA) (Polivinil alcohol, 87-90% hidrolizado, Sigma Aldrich USA) al 0.25% p/v agitándola durante 3 minutos a 3200 rpm en Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., EE. UU). Posteriormente la emulsión fue sonicada con una sonda de ultrasonido (Sonicis & Materials Inc, USA) en un baño de hielo, durante 3 minutos y a una amplitud de 80%. A continuación, la fase dispersa fue evaporada a temperatura ambiente bajo campana, en agitación suave en agitador magnético (Agitador magnético multistirrer 6, VELP Scientifica, España) a 700 rpm durante 3 horas, la suspensión de nanopartículas se completó a un peso de 20 g con agua mili Q. De la suspensión se tomaron en 10 μ l de la suspensión de nanopartículas y colocado en un portaobjeto para ser observado en microscopio óptico a 40x (Zeiss Primo Star, Canon EOS REBEL T3, Germany) para identificar presencia de cristales de leflunomida fuera de las nanopartículas, las cual es indicativo de baja encapsulación. Teniendo en cuenta que el principio activo es lipófilo la baja encapsulación se manifiesta en forma de cristales en la fase continua.

Para eliminación de cristales la suspensión de membranas fue filtrada con membrana 1.2 μ M PVDF (membrana HV (Durapore) EM éster de celulosa, de poro, 25 mm de diámetro de poro), y nuevamente fue observada bajo microscopio a 40x para verificación de eliminación de cristales, este procedimiento fue realizado antes de la caracterización.

Tabla 2.1 Condiciones óptimas para formulación de nanopartículas.

Condiciones optimas	
PLGA 756 S (0,70-1,00 dL/g)	50 mg
Leflunomida	15 mg
PVA solución 0.25%	20 mL

2.2.2 EXTRACCIÓN DE LEFLUNOMIDA A PARTIR DE LAS NANOPARTÍCULAS

Para la extracción de leflunomida, 15 ml de la solución de nanopartículas fueron centrifugadas (Centrífuga Sorvall™, Thermo Scientific™ RC 6 Plus, (Alemania), Rotor de ángulo fijo Fiberlite™ F13-14 x 50 cy, Thermo Scientific™, Alemania) a 11,000 rpm por 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido con Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., EE. UU) en 6 ml de metanol. Dado que el metanol precipita con el PLGA, debido a que este es insoluble en metanol, la solución es pasada a un nuevo tubo falcón y centrifugado nuevamente a 13,000 rpm por 30 minutos a una temperatura de 4°C, del sobrenadante 100 µl del sobrenadante reconstituyendo con 4 ml de metanol y filtrado a través de una membrana PVDF con tamaño de poro de 0.22 µm.

2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LEFLUNOMIDA

Para la cuantificación de leflunomida, fue cuantificada por el método espectrómetro UV/Vis el cual; fue validado. Para la cuantificación fue utilizado un espectrofotómetro UV/Vis (UV Cary® 50 UV-Vis spectrophotometer, Varian Inc, USA) que cuenta con dos detectores de diodos de silicón, y fue analizado a una longitud de onda de 261 nm, siendo leído un 1ml de la muestra previamente filtrada.

| LINEALIDAD

La carga de fármaco y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas cargadas con leflunomida se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\%EE = \frac{CTN}{CTI} \times 100$$

Donde, EE es la eficiencia de encapsulación, CTN es la cantidad total de fármaco en las nanopartículas y CTI es la cantidad teórica añadida inicialmente.

La carga del fármaco se refiere a la proporción de fármaco que hay en cada partícula, se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%CF = \frac{CFN}{CTI} \times 100$$

Donde CF es la carga de fármaco y MN es la masa de nanopartículas

2.3 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LEFLUNOMIDA

Se preparó una solución madre de leflunomida 0.10 mg/mL en metanol, de la cual se obtuvieron 6 diluciones de leflunomida en niveles de concentración creciente, 0.14, 0.01, 0.008, 0.004, 0.002 mg/ml, las muestras fueron analizadas mediante espectrofotométrica UV-Vis y realizando lecturas por triplicado. Se obtuvo una curva de calibración, donde fueron trazadas las lecturas de absorbancia frente las concentraciones correspondientes. Se determinó la linealidad mediante el cálculo de la pendiente de la curva de calibración y el valor del coeficiente de determinación (r^2).

Tabla 2.1 Condiciones para curva de calibración.

Blanco	Metanol
Detector	Ultravioleta
Celdas	Cuarzo
Volumen	1 ml
Longitud de onda	261 nm

2.4 CARACTERIZACIÓN DE NANOPÁRTICULAS DE PLGA

2.4.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POLIDISPERSIDAD

La distribución del tamaño de partícula e índice de polidispersidad fue determinar por dispersión dinámica de luz empleando que estudia la distribución del tamaño y la estabilidad coloidal de las nanopartículas, utilizando Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK) a una temperatura de 25 °C y empleando una dilución de 50 μ l de la suspensión de nanopartículas resuspendidas en 950 μ l de agua Milli-Q, las lecturas fueron realizadas por triplicado. El índice de polidispersidad es un parámetro que se obtiene del tamaño de partícula que provee información sobre las dispersidad de la muestra[113].

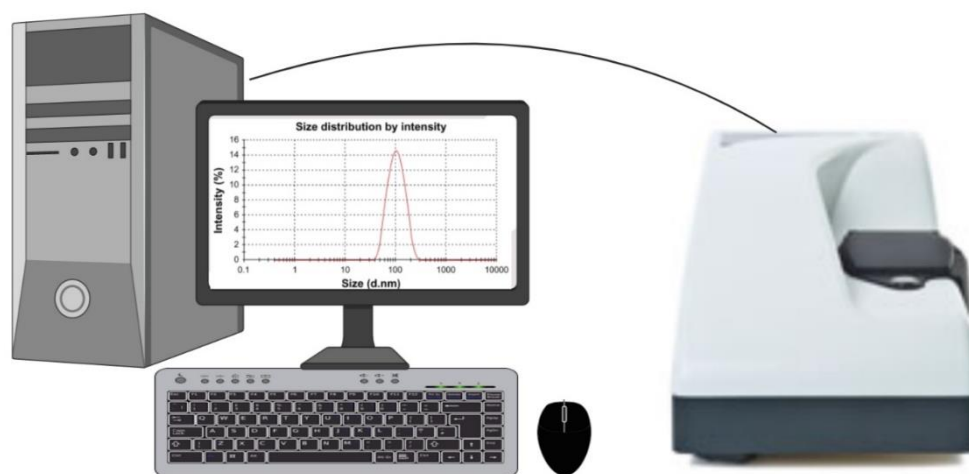


Figura 2.2 Dispersión dinámica de Luz (DLS). Fuente: “Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2013.

2.5 POTENCIAL ZETA

El potencial zeta determina la estabilidad de las nanopartículas y la morfología de la superficie, utilizando Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK). basado en la dispersión de luz a 25 ° C, tomando una dilución de 1/100 (v / v) en agua purificada. Los valores reportados representan por triplicado[114].

| CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(LÁCTICO-COGLICÓLICO) ESTER TERMINAL

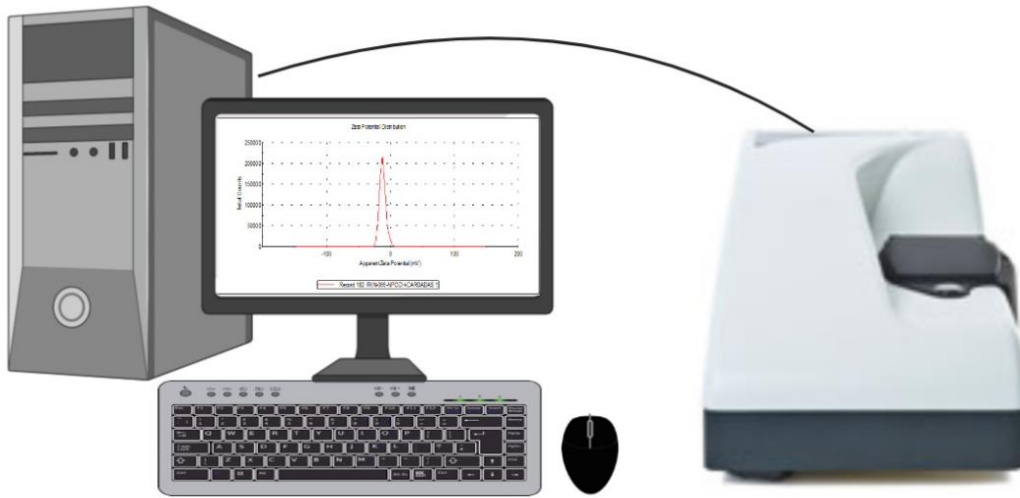


Figura 2.10 Potencial zeta. Fuente: “Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement,” *Particuology*, vol. 6, no. 2, pp. 112–115, 2008.

2.6 ANÁLISIS POR INFRARROJO (FTIR-ATR)

Utilizando la técnica de espectroscópico infrarrojo se buscó saber si existía una interacción entre el principio activo y el PLGA, esta técnica consiste en un espectro de absorción o reflexión IR del espectro magnético, permite la identificación de compuestos químicos a través de la determinación de la frecuencia a la que los distintos grupos funcionales presenta bandas de absorción. Para ello se usó espectrómetro Nicolet iS5 FT-IR, mediante una celda de reflectancia atenuada (ATR) con punta de diamante ID 5, (Thermo Scientific. USA), primeramente, se limpió la celda con etanol, y posteriormente e corrió la línea base y muestra colocada en la celda ATR, girando la torre de presión hasta ejerce presión contra la muestra, una vez puesto la muestra en en la celda se procedió a realizar las lecturas por 16 escaneos y con un rango espectral de numero de onda de 700 a 4000 cm^{-1} [115]

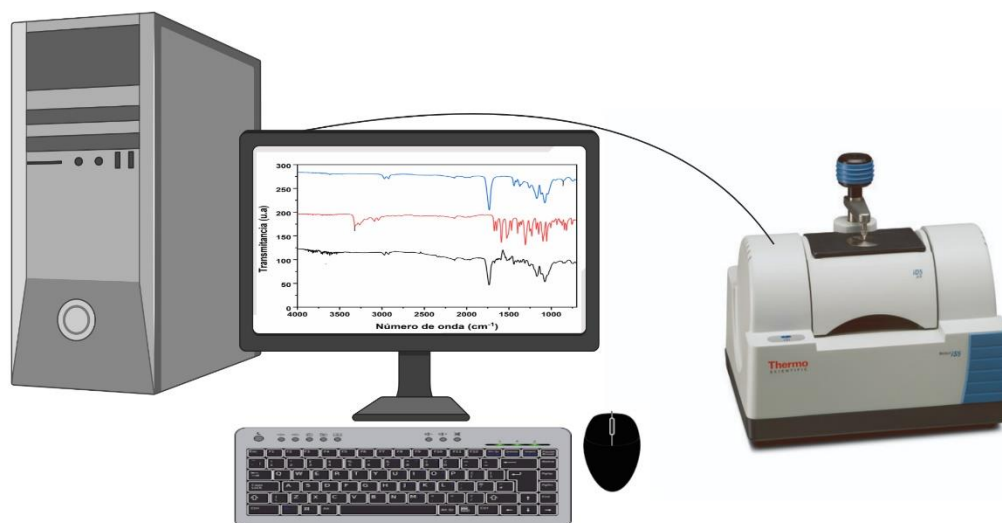


Figura 2.11 Infrarrojo (FTIR-ATR). Fuente: “Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018.

2.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión de las formulaciones se realizó con un sistema JEM-3200FS JEOL, operando a un voltaje de aceleración de 20 kV. Previamente las nanopartículas se les realizaron lavado par ale eliminación de PVA y no existieran interferencia, posteriormente fueron recubiertas con una capa de oro de aproximadamente 150 Å de espesor, utilizando un revestidor de pulverización catódica Edwards S 150[116].

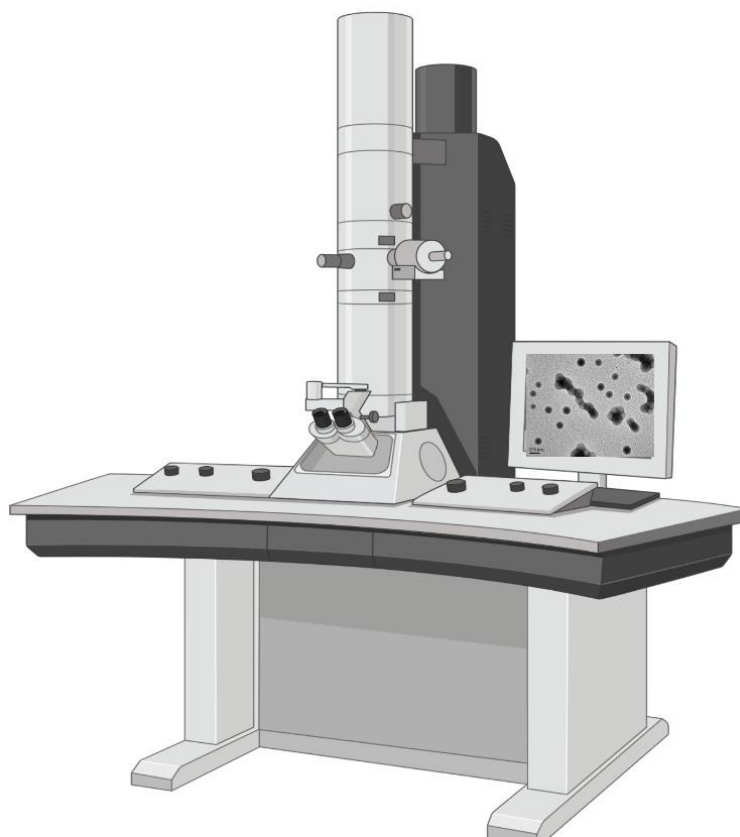


Figura 2.12 Microscopia de transmisión de barrido. Fuente: Transmission Electron Microscopy (TEM). Elsevier B.V., 2017.

2.8 CINETICA DE LIBERACIÓN INVITRO

La cinética de la liberación *in vitro* se realizó a partir de las nanopartículas cargadas con leflunomida. Se tomaron 20.0 g rpm de suspensión de nanopartículas centrifugados a 13,000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C. Luego de remover el sobrenadante, las nanopartículas fueron resuspendidas en 5 mL de HEPES buffer salino 10 mM, pH 7.4. Las nanopartículas se añadieron en una membrana de diálisis de 12000 a 14000 daltons (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). En un frasco de 250 ml se añadieron 200 ml de HEPES buffer a un pH 7.4 y 5 ml de nanopartículas cargadas, en otra membrana para leflunomida con los mismos volúmenes. Posteriormente las muestras se agitaron 100 rpm manteniendo una temperatura constante de 37°C, a diferentes intervalos de tiempo correspondientes, se recolectó cada muestra y reponiendo volumen con 2 ml de HEPES buffer salino 10 mM, pH 7.4 y cuantificado directamente por espectrofotometría UV (UV Cary® 50 UV-Vis spectrophotometer, Varian Inc, USA) a una λ 261 nm. La cinética de la liberación *in vitro* a partir de las nanopartículas cargadas con leflunomida fueron comparadas contra la incorporación de una cantidad equivalente de fármaco libre, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación[117], [118]

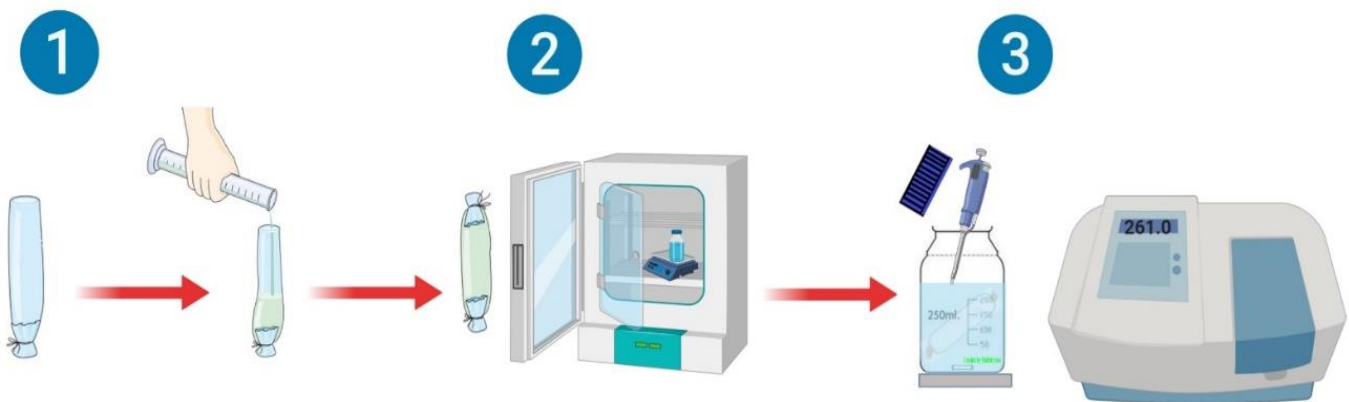


Figura 2.13 Cinética de liberación. Fuente: “Development, characterization and *in vitro* evaluation of biodegradable rhein-loaded microparticles for treatment of osteoarthritis,” Eur. J. Pharm. Sci., vol. 96, pp. 390–397, 2017.

2.9 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA POR ENSAYO MTT

La determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-bromuro difeniltetrazolio) (MTT) en la línea celular THP-1. Este es un ensayo colorimétrico cuantifica el metabolismo celular a través de la reducción del tetrazolio a formazn púrpura por la acción de la enzima oxidorreductasa dependiente de NAD(P)H[119], [120].

La evaluación de la viabilidad celular se realizó utilizando la línea celular THP-1 (monocitos de leucemia mieloide aguda humana), diferenciada a macrófagos. Estas fueron seleccionadas, porque son las células candidatas a ser utilizadas en modelos de inflamación. Las células fueron incubadas en condiciones estandarizadas, a 37 °C y en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ (Sanyo MCO-19AIC UV) CO₂ Incubator), en medio RPMI1640 (Invitrogen,CA, USA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10% (Invitrogen (CA, USA), una mezcla de antibióticos penicilina (100 IU/mL) y estreptomycin (Invitrogen CA, USA), 1 ml de glucosa, 1 ml de HEPES, 1 ml de piruvato de sodio y 100 µl de 2-mercaptoetanol[119], [120].

Para estimar el número de células en un eppendorf se añadieron 50 µl de suspensión de células y 50µl de azul de tripano, observadas con una cámara Neubauer, utilizando un microscopio óptico (Microscopio HM-LUX3 Niko, Japón) vista con objetivo 10x, para cuantificación para ser sembradas. Para realizar el ensayo de MTT se sembraron 1 x 10⁵ células por pocillo, en una placa de cultivo de 96 pocillos, se diferenciaron a macrófagos con 200 ng/mL de acetato miristato de forbol (PMA), en medio RPMI suplementado durante 24 horas.[119], [120]

Utilizando un microscopio invertido se observó morfología (Microscopio de luz invertida Nikon TMS, Japón). Posteriormente las células fueron expuestas a nanopartículas cargadas con leflunomida, nanopartículas blancas en un rango de concentración de 12.5 a 200 µM nel caso de las nanopartículas, para leflunomida libre fue en un rango

| EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

de concentración de 50 a 100 μM fueron incubadas a una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 (Sanyo MCO-19AIC(UV) CO_2 Incubator) durante 24 horas [119], [120].

Posteriormente se eliminó el medio de la placa y reemplazado con 100 μl de medio fresco, se procedió a exponer a las células a 10 μl de reactivo MTT durante 2 horas, hasta el completar el desarrollo de la reacción, por último, se agregó dodecilsulfato sódico (SDS) (0.1 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 12 horas para lograr la disolución de los cristales de formazán reducido. Finalmente se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas, posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia en la muestra}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA

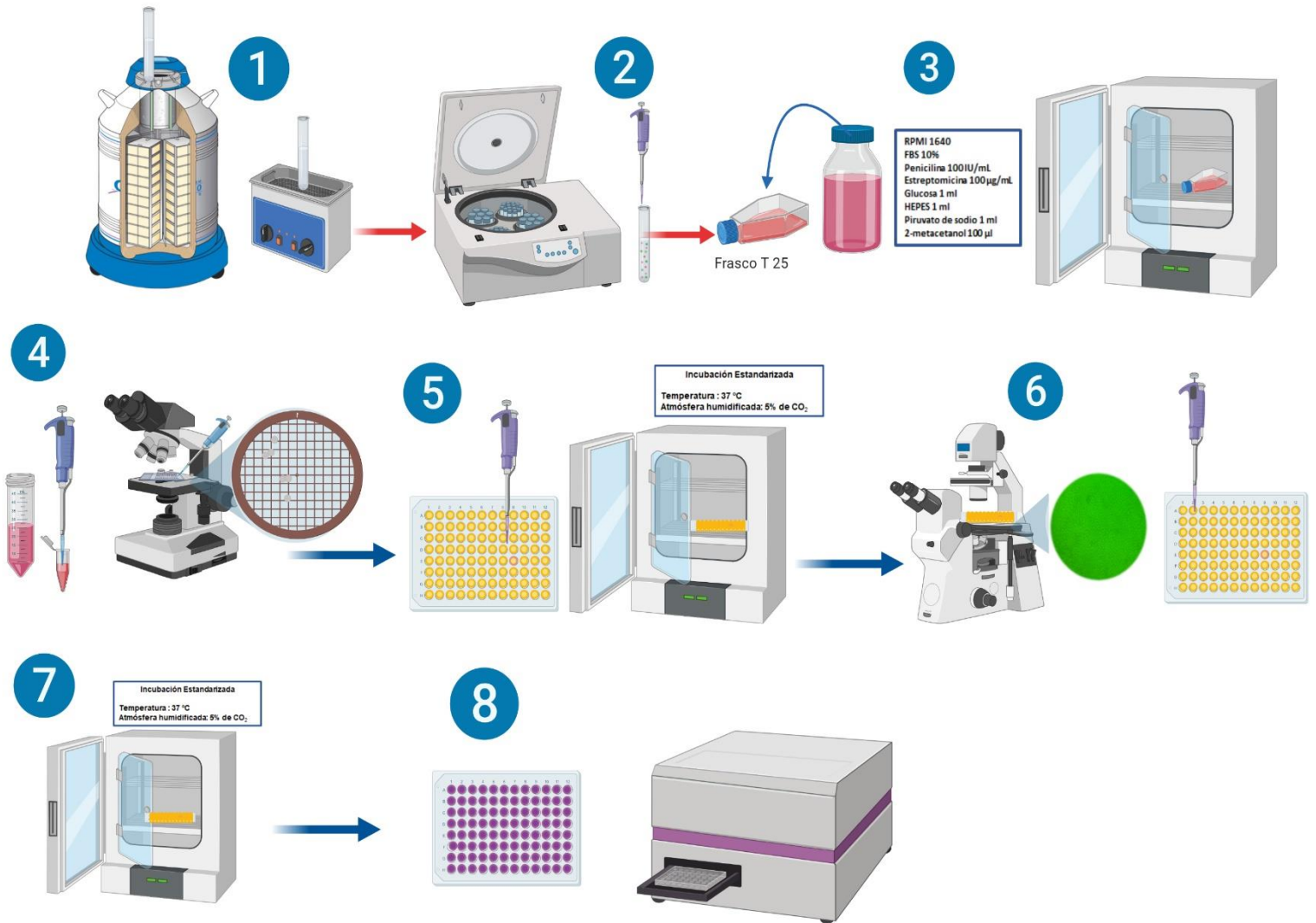


Figura 2.7 Evaluación de viabilidad celular. Fuente: “Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154),” Prod. Inf. pp. 4–6, 2002.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la dosis inicial de leflunomida
Efecto del grupo terminal sobre las características de las nanopartículas
Efecto de la fracción láctica sobre las características de las nanopartículas
Efecto de la viscosidad sobre las características de las nanopartículas
Dispersión dinámica de luz
Microscopia de transmisión de Barrido
Infrarrojo FTIR (ATR)
Cinética de liberación
Evaluación de viabilidad celular

Se sintetizaron nanopartículas poliméricas utilizando como polímero poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con leflunomida, realizadas mediante la técnica emulsión evaporación de solventes, evaluándose los valores óptimos de formulación, basa en la influencia de la composición polimérica, evaluando el contenido de fracción láctica el efecto del grupo terminal viscosidades (50:50,75:25, 100%) en nanopartículas cargadas y no cargadas, donde se escogió la mejor formulación, efecto de la fracción láctica y efecto del contenido de grupo terminal. Todas las nanopartículas elaboradas estuvieron sujetas a caracterización de diámetro medio de nanopartícula, índice de polidispersidad, potencial zeta, porcentaje de carga y eficiencia de encapsulación. De la formulación optima fueron caracterizadas con TEM, IR-FT y DSC. (preguntar si debo mencionar que se realizó cinética de liberación y viabilidad).

3.1 EFECTO INICIAL DE LEFLUNOMIDA EN LA CARGA Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Con la finalidad de garantizar una carga adecuada de leflunomida se investigó el efecto de la dosis inicial de leflunomida sobre la carga, esto manteniendo el tipo de polímero (PLGA 50:50). La dosis inicial se varió entre 5 mg a 20 mg justo por debajo del límite de saturación. Los resultados de la eficiencia de encapsulación y porcentaje de carga, tamaño de partícula y potencial zeta se midieron y se presentan en la Tabla 3.1

Tabla 3.1 Efecto de la dosis inicial de leflunomida.

Dosis (mg)	PLGA	Eficiencia de Encapsulación ± SD (%)	Carga de fármaco en NP ± SD (mg/100 mg polímero)	Tamaño de nanopartícula Media ± ancho (nm)	PDI	Potencial (mV)
5	502 S	26.21 ± 0.47	2.65 ± 0.01	203 ± 82	0.13	-16.20
10	502 S	17.93 ± 0.44	3.66 ± 0.05	213 ± 83	0.12	-17.80
15	502 S	12.54 ± 0.26	3.77 ± 0.07	224 ± 72	0.08	-14.03
20	502 S	6.66 ± 3.01	2.33 ± 0.63	206 ± 53	0.05	-14.10

*n=3

* Resomer 502 S PLGA 50:50 éster terminal

En la tabla 3.1 se muestra que la carga del fármaco aumenta a medida que la masa inicial de leflunomida de 5 mg con carga de fármaco de 2.65 ±0.01de masa inicial hasta que alcanza una masa inicial de 20 mg donde se observa

una disminución en la carga del fármaco de 2.65 ± 0.63 de leflunomida, según la literatura[121] esto se debe a que existe una competencia de la dispersión molecular del fármaco entre la dispersión del fármaco dentro de la matriz polimérica y la fuerza de cristalización. Inicialmente, la carga de leflunomida aumenta hasta que la matriz está saturada con el principio activo (peso inicial de 20 mg)[121], [122]. Posteriormente, a medida que va creciendo el número de cristales, la cristalización se convierte en la fuerza impulsadora y contribuye a reducir la cantidad de fármaco encapsulado, esto se debe al ser eliminando el solvente orgánico completamente, la cantidad de fármaco en la fase acuosa aumenta y, por lo tanto, aumenta la pérdida de fármaco en la fase orgánica, reduciendo la eficiencia de encapsulación este fenómeno está descrito en la literatura[56].

Con los resultados obtenidos se sugiere que la mayor carga de fármaco se obtiene a partir de la dosis inicial de 15 mg, aunque se puede observar que la dosis de 5 mg existe una mayor eficiencia de encapsulación pero un carga más baja, por lo que el tratamiento óptimo es el de la masa inicial de 15 mg, que ya que en estudios realizados se ha demostrado que para tener un sistema de administración exitoso es necesario tener una carga de fármaco, esto a que se reduce la cantidad de nanopartículas para la administración[123]. Así mismo no hubo cambios significativos en los potenciales Z estuvieron entre -14mV y -17 mV este parámetro nos indica la estabilidad de la nanopartícula en condiciones específicas. De acuerdo a la literatura, este valor debería ser aproximadamente ± 30 mV para que no se aglomeren las nanopartículas, y por ende sean más estables[124].

/ EFECTO INICIAL DE LEFLUNOMIDA EN LA CARGA Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

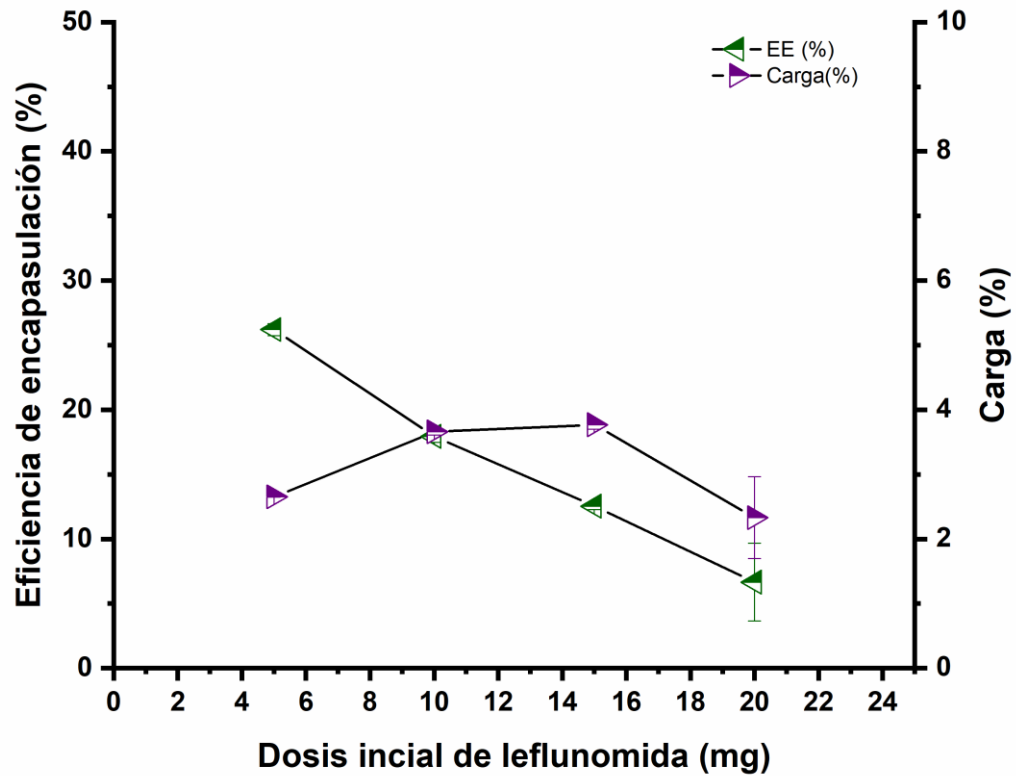


Figura 3.1 Dosis inicial de Leflunomida

Para cada lote de formulación, se calcularon los parámetros mencionados anteriormente y los resultados se presentan en la Figura 3.1. A partir del gráfico, se puede observar que la carga de leflunomida de las nanopartículas está influenciada positivamente por la cantidad inicial de fármaco en la formulación, por consecuencia se ve afecta la eficiencia de encapsulación. Al superponer ambas curvas, se obtiene el mejor resultado con una cantidad inicial de 15 mg.

| EFECTO DEL GRUPO TERMINAL DE PLGA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTICULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

3.2 EFECTO DEL GRUPO TERMINAL DE PLGA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTICULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

. En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de la influencia del grupo terminal sobre las características de las nanopartículas, manteniendo la viscosidad constante. En estudios realizados se demuestra que el grupo terminal de PLGA puede influir en el porcentaje de cargas y eficiencia de encapsulación en principios activo lipofílico es el grupo terminal de PLGA las características de las nanopartículas es el grupo terminal del PLGA, Manteniendo constante el tipo de polímero (PLGA 50:50) y la viscosidad, se investigó el efecto del grupo terminal sobre las características de las nanopartículas cargadas con PLGA grupo terminal de alquil éster y PLGA grupo terminal de ácido carboxílico libre como se puede observar a pesar que el porcentaje de carga existe un ligero aumento al utilizar el PLGA con porcentaje de 3.77% en comparación con el ácido que fue de 3.04%, es por esta razón que se eligió la utilización de Ester terminal[125].

Tabla 3.2 Efecto del grupo terminal de PLGA sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.

Polímero	Grupo Terminal	Viscosidad (dL/g)	Eficiencia de Encapsulación \pm SD (%)	Carga de fármaco en NP \pm SD (mg/100 mg polímero)	Tamaño de nanopartícula Media \pm ancho (nm)	PDI	Potencial (mV)
RG 502 S	Ester	0.16-0.24	12.54 \pm 0.26	3.77 \pm 0.07	224 \pm 72	0.08	-16.20
RG 502 H	Ácido	0.16-0.24	10.09 \pm 0.13	3.04 \pm 0.05	213 \pm 83	0.12	-17.80

*n=3

* Resomer 502 PLGA 50:50 éster terminal

| EFECTO DEL CONTENIDO LÁCTICO DE PLGA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

3.3 EFECTO DEL CONTENIDO LÁCTICO DE PLGA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

Se evaluó el efecto de la fracción láctica del polímero sobre las características de las nanopartículas, variando los porcentajes entre 100% a 75%, manteniendo la misma viscosidad, analizándose los parámetros de eficiencia de encapsulación, carga del fármaco, tamaño de partícula y potencial zeta los resultados se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Efecto de la fracción láctica de PLGA sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.

Polímero	Láctico (%)	Viscosidad (dL/g)	Eficiencia de Encapsulación \pm SD (%)	Carga de fármaco en NP \pm SD (mg/100 mg polímero)	Tamaño de nanopartícula Media \pm ancho (nm)	PDI	Potencial (mV)
RG 202 S	100	0.16-0.24	14.42 \pm 1.08	4.33 \pm 0.31	215 \pm 51	0.09	-12.53
RG 752 S	75	0.16-0.24	14.58 \pm 0.87	4.39 \pm 0.28	218 \pm 51	0.12	-13.80
RG 502 S	50	0.16-0.24	12.54 \pm 0.26	3.77 \pm 0.07	224 \pm 72	0.08	-16.20

*n=3

*Resomer RG 202 S, RG 752 S, RG 502

La eficiencia de encapsulación más alta fue de utilizando un porcentaje de fracción láctica de 75%, La eficiencia de encapsulación formuladas con PLGA 75:25 y PLGA 50:50 no fue muy significativa, a pesar de la diferencia en la fracción láctica, una razón puede ser que el cambio en la fracción láctica del polímero del 75% al 50% no afecte

| EFECTO DEL CONTENIDO LÁCTICO DE PLGA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

Significativamente las propiedades de las nanopartículas utilizando las mismas viscosidades. A pesar de que entre PLGA 75:25 y PLA 100 no existe una diferencia significativa PLA puede influir en la eficiencia de encapsulación como en la cinética de liberación, dado que con una PLGA 75:25 es más hidrófilo con una degradación más rápida que carece de ácido láctico, de acuerdo con la literatura, existen interacciones entre los grupos hidroxilo en el ácido glicólico y los grupos hidroxilos y carbonilos en la nanopartícula aumentando la hidrofobicidad[126], [127].

Se puede observar que al utilizar PLGA 75:25 PLGA 50:50, y PLA en cuanto el tamaño de partículas que fue 218 ± 51 , 218 ± 51 y 2241 ± 72 y una potencial zeta de -12.53 mV, -13.80 mV y -16.20 mV de las nanopartículas no existió una variabilidad significativa a pesar de la diferencia en su contenido láctico. Estos resultados indica que el tipo de porcentaje de fracción láctica no influyo tanto tamaño como la potencial zeta. La similitud entre el tamaño de partícula y potencial zeta, de acuerdo con la literatura[128] puede atribuirse al hecho que ambos polímeros utilizados son biodegradables pertenecientes a la misma clase de polímeros biodegradable que exhiben la misma viscosidad (0.16-0.24 dl/g)

| EFECTO DE LA VISCOSIDAD DEL PLGA 75:25 SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

3.4 EFECTO DE LA VISCOSIDAD DEL PLGA 75:25 SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

Manteniendo el porcentaje de fracción láctica del 75% evaluando el efecto de la viscosidad inherente del polímero con las siguientes viscosidades 0.16–0.24, 0.32–0.44 y 0.70–1.1 dL/g, en donde fue analizado la viscosidad, eficiencia de encapsulación, carga de fármaco, tamaño de partícula y potencial zeta, los resultados se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Efecto de la viscosidad del PLGA 75:25 sobre las características de las nanopartículas cargadas con leflunomida.

Polímero	Láctico (%)	Viscosidad (dL/g)	Eficiencia de Encapsulación ± SD (%)	Carga de fármaco en NP ± SD (mg/100 mg polímero)	Tamaño de nanopartícula Media ± ancho (nm)	PDI	Potencial (mV)
RG 752 S	75	0.16-0.24	12.54 ± 0.26	3.77 ± 0.07	200 ± 57	0.08	-16.20
RG 753 S	75	0.32-0.44	12.62 ± 0.66	3.83 ± 0.19	217 ± 59	0.05	-17.63
RG 756 S	75	0.70-1.00	14.85 ± 0.33	4.80 ± 0.21	224 ± 72	0.04	-18.60

*n=3

*Utilizando RG 752 S, RG 753 S, RG 756 S

Se pudo notar que en cuanto eficiencia de encapsulación y porcentaje PLGA con mayor viscosidad (0.7-1.00 dL/g) RG 756 S mostro mayor porcentaje, en comparación con PLGA con viscosidad de (0.16-0.24 dl/g) RG 752S y PLGA con viscosidad (0.32 -0.44 dl/g), en la literatura se describe que la utilización de viscosidades más alta tiende a influir

| LINEALIDAD

en la eficiencia de encapsulación, esto se debe a que repercute en la formación de la emulsión durante la síntesis de las nanopartículas y por ende en la estabilidad de la fase dispersa favoreciendo la eficiencia de encapsulación[129], [130]. También se ha informado que la composición de PLGA de 75:25 tiene una mayor eficiencia de carga que la composición de PLGA de 50:50 para partículas cargadas, por lo tanto, la formulación optima fue con el polímero RG 756 S con una viscosidad de 0.70-1.00 dl/g con una fracción de láctico: glicólico de 75:25[129]–[131]

Al aumentar la viscosidad de la polímero, se pudo notar un ligero aumento en el tamaño de partículas, esto puede ocurrir debido a los cambios en la viscosidad de la fase dispersa eso en base a[131].. El potencial zeta al igual que el tamaño de partícula tuvo un ligero cambio dependiente de la viscosidad, según se menciona en la literatura es debido a que la mayor viscosidad exhibe mas grupo carboxílico en su superficie[131].

3.5 LINEALIDAD

Se preparó una curva de calibración con concentraciones de leflunomida de 0.14, 0.01, 0.008, 0.004, 0.002 mg/ml. En la Figura 3.2 se puede observar que la regresión lineal entre la concentración de las soluciones y la absorbancia, presentando un coeficiente de correlación r^2 de 0.9986 que indica una linealidad, por lo que se puede considerar que existe una correlación positiva entre las variables absorbancia y concentración, la curva de calibración se realizó mediante la literatura descrita en[132].

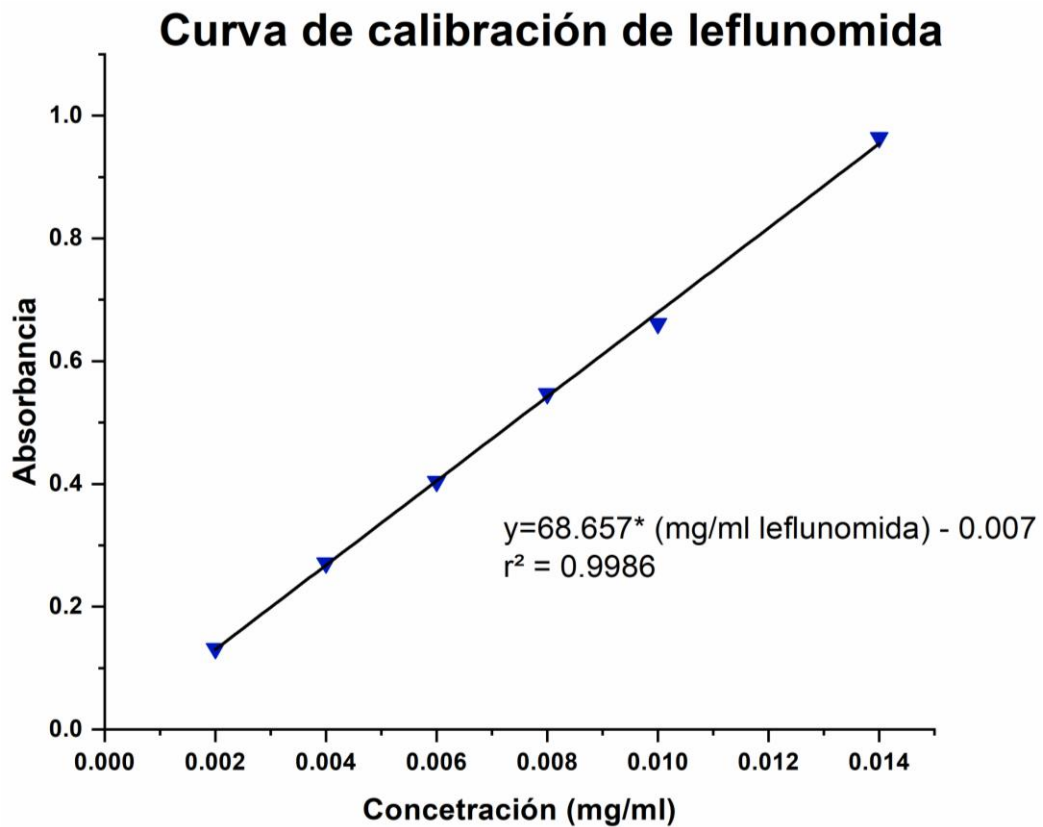


Figura 3.2 Curva de Calibración de leflunomida

Tabla 3.5 Tabla de resultados de curva de calibración de leflunomida.

Concentración mg/ml	ABS
0.014	0.964
0.01	0.661
0.008	0.547
0.006	0.404
0.004	0.271
0.002	0.132

3.6 OBSERVACIÓN DE LAS SUSPECIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

En la Figura 3.3 se muestra la suspensión de nanopartículas vista en microscopia óptica con objetivo 40x, antes de ser filtradas con membrana 1.2 μM PVDF (membrana HV (Durapore) éster de celulosa, de poro, 25 mm de diámetro de poro), en donde se observa claramente la presencia de cristales de leflunomida, esto es indicativo de una baja encapsulación. Debido a que una fracción del principio activo o está encapsulada formando cristales. Esta cristalización se debe al que hacer evaporado completamente el solvente orgánico, hay un disminución en la solubilidad de leflunomida, al no estar presente el solvente en el cual es soluble, ya que al ser un principio activo lipofílico, conduce a una precipitación en la fase acuosa, como ha sido demostrado en estudios anteriores [121], [133].

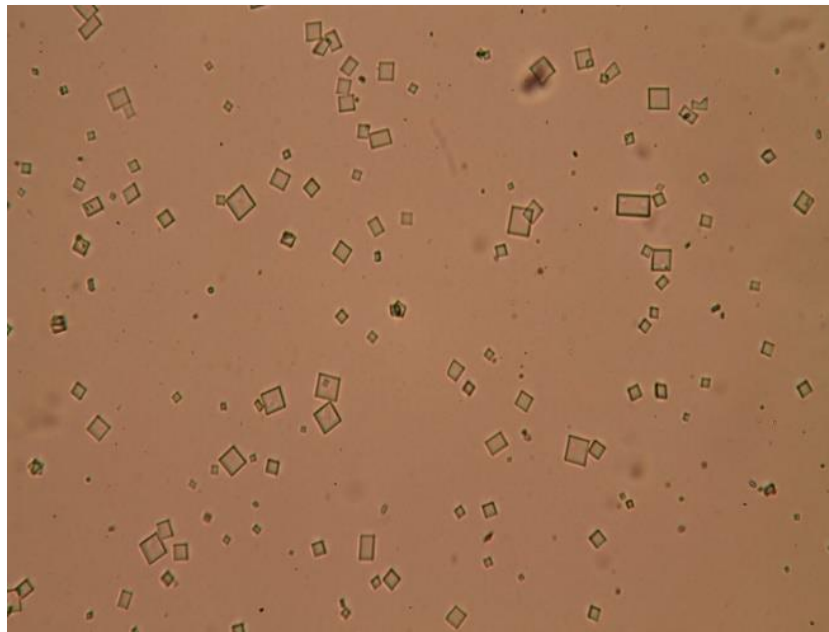


Figura 3.17 Suspensión de nanopartículas observadas a 40x, antes de filtración por membrana 1.2 μM PVDF, donde se muestra presencia de cristales de leflunomida.

| OBSERVACIÓN DE LAS SUSPENSIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

En la Figura 3.4 se puede observar que después de ser filtrada la suspensión de nanopartículas con membrana 1.2 μM PVDF (membrana HV (Durapore) EM éster de celulosa, de poro, 25 mm de diámetro de poro) no existe la presencia de cristales lo que garantiza que la cuantificación de leflunomida que se haga a partir de esta muestra, es la leflunomida contenida en las nanopartículas sintetizadas. [121], [133].

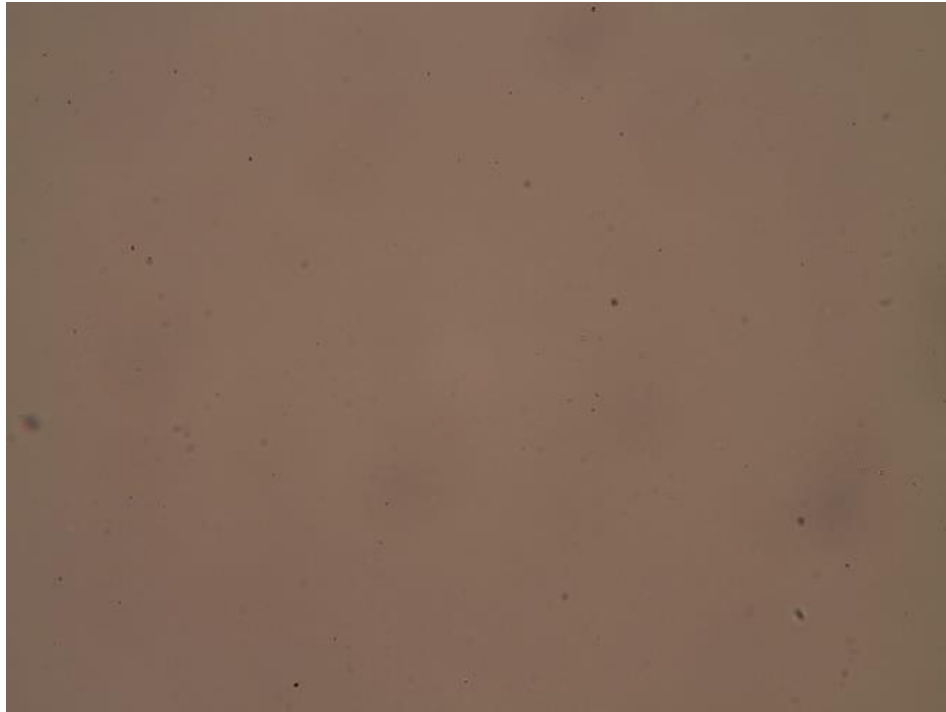


Figura 3.18 Suspensión de nanopartículas observadas a 40x, después de filtración por membrana 1.2 μM PVDF, sin presencia de cristales de leflunomida.

3.7 ANÁLISIS POR INFRARROJO (FTIR-ATR)

La técnica de espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR) se utilizó para confirmar la incorporación de PLGA sobre una leflunomida (Figura 3.

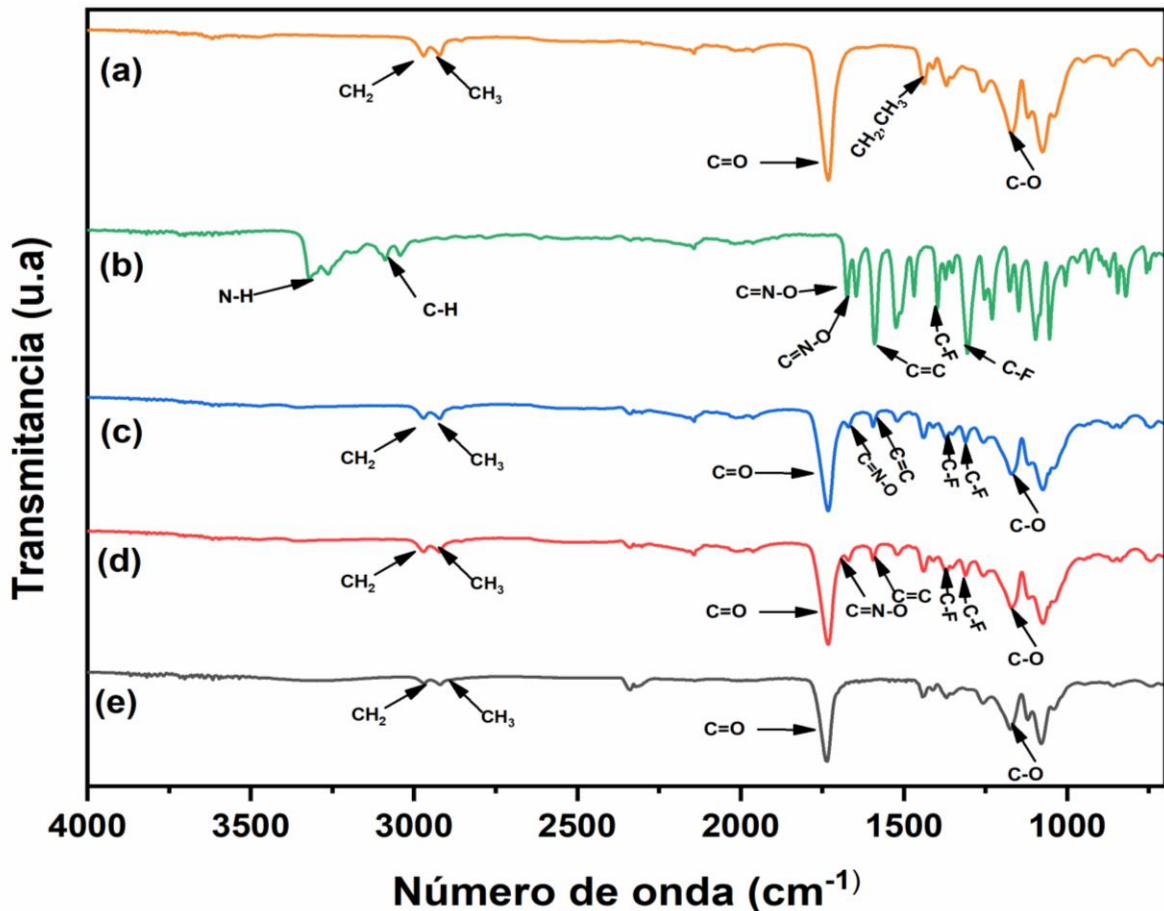


Figura 3.19 Espectro infrarrojo de los componentes de la formulación. (a) PLGA, (b) Leflunomida, (c) Mezcla física, (d) Nanopartículas Cargadas, (e) Nanopartículas blancas

La Figura 3.5a corresponde al espectro de PLGA donde se puede observar una banda característica a 1731 cm^{-1} , que puede atribuirse a la vibración de estiramiento C=O del carbonilo, también se observó dos bandas a 2970 y 2921 cm^{-1} que hacen referencia a vibraciones de estiramiento asimétrico R-CH₂, R-CH₃, también se observó una banda a 1170 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O. La figura 3.5b hace referencia al

espectro de leflunomida, la cual presenta una banda característica a 3320 cm^{-1} que corresponde al estiramiento N-H de la amida, así mismo se observó una banda doble a 3088 y 3041 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento C-H, a 1673 cm^{-1} se encuentra presente una banda que representa al estiramiento HC=N-O presente en el anillo del isoxazol, el espectro mostro una banda de alta intensidad a 1589 que se asignó al estiramiento C=C de la parte vinílica, mientras que la banda 1229 cm^{-1} se atribuyó al estiramiento C-F. La figura 3.5c, representa la mezcla física entre el PLGA y la leflunomida, en el espectro se observar la banda principal del PLGA, a 1734 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=O, mientras que a 2970 cm^{-1} se puede observar una doble banda que hacen referencia a las vibraciones de estiramientos asimétricas de R-CH₂ y R-CH₃. En cuanto a leflunomida se observaron bandas primarias de baja intensidad para HC=N-O a 1669 cm^{-1} perteneciente al anillo del isoxazol y 1595 - 1442 cm^{-1} se mostró una señal del estiramiento C=C de la parte vinílica y un estiramiento de C-F a 1331 cm^{-1} . En Figura 3.5d representa las nanopartículas cargadas en donde se puede observar tanto la presencia de PLGA com leflunomida. El estiramiento C=O cm^{-1} a 1735 banda característica de PLGA, de la misma forma la señales R-CH₂, R-CH₃ a 2968 , 2919 cm^{-1} y C-O 1173 cm^{-1} , así mismo se observaron bandas de baja intensidad de leflunomida se pudieron observar a 1670 cm^{-1} para el anillo del isoxazol y 1594 cm^{-1} estiramiento para la parte vinílica y un estiramiento C-F1 a 1315 cm^{-1} . Así mismo en la Figura 3.5e corresponde a las nanopartículas blancas en don se puede observar el estiramiento C=O a 1738 cm^{-1} , como también se puede observar señales a 2970 y 2921 cm^{-1} correspondientes a R-CH₂, R-CH₃. Por lo cual se logra demostrar que a pesar de que se obtuvo bandas de baja intensidad en cuanto leflunomida la espectroscopia de infrarrojo confirma que si existe una incorporación con PLGA posiblemente la razón por la cual hubo bandas de baja intensidad en leflunomida es debido a la baja cantidad de la muestra, esto se debe a que se mantuvieron las proporciones en base a la eficiencia de encapsulación y porcentaje de carga.

Tabla 3.6 Asignación de bandas para componentes de formulación de nanopartículas

PLGA		Leflunomida	
Grupo funcional	Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Frecuencia (cm ⁻¹)
CH, CH ₃ , CH ₂ (Estiramiento asimétrico)	3000 – 2700	N-H (Amida)	3500 – 3100
C=O (Strech)	1760 - 1750	C-H(Strech)	3000 – 2850
CH ₃ , CH ₂ (Deformación angular simétrica)	1500 – 1250	C=C (Aromático)	1600 1475
CH, CH ₃ (Deformación angular asimétrica)	1350 – 1150	C=N-O (Isoxazol)	1690 – 1580
C-O (éster) (stretch)	1300 - 1150	C-F	1332 - 1218

*Referencias de bandas de absorción para PLGA:[124], [134]–[136]

*Referencias de bandas de absorción para leflunomida:[137]–[139]

3.8 TAMAÑO DE PARTÍCULA, MORFOLOGIA Y POTENCIAL ZETA

La distribución del tamaño de las nanopartículas formuladas vario (oscilo) entre 208 ± 1.99 y 218 ± 2.84 nm, con un diámetro medio de 2.84 nm, mostrando una población monodispersa de las nanopartículas. El potencial zeta obtenidos de las nanopartículas blancas fue -de -17.3nV, mientras que las nanopartículas cargadas con leflunomida fue de -20.8 mV

Estudios realizados se establece que una suspensión de partículas estable debe tener un potencial zeta ± 30 mV, ya que puede influir en la estabilidad partícula, puesto que el valor absoluto del potencial zeta aumenta la cantidad de carga de la superficie de la partícula como resultado un equilibrio entre las fuerzas de repulsión y atracción de las partículas dispersas en el medio, evitando la agregación de partículas [140], [141]

Dado que la AR consiste en una sinovitis multiarticular persistente, destrucción del cartílago es necesario utilizar tratamientos para la administración selectiva de fármacos. Debido a la persistencia de la inflamación que contribuye al reclutamiento de monocitos, formación de espacios endoteliales, que permiten la fuga de plasma en el sitio de lesión y la sobreexpresión de mediadores inflamatorios, es por ello que el tamaño en la nanopartícula es un parámetro de vital importancia para la integridad y la efectividad del principio activo; puesto que influye directamente en la retención del

principio activo en la articulación, y en la respuesta inmune que podría desencadenar la inflamación o activación de células fagocitarias[92].

En algunos estudios se ha demostrado que nanopartículas de un tamaño de 200 nm de diámetro disminuyen la retención del principio activo en la articulación, y además disminuye los procesos inflamatorios en la articulación. Los sistemas de liberación controlada reducen fluctuaciones en sangre de los principios activos, evitando la eliminación rápida por los macrófagos que se encuentra en el sistema retículo endotelial[89], [142] .

Por lo que el tamaño obtenido en las nanopartículas es viable para funcionar como sistema de liberación el tamaño de distribución véase en Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Distribución de tamaño y potencial zeta

	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Nanopartículas blancas	208 ± 1.99	0.050 ± 0.03	-17.3
Nanopartículas Cargadas	218 ± 2.84	0.118 ± 0.09	-20.8

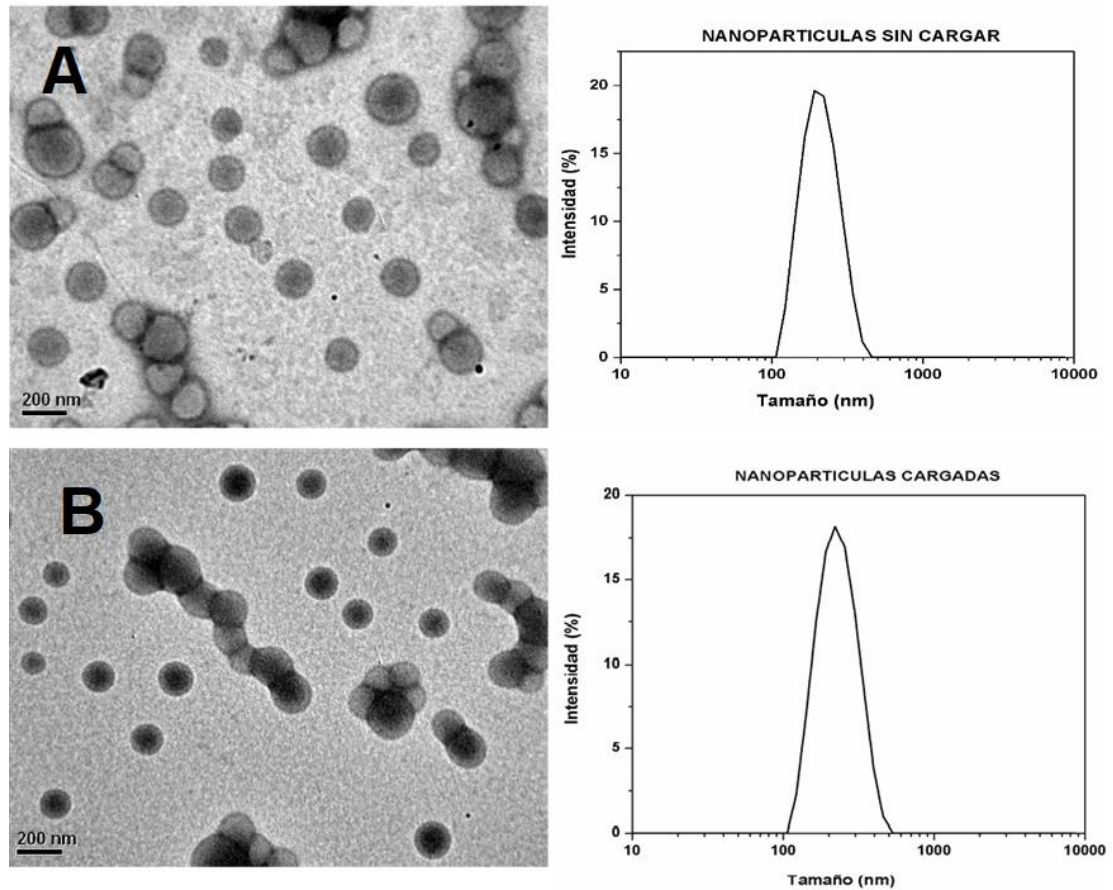


Figura 3.20 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas. (a) Nanopartículas blancas. (b) Nanopartículas cargadas con leflunomida

Las características morfológicas de las nanopartículas blancas y nanopartículas cargadas con leflunomida se muestran en la figura 3.6. A partir de una microscopía electrónica de transmisión (TEM) se puede observar que las nanopartículas exhiben una forma esférica con tamaño de 200 nm, este resultado es confirmado por los tamaños mencionados anteriormente, de superficie lisa. La superficie lisa de las nanopartículas se debe a que el uso de PVA en la formulación, que actúa como estabilizador de la emulsión, evitando la coalescencia de las perlas de la fase orgánica.

3.9 CINÉTICA DE LIBERACION *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON LEFLUNOMIDA

Los resultados obtenidos de la cinética de liberación *in vitro* de las nanopartículas cargadas con leflunomida y la suspensión de leflunomida como referencia para la cinética se muestran en la Figura 3.7. La liberación de leflunomida a partir de las nanopartículas cargadas mostro la primera fase característica de un el efecto “burst” inicial el cual consiste en la liberación rápida del fármaco durante las primeras 24 horas en donde se libera entre el 20 y 30% de la dosis total. Así mismo se pudo observar que fue liberado el 100 % de la suspensión del fármaco libre a las 24 horas[143]

De acuerdo con estudio realizado, la cinética de leflunomida muestra las fases características de una cinética de un sistema de fármacos polimérico bioerosionable, la primera fase, leflunomida a partir de las nanopartículas cargadas, sugieren que existe el efecto “burts”, en donde hay un liberación rápida de 47.6 % de la dosis total durante las primeras 24 horas, lo que indica que una fracción de leflunomida se absorbe en la superficie de nanopartícula, así mismo se puede observar que la cinética de liberación de la suspensión de leflunomida el 100% fue liberado a las 24 horas. [118], [143]–[145]. En la segunda fase existe un periodo de mínima liberación, en donde tiene lugar el proceso de hidrolisis del PLGA, en donde la cinética de liberación es más lenta y sostenida, esto se debe a que el láctico es más hidrófoba que el glicólico, al existir un aumento en el porcentaje de láctico disminuye la degradación del polímero y como resultado una liberación más lenta de leflunomida[143]–[145].

Posteriormente la liberación del 100 % que fue a los 7 días o (228H), mediada por difusión -erosión en las etapas posteriores, en donde existe la erosión del polímero y la disolución de fragmentos de bajo peso molecular según reportado en[143]–[145]

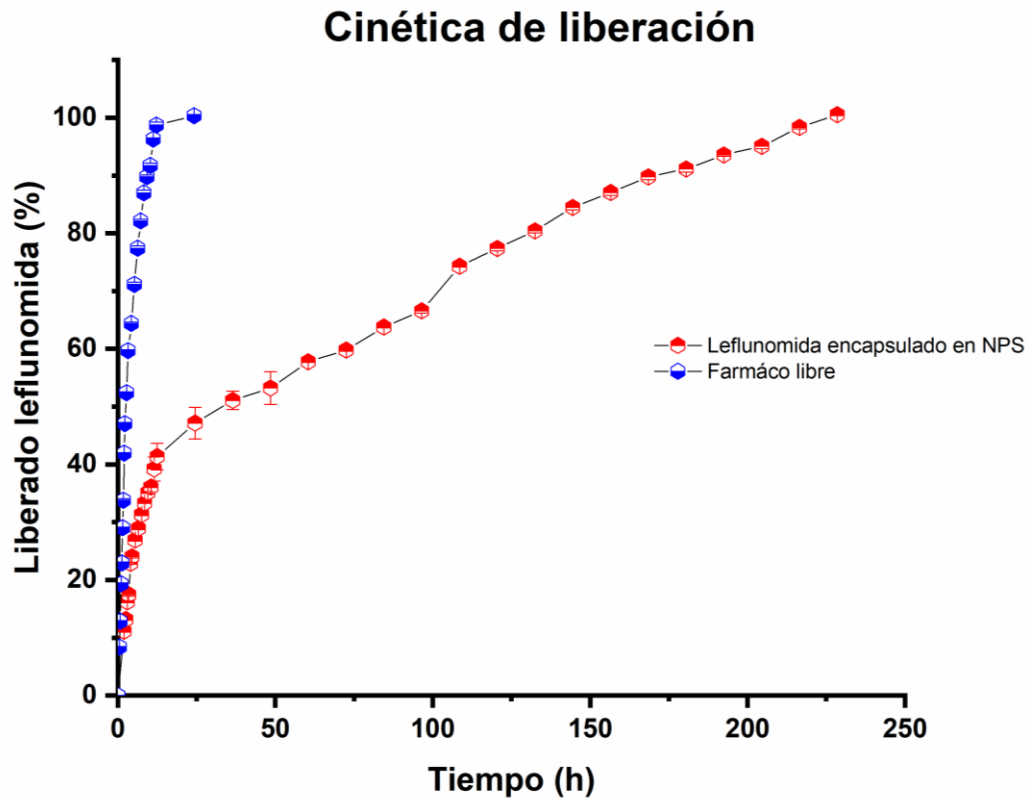


Figura 3.28 Cinética de liberación dependiente del tiempo para leflunomida encapsulado en nanopartículas y leflunomida como fármaco libre (disolución). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.0 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA

Se evaluó la viabilidad celular de las nanopartículas blancas, nanopartículas cargadas con leflunomida, y el fármaco libre leflunomida, mediante el ensayo MTT en células THP-1 diferenciadas a macrófagos después de un tratamiento de 24 y 48 horas.

En La Figura 3.8 se puede observar la exposición a las 24 de las células THP-1 a las nanopartículas blancas y nanopartículas cargadas fueron tratadas a diferentes concentraciones como 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 12.5 μ M, estas concentraciones fueron expuestas a las células de la misma manera a las 48 horas.

| EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA

Se puede observar que al ser expuestas al estímulo a las 24 horas con nanopartículas blancas presentan un porcentaje de viabilidad de $98 \pm 8.67\%$ sin diferencia significativa comparadas a las células control ($P > 0.05$), esto lo comprobábamos mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía. Así mismo al exponer a las células THP-1 al estímulo de las nanopartículas cargadas con leflunomida se muestra un porcentaje de viabilidad del $98 \pm 8.19\%$, al analizar los datos en el ANOVA de una vía se comprueba que no existe diferencia significativa entre este tratamiento y las células control ($P > 0.05$). Algo diferente ocurre cuando las células son expuestas al estímulo de leflunomida en donde el porcentaje de viabilidad en relación a la concentración de $200 \mu\text{M}$ es del $79 \pm 1.74\%$, a un $69 \pm 2.61\%$ a una concentración de $100 \mu\text{M}$ y a $75 \pm 2.94\%$ en una concentración de $50 \mu\text{M}$, que son significativamente diferentes comparadas con la viabilidad de las células control ($P < 0.05$), por lo que no se observa que exista un comportamiento dosis dependiente, ya que el porcentaje de viabilidad varía entre cada concentración. Estos resultados se puede comparar con estudio realizado donde fue evaluada la disminución de la proliferación de Th1 y la viabilidad celular de leflunomida, los resultados mostraron un comportamiento semejante al comportamiento que tuvo leflunomida en la viabilidad celular que se realizó en este estudio, donde las concentración $50 \mu\text{M}$ a $200 \mu\text{M}$ de leflunomida se asociaron a una baja en la viabilidad celular, mientras que a la concentración de $25 \mu\text{M}$ no afectaba la viabilidad celular las 24 horas[146]. Sin embargo, este efecto no necesariamente es igual en lo relativo al efecto en la viabilidad celular. La viabilidad en las células expuestas a leflunomida si tuvieron una diferencia significativa en su viabilidad, con respecto a las células control, y las células expuestas a nanopartículas cargadas y nanopartículas blanco.[147]

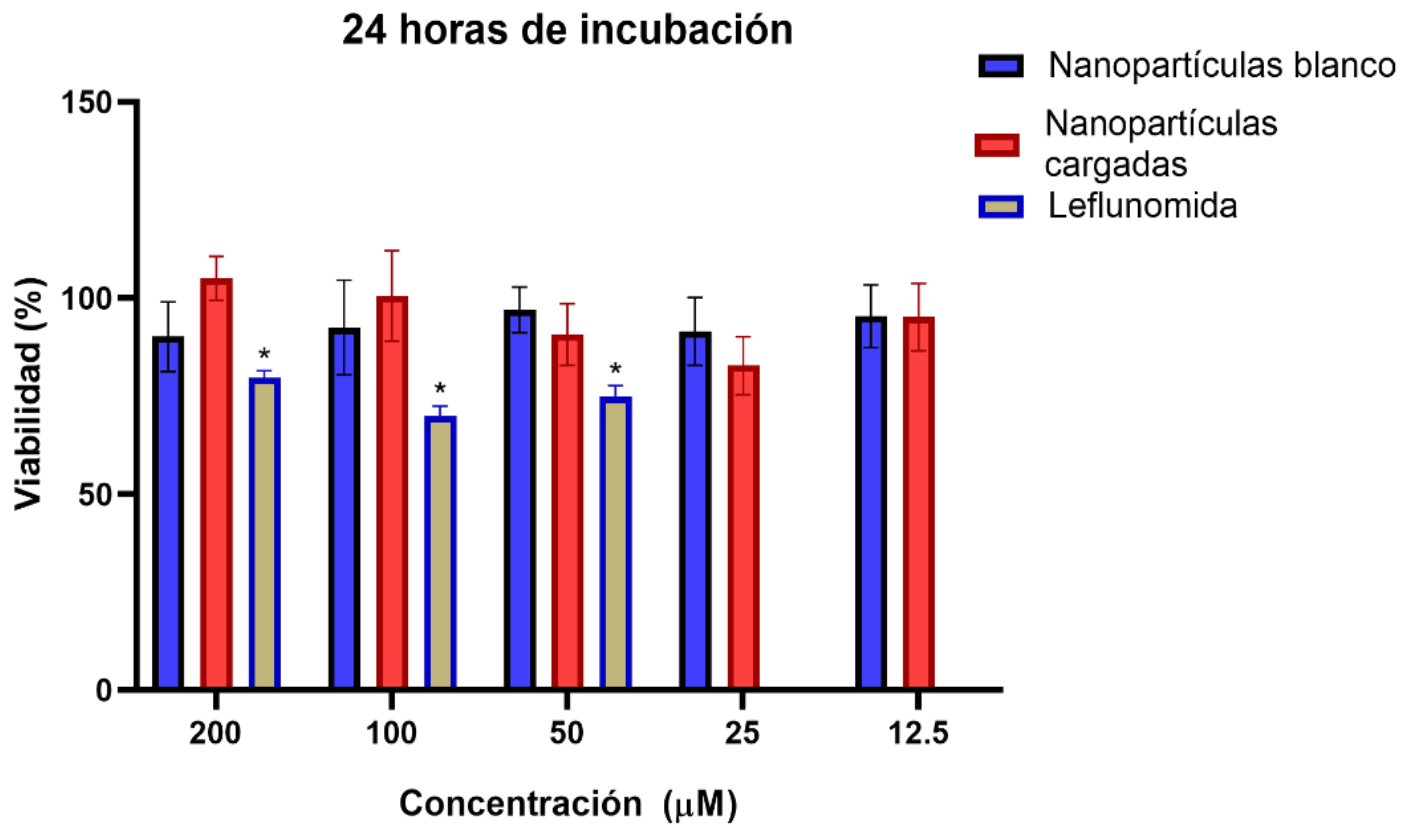


Figura 3.29 Efecto de la concentración a las 24 horas de las nanopartículas de PLGA cargadas con leflunomida y nanopartículas de PLGA blancas y fármaco libre leflunomida sobre la viabilidad celular. Los datos representan la media y desviación estándar, cada uno por quintuplicado.

Al ser expuesta las células a 48 horas las nanopartículas blancas mostraron una viabilidad $80 \pm 7.10\%$ lo que indica que no afecto la viabilidad celular en comparación con las células control ($P > 0.05$), en la literatura se ha demostrado que las nanopartículas de PLGA sin cargar presentan menor toxicidad a diferencia cuando son expuestas a nanopartículas cargadas, por lo que se puede concluir que no afectan la viabilidad significativamente[148], [149], hasta que estas fueron expuestas a un estímulo de $200 \mu\text{M}$. Sin embargo algo diferente ocurre al ser expuestas al estímulo de la nanopartículas cargadas con leflunomida[150], ya que presentaron una viabilidad de $64 \pm 5.88\%$ se puede observar una disminución en el porcentaje de viabilidad, esto puede deber a que existe una liberación del fármaco, así mismo se puede notar que en cuanto al tratamiento con nanopartículas blancas y nanopartículas cargadas no existe una diferencia significativa como se observa en la Figura 3.9, debido a que existe mucha variabilidad en los datos por lo que se sugiere repetir el experimento.

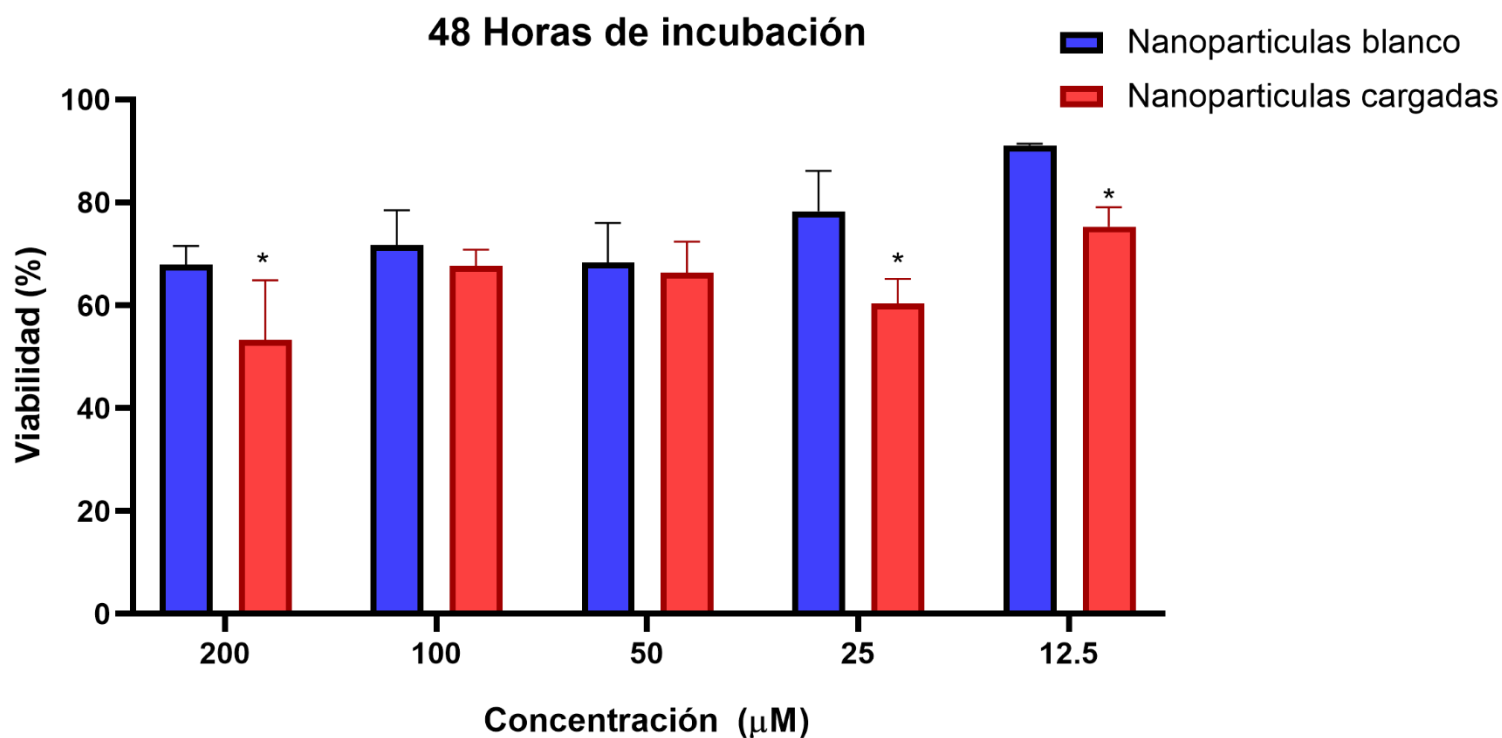


Figura 3.30 Efecto de la concentración a las 24 horas de las nanopartículas de PLGA cargadas con leflunomida y nanopartículas de PLGA blancas sobre la viabilidad celular. Los datos representan la media y desviación estándar, cada uno por quintuplicado.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN

En este proyecto se elaboraron mediante la técnica de emulsión evaporación de solvente nanopartículas de PLGA éster terminal siendo cargadas con leflunomida para ser evaluadas *in vitro* como sistema de administración y liberación en el tratamiento de artritis reumatoide.

En donde fue evaluado el tamaño de las nanopartículas poliméricas mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en donde la población fue monodispersa, aunado con microscopia de transmisión de barrido confirmando la morfología esférica con tamaños bien definidos, mostrando tamaños de 200 nm. En donde la cuantificación y la cinética de liberación de leflunomida se llevó a cabo mediante la técnica UV-Vis

Se evaluó la cinética de liberación de las nanopartículas de PLGA, mediante un estudio *in vitro*, el que comparó la liberación del principio activo desde las nanopartículas y la disolución de leflunomida libre. Se observó que fármaco libre llega al 100% de liberación a las 24 horas, en cambio para las nanopartículas la liberación el 100% de liberación se llega a los 7 días. Para la caracterización de las nanopartículas se utilizó FTIR' ATR, para confirmación entre la interacción del polímero y el principio activo.

Para la viabilidad celular las nanopartículas blancas nanopartículas de PLGA y leflunomida libre fueron evaluadas *in vitro* sobre la línea celular THP-1. Las nanopartículas blancas no fueron citotóxicas al ser expuestas a las 24 horas. Las nanopartículas cargadas con leflunomida no afectaron la viabilidad celular tras 24 horas de exposición, sin embargo, si a las 48 horas.

En conclusión, se llegó a la formulación óptima para la a encapsulación de leflunomida en nanopartículas poliméricas de PLGA éster terminal con 75% de fracción láctica, elaboradas por emulsión evaporación de solvente, proporciona un sistema de liberación controlada del fármaco, con apropiadas características fisicoquímicas para una eventual administración intraarticular sin efectos citotóxicos. Como proyecto a futuro se desarrollará un sistema en donde se implementará la utilización de nanopartículas de PLGA cargadas con Teriflunomida, encapsulada en micropartículas Troyano mediante la utilización de spray drying con el uso de boquilla de 3 fluidos para mejorar las propiedades física y estabilidad de las nanopartículas, para una mejor administración y liberación de estas. Siendo *in vitro* en células e *in vivo* en un modelo animal para evaluar este sistema.

CAPÍTULO V REFERENCIA

- [1] V. V. Sivadas Ganapathy^{1*}, V. Rajeev³, and Rajeev Arunachalam⁴, “Autoimmune Disorders—Immunopathogenesis and Potential Therapies,” *J. Young Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. S1–S4, 2017.
- [2] P. Heidari, W. Cross, and K. Crawford, “Do out-of-pocket costs affect medication adherence in adults with rheumatoid arthritis? A systematic review,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 1, pp. 12–21, 2018.
- [3] K. Chaudhari, S. Rizvi, and B. A. Syed, “Rheumatoid arthritis: current and future trends,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 5, pp. 305–306, 2016.
- [4] M. Del Grossi Moura, L. C. Lopes, M. T. Silva, S. Barberato-Filho, R. H. L. Motta, and C. De Cássia Bergamaschi, “Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis: Systematic review protocol,” *Med. (United States)*, vol. 97, no. 41, 2018.
- [5] C. Strehl, M. C. van der Goes, J. W. J. Bijlsma, J. W. G. Jacobs, and F. Buttgereit, “Glucocorticoid-targeted therapies for the treatment of rheumatoid arthritis,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 26, no. 2, pp. 187–195, 2017.
- [6] G. Schett *et al.*, “Tapering biologic and conventional DMARD therapy in rheumatoid arthritis: Current evidence and future directions,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 75, no. 8, pp. 1428–1437, 2016.
- [7] S. A. and T. Huizinga, “Sustained remission in rheumatoid arthritis: latest evidence and clinical considerations,” *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 249–262, 2017.
- [8] J. Haschka *et al.*, “Relapse rates in patients with rheumatoid arthritis in stable remission tapering or stopping antirheumatic therapy: Interim results from the prospective randomised controlled RETRO study,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 75, no. 1, pp. 45–51, 2016.
- [9] M. J. Alomar, “Factors affecting the development of adverse drug reactions (Review article),” *Saudi Pharm. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 83–94, 2014.
- [10] A. Pasma, A. van’t Spijker, J. M. W. Hazes, J. J. V. Busschbach, and J. J. Luime, “Factors associated with adherence to pharmaceutical treatment for rheumatoid arthritis patients: A systematic review,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 43, no. 1, pp. 18–28, 2013.
- [11] S. Thakur, B. Riyaz, A. Patil, A. Kaur, B. Kapoor, and V. Mishra, “Novel drug delivery systems for NSAIDs in management of rheumatoid arthritis: An overview,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 106, no. July, pp. 1011–1023, 2018.
- [12] D. Prosperi, M. Colombo, I. Zanoni, and F. Granucci, “Drug nanocarriers to

- treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases,” *Semin. Immunol.*, vol. 34, no. August, pp. 61–67, 2017.
- [13] S. Bhatia, “Natural Polymer Drug Delivery Systems,” in *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, 2016, pp. 33–93.
- [14] X. Feng and Y. Chen, “Drug delivery targets and systems for targeted treatment of rheumatoid arthritis,” *J. Drug Target.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–13, 2018.
- [15] E. Nogueira, A. C. Gomes, A. Preto, and A. Cavaco-Paulo, “Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 1113–1126, 2016.
- [16] M. Saeedi, M. Eslamifar, K. Khezri, and S. M. Dizaj, “Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 111, no. December 2018, pp. 666–675, 2019.
- [17] R. Heo *et al.*, “Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis,” *Biomaterials*, vol. 131, pp. 15–26, 2017.
- [18] M. H. Cardiel *et al.*, “Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología,” *Reum. Clin.*, vol. 10, no. 4, pp. 227–240, 2014.
- [19] Aecretaria de Salud, “Artritis Reumatoide su Impacto Social y Económico,” *Boletín Episcopológico*, vol. 33, no. 12, 2016.
- [20] J. S. Smolen *et al.*, “EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 76, no. 6, pp. 960–977, 2017.
- [21] T. Ahsan, U. Erum, D. Khowaja, and A. Dahani, “Delayed conventional DMARDS therapy is effective in Rheumatoid arthritis,” *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 33, no. 4, pp. 840–843, 2017.
- [22] G. R. Burmester and J. E. Pope, “Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis,” *Lancet*, vol. 389, no. 10086, pp. 2338–2348, 2017.
- [23] T. A. Gheita and S. A. Kenawy, “Nanomedicine in rheumatology: A new field in the diagnosis and therapy of rheumatic diseases,” *Int. J. Clin. Rheumtol.*, vol. 13, no. 1, 2018.
- [24] J. Safari and Z. Zarnegar, “Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 18, no. 2, pp. 85–99, 2014.
- [25] R. Ravichandran, *Nanotechnology-based drug delivery systems*, vol. 5, no. 1–4. Elsevier Inc., 2009.
- [26] P. Conigliaro *et al.*, “Autoantibodies in inflammatory arthritis,” *Autoimmun. Rev.*,

vol. 15, no. 7, pp. 673–683, 2016.

- [27] 3 KASSEM SHARIF, 1 ALAA SHARIF, 1 FAREED JUMAH, 2 ROD OSKOUIAN, AND, and R. S. TUBBS, “Rheumatoid Arthritis in Review: Clinical, Anatomical, Cellular and Molecular Points of View,” *Clin. Anat.*, vol. 30, no. 7, pp. 946–952, 2017.
- [28] J. T. Giles, “Extra-articular Manifestations and Comorbidity in Rheumatoid Arthritis: Potential Impact of Pre-Rheumatoid Arthritis Prevention,” *Clin. Ther.*, vol. xxx, no. xxx, pp. 1–10, 2019.
- [29] M. Jokar and M. Jokar, “Prevalence of Inflammatory Rheumatic Diseases in a Rheumatologic outpatient clinic: analysis of 12626 cases,” *Rheumatol. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 21–27, 2017.
- [30] Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, “Tipos de artritis | CDC,” 2019. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/arthritis/spanish/conceptos-basicos/tipos-de-artritis.htm>. [Accessed: 01-Jul-2019].
- [31] Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel, “Artritis | Temas de salud | NIAMS,” 2017. [Online]. Available: <https://www.niams.nih.gov/es/informacion-de-salud/artritis#tab-overview>. [Accessed: 01-Jul-2019].
- [32] I. Peláez-Ballestas *et al.*, “Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology,” *J. Rheumatol.*, vol. 38, no. SUPPL. 86, pp. 3–6, 2011.
- [33] K. E. Barbour, C. G. Helmick, M. Boring, and T. J. Brady, “Vital Signs: Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation — United States, 2013–2015,” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 66, no. 9, pp. 246–253, Mar. 2017.
- [34] T. M. Hunter, N. N. Boytsov, X. Zhang, K. Schroeder, K. Michaud, and A. B. Araujo, “Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014,” *Rheumatol. Int.*, vol. 37, no. 9, pp. 1551–1557, 2017.
- [35] P. M. Josefina Duran¹, Loreto Massardo², Carolina Llanos³, Sergio Iacobelli³, Paula Burgos³, Raquel Aguilera³, Maria Eugenia Martinez³, Marcela Cisternas³, Macarena Armstrong⁴, Mirentxu Iruretagoyena³, Francisco Radrigan³, Alvaro Passi³, Pablo Riedemann⁵, Camil, “THE PREVALENCE OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN CHILE, A STUDY PERFORMED AS PART OF THE NATIONAL SURVEY HEALTH (ENS 2016-17),” *Ann. Rheum. Dis.*, no. June, 2019.
- [36] D. Scublinsky *et al.*, “The prevalence of rheumatoid arthritis in argentina: A

capture-recapture study in a city of Buenos Aires Province,” *J. Clin. Rheumatol.*, vol. 16, no. 7, pp. 317–321, 2010.

- [37] J. E. Machado-Alba, A. F. Ruiz, and D. A. M. Moralesca, “The epidemiology of rheumatoid arthritis in a cohort of Colombian patients TT - Epidemiología de la artritis reumatoide en una cohorte de pacientes colombianos,” *Rev. colomb. Reum.*, vol. 22, no. 3, pp. 148–152, 2015.
- [38] Y. Granados *et al.*, “Prevalence of musculoskeletal disorders and rheumatic disease in the Warao, Kari’ña, and Chaima indigenous populations of Monagas State, Venezuela,” *Clin. Rheumatol.*, vol. 35, pp. 53–61, 2016.
- [39] J. Widdifield *et al.*, “The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 66, no. 4, pp. 786–793, 2014.
- [40] L. Massardo *et al.*, “Early rheumatoid arthritis in Latin America: Low socioeconomic status related to high disease activity at baseline,” *Arthritis Care Res.*, vol. 64, no. 8, pp. 1135–1143, 2012.
- [41] S. Merkesdal *et al.*, “Indirect cost assessment in patients with rheumatoid arthritis (RA): Comparison of data from the health economic patient questionnaire HEQ-RA and insurance claims data,” *Arthritis Rheum.*, vol. 53, no. 2, pp. 234–240, 2005.
- [42] V. Y. Ma, L. Chan, and K. J. Carruthers, “Incidence , Prevalence , Costs , and Impact on Disability of Common Conditions Requiring Rehabilitation in the United States : Stroke , Spinal Cord Injury , Traumatic Brain Injury , Multiple Sclerosis , Osteoarthritis , Rheumatoid Arthritis , Limb Loss , ,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 95, no. 5, pp. 986-995.e1, 2014.
- [43] W. J. J. Falkenburg and D. van Schaardenburg, “Evolution of autoantibody responses in individuals at risk of rheumatoid arthritis,” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, pp. 1–11, 2017.
- [44] S. Sánchez-Ramón, F. J. López-Longo, and L. Carreño, “Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: m??s all?? de las citocinas proinflamatorias,” *Reumatol. Clin.*, vol. 6, no. SUPPL. 3, pp. 20–24, 2010.
- [45] G. Reynolds *et al.*, “Synovial CD4+ T-cell-derived GM-CSF supports the differentiation of an inflammatory dendritic cell population in rheumatoid arthritis,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 75, no. 5, pp. 899–907, 2016.
- [46] I. B. McInnes and G. Schett, “Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis,” *Lancet*, vol. 389, no. 10086, pp. 2328–2337, 2017.
- [47] G. S. Firestein and I. B. McInnes, “Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis,” *Immunity*, vol. 46, no. 2, pp. 183–196, 2017.
- [48] A. Leblond, Y. Allanore, and J. Avouac, “Targeting synovial neoangiogenesis in

- rheumatoid arthritis," *Autoimmun. Rev.*, vol. 16, no. 6, pp. 594–601, 2017.
- [49] J. Alam, I. Jantan, S. Nasir, and A. Bukhari, "Rheumatoid arthritis : Recent advances on its etiology , role of cytokines and pharmacotherapy," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 92, pp. 615–633, 2017.
- [50] K. D. Deane, M. K. Demoruelle, L. B. Kelmenson, K. A. Kuhn, J. M. Norris, and V. M. Holers, "Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 31, no. 1, pp. 3–18, 2017.
- [51] E. W. Karlson *et al.*, "Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, no. 1, pp. 54–60, 2010.
- [52] L. Tang, Y. Wang, S. Zheng, M. Bao, Q. Zhang, and J. Li, "PTPN22 polymorphisms, but not R620W, were associated with the genetic susceptibility of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Chinese Han population," *Hum. Immunol.*, vol. 77, no. 8, pp. 692–698, 2016.
- [53] Y. Okada, S. Eyre, A. Suzuki, Y. Kochi, and K. Yamamoto, "Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 78, no. 4, pp. 446–453, 2019.
- [54] J. Karami, S. Aslani, A. Jamshidi, M. Garshasbi, and M. Mahmoudi, "Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review," *Gene*, vol. 702, no. March, pp. 8–16, 2019.
- [55] and J. A. B. Jonathan H. Esensten, David Wofsy, "Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [56] M. D. C. Dominguez *et al.*, "An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant-induced arthritis," *Autoimmunity*, vol. 44, no. 6, pp. 471–482, 2011.
- [57] J. A. Martínez López *et al.*, "Recommendations for the Evaluation and Management of Patients With Rheumatic Autoimmune and Inflammatory Diseases During the Reproductive Age, Pregnancy, Postpartum and Breastfeeding," *Reumatol. Clínica (English Ed.)*, vol. 13, no. 5, pp. 264–281, 2017.
- [58] M. Kourilovitch, C. Galarza-Maldonado, and E. Ortiz-Prado, "Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis," *J. Autoimmun.*, vol. 48–49, pp. 26–30, 2014.
- [59] M. Saeedi *et al.*, "Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 131, no. December 2018, pp. 666–675, 2019.

- [60] D. Aletaha *et al.*, “2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 9, pp. 2569–2581, 2010.
- [61] M. F. Marengo and M. E. Suarez-Almazor, “Improving treatment adherence in patients with rheumatoid arthritis: What are the options?,” *Int. J. Clin. Rheumatol.*, vol. 10, no. 5, pp. 345–356, 2015.
- [62] S. C. Bolge, A. Goren, and N. Tandon, “Reasons for discontinuation of subcutaneous biologic therapy in the treatment of rheumatoid arthritis: A patient perspective,” *Patient Prefer. Adherence*, vol. 9, pp. 121–131, 2015.
- [63] N. Wabe and M. D. Wiese, “Treating rheumatoid arthritis to target: physician and patient adherence issues in contemporary rheumatoid arthritis therapy,” *J. Eval. Clin. Pract.*, vol. 23, no. 3, pp. 486–493, 2017.
- [64] Y. Xia *et al.*, “Treatment adherence to disease-modifying antirheumatic drugs in Chinese patients with rheumatoid arthritis,” *Patient Prefer. Adherence*, vol. 10, pp. 735–742, 2016.
- [65] M. H. Cardiel *et al.*, “2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis,” *Reum. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 227–240, 2014.
- [66] J. A. Singh *et al.*, “2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis,” *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, vol. 68, no. 1, pp. 1–25, 2016.
- [67] L. J. Crofford, “Use of NSAIDs in treating patients with arthritis,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no. SUPPL 3, 2013.
- [68] N. Moore, C. Pollack, and P. Butkerait, “Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs,” *Ther. Clin. Risk Manag.*, pp. 11–1061, 2015.
- [69] M. Koenen *et al.*, “Glucocorticoid receptor in stromal cells is essential for glucocorticoid-mediated suppression of inflammation in arthritis,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 11, pp. 1610–1618, 2018.
- [70] J. F. Ferreira, A. Abdelkhalik, and A. Mohamed, “Glucocorticoids in Rheumatoid Arthritis,” vol. 42, pp. 33–46, 2016.
- [71] J. W. J. Bijlsma and F. Buttgerit, “Adverse events of glucocorticoids during treatment of rheumatoid arthritis: Lessons from cohort and registry studies,” *Rheumatol. (United Kingdom)*, vol. 55, pp. ii3–ii5, 2016.
- [72] G. Orsolini *et al.*, “Effects of biological and targeted synthetic DMARDs on bone loss in rheumatoid arthritis,” *Pharmacol. Res.*, vol. 147, no. June, p. 104354, 2019.

- [73] C. C. Mok, W. C. Tsai, D. Y. Chen, and J. C. C. Wei, "Immunogenicity of anti-TNF biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 16, no. 2, pp. 201–211, 2016.
- [74] E. K. Li, L. Tam, and B. Tomlinson, "Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis.," *Clin. Ther.*, vol. 26, no. 4, pp. 447–59, 2004.
- [75] X. Xu, J. W. Williams, H. Gong, A. Finnegan, and A. S.-F. Chong, "Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 52, no. 4, pp. 527–534, 1996.
- [76] J. Bae and J. W. Park, "Topical delivery of leflunomide for rheumatoid arthritis treatment: evaluation of local tissue deposition of teriflunomide and its anti-inflammatory effects in an arthritis rat model," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 00, no. 00, pp. 1–9, 2015.
- [77] S. Zhu, X. Yan, Z. Xiang, H. F. Ding, and H. Cui, "Leflunomide Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Neuroblastoma Cells In Vitro and In Vivo," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 1–7, 2013.
- [78] M. Schultz *et al.*, "Clinical effectiveness and safety of leflunomide in inflammatory arthritis: a report from the RAPPORT database with supporting patient survey," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, pp. 1471–1478, 2013.
- [79] P. B. B. Jones and D. H. N. White, "Reappraisal of the clinical use of leflunomide in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis," *Open Access Rheumatol. Res. Rev.*, vol. 2, pp. 53–71, 2010.
- [80] R. I. Fox *et al.*, "Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis," *Clin. Immunol.*, vol. 93, no. 3, pp. 198–208, 1999.
- [81] Y. H. Yun, B. K. Lee, and K. Park, "Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation," *J. Control. Release*, vol. 219, pp. 2–7, 2015.
- [82] A. P. Nikalje, "Nanotechnology and its Applications in Medicine," vol. 5, pp. 1–3, 2015.
- [83] S. R. Mudshinge, A. B. Deore, S. Patil, and C. M. Bhalgat, "Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery," *Saudi Pharm. J.*, vol. 19, no. 3, pp. 129–141, 2011.
- [84] E. C. Wang and A. Z. Wang, "Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology," *Integr. Biol. (United Kingdom)*, vol. 6, no. 1, pp. 9–26, 2014.
- [85] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, 2017.
- [86] A. C. Anselmo and S. Mitragotri, "Cell-mediated delivery of nanoparticles: Taking advantage of circulatory cells to target nanoparticles," *J. Control.*

Release, vol. 190, pp. 531–541, 2014.

- [87] R. Stevenson, A. J. Hueber, A. Hutton, I. B. McInnes, and D. Graham, “Nanoparticles and inflammation,” *ScientificWorldJournal.*, vol. 11, pp. 1300–1312, 2011.
- [88] M. D. Howard, E. D. Hood, B. Zern, V. V. Shuvaev, T. Grosser, and V. R. Muzykantov, “Nanocarriers for Vascular Delivery of Anti-Inflammatory Agents,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 54, no. 1, pp. 205–226, 2014.
- [89] S. Mitragotri and J. W. Yoo, “Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 34, no. 11, pp. 1887–1897, 2011.
- [90] J. Kanwar, K. Roy, and R. Kanwar, “Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 5407, 2015.
- [91] and Z. C. Leena Kumari Prasad¹, Hannah O’Mary¹, “arthritis,” vol. 10, no. 13, pp. 2063–2074, 2016.
- [92] M. Yang, X. Feng, J. Ding, F. Chang, and X. Chen, “Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis,” *J. Control. Release*, vol. 252, pp. 108–124, 2017.
- [93] A. N. Ilinskaya and M. A. Dobrovolskaia, “Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials,” *Handb. Immunol. Prop. Eng. Nanomater. Second Ed.*, vol. 3, pp. 139–163, 2016.
- [94] I. M. Oliveira, C. Gonçalves, R. L. Reis, and J. M. Oliveira, “Engineering nanoparticles for targeting rheumatoid arthritis: Past, present, and future trends,” *Nano Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 4489–4506, 2018.
- [95] P. Serra and P. Santamaria, “Nanoparticle-based autoimmune disease therapy,” *Clin. Immunol.*, vol. 160, no. 1, pp. 3–13, 2015.
- [96] M. Bhalekar, A. Madgulkar, M. Aswar, G. Mariam, and P. Desale, “A Comparative Study of Oral and Topical Administration of Hesperidin Lipid Nanoparticles in Rheumatoid Arthritis,” *Austin Arthritis*, vol. 1, no. 2, pp. 1–9, 2016.
- [97] M. R. Bhalekar, A. R. Madgulkar, P. S. Desale, and G. Mariam, “Formulation of piperine solid lipid nanoparticles (SLN) for treatment of rheumatoid arthritis,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 43, no. 6, pp. 1003–1010, 2017.
- [98] J. Ye, Q. Wang, X. Zhou, and N. Zhang, “Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis,” *Int. J. Pharm.*, vol. 352, no. 1–2, pp. 273–279, 2008.
- [99] Madhwi *et al.*, “In vivo pharmacokinetic studies and intracellular delivery of methotrexate by means of glycine-tethered PLGA-based polymeric micelles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 519, no. 1–2, pp. 138–144, 2017.

- [100] C. Fonseca, S. Simoes, and R. Gaspar, "P aclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity," *J. Control. Release*, vol. 83, pp. 273–286, 2002.
- [101] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–522, 2012.
- [102] J. S. Park, H. N. Yang, S. Y. Jeon, D. G. Woo, M. S. Kim, and K. H. Park, "The use of anti-COX2 siRNA coated onto PLGA nanoparticles loading dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis," *Biomaterials*, vol. 33, no. 33, pp. 8600–8612, 2012.
- [103] D. N. Kapoor, A. Bhatia, R. Kaur, R. Sharma, G. Kaur, and S. Dhawan, "PLGA: A unique polymer for drug delivery," *Ther. Deliv.*, vol. 6, no. 1, pp. 41–58, 2015.
- [104] D. J. Hines and D. L. Kaplan, "Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights.," *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 30, no. 3, pp. 257–76, 2013.
- [105] J. Garner, S. Skidmore, H. Park, K. Park, S. Choi, and Y. Wang, "A protocol for assay of poly(lactide-co-glycolide) in clinical products," *Int. J. Pharm.*, vol. 495, no. 1, pp. 87–92, 2015.
- [106] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, 2011.
- [107] C. E. Astete and C. M. Sabliov, "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 17, no. 3, pp. 247–289, 2006.
- [108] A. M. Kosinski, J. L. Brugnano, B. L. Seal, F. C. Knight, and A. Panitch, "Synthesis and characterization of a poly(lactic-co-glycolic acid) core + poly(N-isopropylacrylamide) shell nanoparticle system.," *Biomatter*, vol. 2, no. 4, pp. 195–201, 2012.
- [109] J.-M. Lu *et al.*, "Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 9, no. 4, pp. 325–341, 2009.
- [110] S. Alcalá-alcalá, I. Aguilar-rosas, and D. Quintanar-guerrero, "A biodegradable polymeric system for peptide – protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles , using an adsorption / infiltration process," pp. 2141–2151, 2013.
- [111] C. Gómez-gaete, "NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS : TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS (Polymeric nanoparticles : technologie and pharmaceutical applications)," *Rev. Farmacol. Chile*, vol. 7, no. 2, pp. 7–16, 2014.

- [112] C. Gomez-Gaete *et al.*, "Optimization of rhein-loaded polymeric nanoparticles using a factorial design and evaluation of the cytotoxic and anti-inflammatory effects.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, 2018.
- [113] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, and S. C. Low, "Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2013.
- [114] R. Xu, "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement," *Particuology*, vol. 6, no. 2, pp. 112–115, 2008.
- [115] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, "Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties," *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018.
- [116] C. Y. Tang and Z. Yang, *Transmission Electron Microscopy (TEM)*. Elsevier B.V., 2017.
- [117] V. Chourasiya, S. Bohrey, and A. Pandey, "Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 3 3 factorial design for oral delivery," *Mater. Discov.*, vol. 5, pp. 1–13, 2016.
- [118] C. Gómez-Gaete, M. Retamal, C. Chávez, P. Bustos, R. Godoy, and P. Torres-Vergara, "Development, characterization and in vitro evaluation of biodegradable rhein-loaded microparticles for treatment of osteoarthritis," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 96, pp. 390–397, 2017.
- [119] G. K. Das, P. P. Y. Chan, A. Teo, J. S. C. Loo, J. M. Anderson, and T. T. Y. Tan, "In vitro cytotoxicity evaluation of biomedical nanoparticles and their extracts," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 1, pp. 337–346, 2010.
- [120] Molecular Probes Inc, "Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154)," *Prod. Inf.*, pp. 4–6, 2002.
- [121] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, M. Besnard, A. Bochot, and E. Fattal, "Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 2, pp. 153–159, 2007.
- [122] N. Sharma, P. Madan, and S. Lin, "Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 404–416, 2016.
- [123] R. S. and J. W. L. Jr., "Nanoparticle-based targeted drug delivery," vol. 86, no. 3, pp. 215–223, 2000.
- [124] T. P. Tuyen Dao, T. H. Nguyen, V. V. To, T. H. Ho, T. A. Nguyen, and M. C. Dang, "A new formulation of curcumin using poly (lactic-co-glycolic acid) -

Polyethylene glycol diblock copolymer as carrier material," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 3, 2014.

- [125] D. Quintanar-guerrero, D. Tamayo-esquivel, A. Ganem-quintanar, E. All, and E. Doelker, "Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres," vol. 26, pp. 211–218, 2005.
- [126] R. P. F. Lanao, A. M. Jonker, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, J. C. M. Van Hest, and S. C. G. Leeuwenburgh, "Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 19, no. 4, pp. 380–390, 2013.
- [127] N. Varga, V. Hornok, L. Janovák, I. Dékány, and E. Csapó, "The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, pp. 212–218, 2019.
- [128] Y. Krishnamachari, P. Madan, and S. Lin, "Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon," *Int. J. Pharm.*, vol. 338, no. 1–2, pp. 238–247, 2007.
- [129] Y. Tabata and Y. Ikada, "Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acidglycolic acid homo- and copolymers," vol. 22, pp. 837–858, 1988.
- [130] T. P. Journal, "Antibody Response is Differentially Influenced by PLGA-PAD4 Particle characteristics," *Science (80-)*, vol. 28, no. 406, pp. 1–15, 2011.
- [131] C. Gómez-Gaete *et al.*, "Successful factorial design for the optimization of methylprednisolone encapsulation in biodegradable nanoparticles," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 39, no. 2, pp. 310–320, 2013.
- [132] N. R. Pal, M. Chakraborty, R. Debnath, and B. K. Gupta, "Spectrophotometric method for estimation of leflunomide in bulk and tablets," *Asian J. Chem.*, vol. 22, no. 2, pp. 1649–1651, 2010.
- [133] R. B. Friedrich, M. C. Fontana, R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann, and S. S. Guterres, "Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions," *Quim. Nova*, vol. 31, no. 5, pp. 1131–1136, 2008.
- [134] R. Singh, P. Kesharwani, N. K. Mehra, S. Singh, S. Banerjee, and N. K. Jain, "Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 41, no. 11, pp. 1888–1901, 2015.
- [135] A. K. D. Gurpreet Singh, Tanurajvir Kaur, Ravinder Kaur, "Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-," *Int. J. Pharmacol.*, no. January 2014, pp. 30–42, 2014.

- [136] M. E. S. R. e S. Anamaria Teodora Coêlho Rios Silva, Barbara Camilla Oliveira Cardoso, "Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 06, no. 01, pp. 8–19, 2015.
- [137] N. M. E.-M. El-Sayyad, A. Badawi, M. E. Abdullah, and N. S. Abdelmalak, "Dissolution enhancement of leflunomide incorporating self emulsifying drug delivery systems and liquisolid concepts," *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.*, vol. 55, no. 1, pp. 53–62, 2017.
- [138] J. Padmapreetha and K. S. G. Arulkumaran, "Effect of Kolliphor el on dissolution rate of Leflunomide Liquisolid compacts," *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 586–593, 2016.
- [139] N. Sultana, M. S. Arayne, and M. M. Khan, "Synthesis , Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Metal Complexes of 5-Methyl- Isoxazole-4- Carboxamide on Carrageenan Induced Arthritic Rats," 2014.
- [140] R. . Müller, C. Jacobs, and O. Kayser, "Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 1, pp. 3–19, 2001.
- [141] Y. Zhang, T. Shams, A. H. Harker, M. Parhizkar, and M. Edirisinghe, "Effect of copolymer composition on particle morphology and release behavior in vitro using progesterone," *Mater. Des.*, vol. 159, pp. 57–67, 2018.
- [142] T. Ishihara, T. Kubota, T. Choi, and M. Higaki, "Treatment of Experimental Arthritis with Stealth-Type Polymeric Nanoparticles Encapsulating Betamethasone Phosphate," vol. 329, no. 2, pp. 412–417, 2009.
- [143] J. Rosas and J. Pedraz, "Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica," *Rev. Colomb. Ciencias Químico - Farm.*, vol. 36, no. 2, pp. 134–153, 2007.
- [144] F. Y. Han, K. J. Thurecht, A. K. Whittaker, and M. T. Smith, "Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–11, 2016.
- [145] R. H. Ansary, M. B. Awang, and M. M. Rahman, "Biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-based micro/nanoparticles for sustained release of protein drugs - A review," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 13, no. 7, pp. 1179–1190, 2014.
- [146] P. Dimitrova, A. Skapenko, M. L. Herrmann, R. Schleyerbach, J. R. Kalden, and H. Schulze-Koops, "Restriction of De Novo Pyrimidine Biosynthesis Inhibits Th1 Cell Activation and Promotes Th2 Cell Differentiation," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 6, pp. 3392–3399, 2002.
- [147] S. Endo, Y. Toyoda, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi, "Stimulation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activation of hepatotoxic drugs," *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 27, no. 6, pp. 621–630, 2012.

- [148] S. A. Costa Lima and S. Reis, "Temperature-responsive polymeric nanospheres containing methotrexate and gold nanoparticles: A multi-drug system for theranostic in rheumatoid arthritis," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 133, pp. 378–387, 2015.
- [149] M. Noori Koopaei *et al.*, "Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect," *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 819–833, 2014.
- [150] A. S. Guedj *et al.*, "Preparation, characterization, and safety evaluation of poly(Lactide-co-glycolide) nanoparticles for protein delivery into macrophages," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 5965–5979, 2015.