



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación antiinflamatoria de un sistema nanoacarreador en gel que
contiene penicilamina para el tratamiento de ratones CBA como modelo
experimental de artritis reumatoide.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Berenice Campos Castilla

Director de Tesis: Dra. María Teresa Corona Ortega

CD.MX. 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Gracias a la UNAM, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme sus puertas, por ser para mí una segunda casa y un lugar donde viví experiencias tanto personales como profesionales únicas. Por todo el apoyo profesional de cada uno de los profesores que imparten las materias que me hicieron formarme como una persona y como profesionista.

A mi directora de tesis la **Dra. María Teresa Corona Ortega**, mi más profundo y enorme agradecimiento por haberme recibido para realizar mi servicio social, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, gracias por confiar en mí y permitirme desarrollar mi proyecto, con una idea que no sabía si funcionaría. Gracias por su orientación en cada uno de los obstáculos que se me presentaron, por sus conocimientos transmitidos, le agradezco sobre todo por su paciencia y el tiempo invertido en mí.

El haber trabajado al lado de una investigadora de su talla fue una experiencia sumamente enriquecedora, realmente le agradezco mucho que me abriera las puertas y la oportunidad que me dio, todo el camino que recorrí para hacer realidad este trabajo.

A los sinodales asignados **M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara**, gracias a sus observaciones y comentarios me permitieron enriquecer este trabajo, al **Q.F.B. Arturo Valle Mendiola** por haberme asesorado en mis dudas que surgieron al terminó, al **Dr. Rubén Marroquín Segura** por el apoyo el modelo de inflamación crónica y al **Dr. Valentín Islas Pérez** por sus observaciones. Gracias por cada una de sus observaciones en la revisión de este trabajo, por dedicarle su valioso tiempo en la evaluación de este trabajo.

Al **Dr. Ramón Soto Vásquez**, y la **Dra. Rosalva Rangel Corona** por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Al personal del Bioterio en especial **MVZ Adriana Altamirano**, por el apoyo para el cuidado de mis ratoncitos.

A mis compañeros de laboratorio Leonardo Trujillo, Edgar Torres por el apoyo en el laboratorio, Airi Mateos y Adrián Vargas gracias por el apoyo que me brindaron con la parte práctica de los ratones.

A Sergio, Marco, Fernanda, Jannette, Zeit, Paola y al resto de mis compañeros por momentos gratos dentro en el laboratorio, por esas tardes inolvidables de juegos y pizza que compartimos después de terminar nuestros respectivos trabajos.

A los técnicos José Chavarría y Juan Navarrete, por la excelente labor de esterilización y procuración de mi material, también por esas charlas tan amenas para terminar el día.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Oncología celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) FES Zaragoza, UNAM bajo la dirección de la Dra. María Teresa Corona Ortega. Agradecemos el apoyo proporcionado por la DGAPA, UNAM a través del proyecto PAPIIT IN216018.

Dedicatoria

Dedicado a mí querida madre, que es mi guía en la vida, que con sus consejos y su apoyo me ha guiado al camino correcto, el día que tome la decisión de estudiar la carrera de QFB fue el inicio de un mar de aventuras a la que estaba dispuesta a asumir, y ella se aventuró conmigo. Gracias por estar en el momento preciso y extenderme la mano, gracias mamá de verdad, estaré infinitamente agradecida por creer en mí, por el apoyo que me has brindado, por la confianza que depositaste en mí me permitió abrir mis alas para lograr lo que me proponga.

Mis logros que he alcanzado también son tus logros madre, tú has sido parte importante para llegar hasta aquí, sin embargo esto no ha terminado todavía me seguirás acompañando en mi camino a ejercer mi profesión

Lo fácil ya lo hice, lo difícil lo estoy haciendo y lo imposible me tardare pero lo lograré.

Para mi padre gracias por ser un ejemplo perfecto de esfuerzo y sacrificio, que me ha enseñado que para alcanzar lo que quieres debes de trabajar duro, gracias por tu apoyo que me brindaste para mi educación.

A mi familia que me han acompañado a lo largo de mi vida, a mi sobrina Daniela quien dibuja una sonrisa en mi rostro con sus travesuras y ocurrencias, con quien he compartido muchas alegrías, quien me animaba a concluir este trabajo. A mis abuelos que esperan con grandes ansias la culminación de esta etapa, nadie merece vivir con dolor, cuando te invade lo más conveniente es buscar el tratamiento más adecuado. También quiero agradecer a NRT me diste valiosas lecciones, fuiste de gran ayuda en determinados momentos, cambiaste realmente mi panorama de percibir la vida.

A mis amigas Sara y Ana las admiro a cada una por lo que han conseguido, la verdad muchas gracias ABJ's, me hicieron pasar los momentos difíciles y estresantes más soportables, ahora estoy a punto de terminar esta etapa y la verdad son de la personas que me gustaría conservar en la vida, espero que estas palabras puedan expresar al menos un poco de lo que siento.

Más que amigos los considero mis hermanos Moni, Les, Ivon y Choco, la amistad de la que nos hicimos nos ha permitido disfrutar de aventuras y locuras que nos permiten cambiar de vez en cuando la rutina.

“Si alguna vez hubo un nombre inapropiado, fue el de “ciencia exacta”. La ciencia siempre ha estado llena de errores. El día de hoy no es la excepción. Nuestros errores son buenos errores; porque requieren de la genialidad para corregirlos.”

Edward Teller

Nunca dejes de soñar. Nunca dejes de creer. Nunca te rindas. Nunca dejes de intentarlo y nunca dejes de aprender.

Roy T. Bennett

Índice

1	Glosario	7
2	Introducción.....	9
3	Marco Teórico.....	11
3.1	Liposomas.....	11
3.1.1	Definición.....	11
3.1.2	Lípidos: formulación liposomal.....	12
3.1.3	Clasificación.....	15
3.1.4	Usos	16
3.2	Artritis Reumatoide (AR)	19
3.2.1	Afección.....	19
3.2.2	Factores Generadores.....	21
3.2.3	Tratamientos para AR.....	23
3.3	D-penicilamina	25
3.3.1	Propiedades Generales	25
3.3.2	Usos	28
3.3.3	Efectos adversos	29
3.4	Formas Farmacéuticas.....	29
3.4.1	Gel.....	30
3.5	Estudios de Estabilidad.....	31
3.6	Citometría de flujo	34
3.7	Modelo animal.....	36
3.8	Farmacodinamia	38
4	Planteamiento del problema.....	40
5	Objetivos.....	42
6	Hipótesis.....	43
7	Protocolo de estabilidad de acuerdo a la NOM-073.....	44
8	Material y métodos.....	48
8.1	Material	48

8.2	Método	51
8.2.1	Preparación de liposomas catiónicos que contienen D-penicilamina	51
8.2.2	Caracterización del sistema nanoacarreador liposomal por citometría de flujo	51
8.2.3	Determinación de la morfología de liposomas por microscopia electrónica de transmisión	52
8.2.4	Fabricación de Gel mucoadhesivo.....	52
8.2.5	Caracterización de gel mucoadhesivo con liposomas que contienen penicilamina (GMLP)	53
8.2.6	Evaluación del efecto antiinflamatorio	55
9	Diseño experimental.....	56
10	Resultados.....	57
11	Discusión de Resultados.....	78
12	Conclusiones.....	85
13	Perspectivas.....	86
14	Anexos.....	87
15	Bibliografía.....	93

1 Glosario

AINE's: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

AR: Artritis reumatoide

API: Principio Activo

FARME: Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad

FACS: Aria flow cytometer

FR: Factor Reumatoide

FSC: Forward Scatter

IL-1: Interleucina-1

IL-1 β : Interleucina-1 β eta

IL-7: Interleucina-7

IL-6: Interleucina-6

IL-17: Interleucina-17

IL-18: Interleucina-18

IL-23: Interleucina-23

INF- γ : Interferón gamma

LIP_VAC: Liposomas catiónicos vacíos

LOCEP: Liposomas catiónicos cargados de Penicilamina

GMLP: Gel mucoadhesivo que contiene liposomas cargados de penicilamina

NK: células asesinas naturales

MPS: Sistema fagocítico mononuclear

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Th: Células T cooperadoras

IL1-Ra: Antagonista del receptor de Interleucina-1

sIL1-RI: Receptores de Interleucina solubles I

sIL1-RII: Receptores de Interleucina solubles II

TNFR1: Receptor de factor de necrosis tumoral soluble I

sTNF-RII: Receptor de factor de necrosis tumoral soluble II

SSC: Side Scatter

PBS: Solución buffer de fosfatos

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

2 Introducción

Los liposomas pueden constituir un sistema nanoacarreador casi ideal, debido a sus propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, eficiencia y baja toxicidad; de acuerdo a su formulación y a su tamaño, se facilita la liberación controlada de los fármacos y su posible direccionamiento sitio-específico, así como la modificación de su farmacocinética; por lo anterior, es posible aumentar el índice terapéutico del fármaco o conseguir respuestas idóneas del sistema inmune.

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, cuando un fármaco se carga en liposomas se puede optimizar su penetración a través de barreras biológicas, la retención en el sitio de administración y la distribución en el tejido; así como también la velocidad de eliminación del fármaco. Se ha informado en diferentes estudios que la toxicidad del fármaco puede reducirse y además aumentar su eficacia.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune que se caracteriza por un proceso inflamatorio en el revestimiento de las articulaciones, provocando un daño progresivo que afecta la calidad de vida. Se estima que 1.5 por ciento de la población mexicana tiene este padecimiento lo que le llega a causar discapacidad por el intenso dolor e inflamación en articulaciones, particularmente en manos y rodillas.

Existen varios tratamientos para los síntomas de la AR, que disminuyen la inflamación y el dolor y se usan en combinación con fármacos que pueden modificar la enfermedad. El problema es que solo pueden administrarse por tiempos cortos por los efectos adversos que se presentan si se prolonga demasiado el tratamiento.

Actualmente los liposomas han sido ampliamente investigados como sistemas de administración de fármacos en el tratamiento de la AR debido a que algunos medicamentos poseen baja biodisponibilidad, altas tasas de

eliminación y selectividad limitada, aunado a que se requiere administrar dosis altas y frecuentes para lograr una eficacia terapéutica.

En el presente proyecto se propone la utilización de un sistema de liposomas catiónicos de dimensiones nanométricas como vehículo para transportar D-penicilamina, que es usada para el tratamiento de artritis reumatoide como opción si no se responde a otros tratamientos, debido a su baja permeabilidad intestinal y efectos adversos. Existen informes que indican que la penicilamina posee propiedades inmunomoduladoras que permiten disminuir considerablemente factores asociados a la enfermedad y que disminuye los niveles del Factor Reumatoide (FR).

Por lo anterior, en el presente trabajo se diseñó y fabricó por ultrasonicación, una formulación de liposomas catiónicos que contienen D-penicilamina; con la intención de llevarla al sitio específico de la inflamación. Los liposomas se caracterizaron por medio de citometría de flujo y se procedió a formularlos en un gel mucoadhesivo para aplicación tópica.

La formulación en gel se sometió a pruebas de estabilidad que permitieron determinar las condiciones más adecuadas que no afectarían su estabilidad y eficacia. Aunado a lo anterior, se procedió a realizar pruebas de dosis-respuesta en un modelo de inflamación en ratones CBA, demostrando que el GMLP posee efecto antiinflamatorio.

3 Marco Teórico

3.1 Liposomas

3.1.1 Definición

Los liposomas son pequeñas vesículas cerradas en forma de bicapas muy ordenadas que oscilan en un tamaño de entre 50 y 450 nm; están formados por lípidos anfóteros de origen natural y/o sintético^{1,2}. Entre los componentes que integran a los liposomas destacan la fosfatidilcolina por su abundancia en las membranas biológicas y el colesterol por su capacidad de proporcionarles estabilidad².

Los liposomas fueron descritos por Alec D. Bangham en la década de 1960 en el Instituto Babraham, Universidad de Cambridge, definiéndolos como bicapas lipídicas simples o múltiples que pueden encapsular un compartimiento acuoso.¹

Como ya se mencionó, las moléculas constituyentes de los liposomas son anfipáticas lo que significa que por un lado tienen un grupo de cabeza hidrófila (polar) y por el otro, poseen un grupo hidrófobo (apolar) (*Figura 1*); precisamente por su naturaleza anfipática, al estar dispersos en soluciones acuosas tienen una fuerte tendencia a formar vesículas, la mayoría de las veces en forma de bicapas lipídicas^{1,3}.

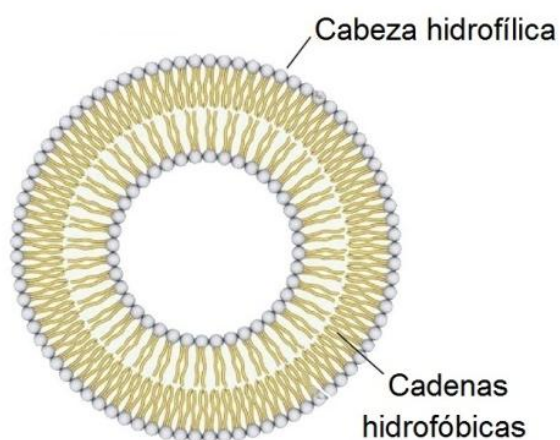


Figura 1. Conformación de los liposomas.

Las cadenas hidrófobas de cada lado de la bicapa se enfrentan entre sí y constituyen un compartimento interno lipófilo que actúa como una barrera de permeabilidad, tanto hacia adentro como hacia afuera. Las interacciones hidrófobas impulsan la formación de estas bicapas lipídicas y las fuerzas de Van der Waals mantienen juntos a los grupos apolares tales como son las largas colas de hidrocarburos o el anillo esteroide. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones polares que se dan entre las moléculas de agua y las partes polares de los lípidos permiten que se estabilicen.^{1,2}

El grado de saturación o la longitud de las cadenas acilo puede afectar las interacciones de las fuerzas de van der Waals entre las cadenas vecinas, por lo que fosfolípidos con cadenas de hidrocarburos más largas y saturadas al interactuar entre sí, permiten formar estructuras con bicapas rígidamente ordenadas¹. Lo anterior permite jugar con las características de los componentes como son sus propiedades fisicoquímicas, la naturaleza de los lípidos anfipáticos de que están constituidos, su tamaño, su carga superficial y la organización lipídica, para prevenir que el contenido del liposoma pueda ser blanco de la degradación enzimática, de la inactivación inmunológica e incluso de la degradación química para mejorar la capacidad de los liposomas como sistema transportador, además de que los liposomas pueden dirigirse selectivamente permitiendo la administración sitio-específica de fármacos; por ejemplo, anticancerígenos, anti fúngicos, antiinflamatorios y genes terapéuticos, entre otros².

3.1.2 Lípidos: formulación liposomal

Los liposomas están compuestos por lípidos anfipáticos que tienen una cabeza polar, cargada o no, hidrofílica y al menos una cadena alifática hidrófoba^{1,2,4}. Debido a su naturaleza anfipática los lípidos tienen una fuerte tendencia a formar membranas, puesto que sus cabezas polares promueven interacciones acuosas y sus largas cadenas alifáticas apolares provocan la formación de una bicapa lipídica (*Figura 2*)^{5,6,7}.

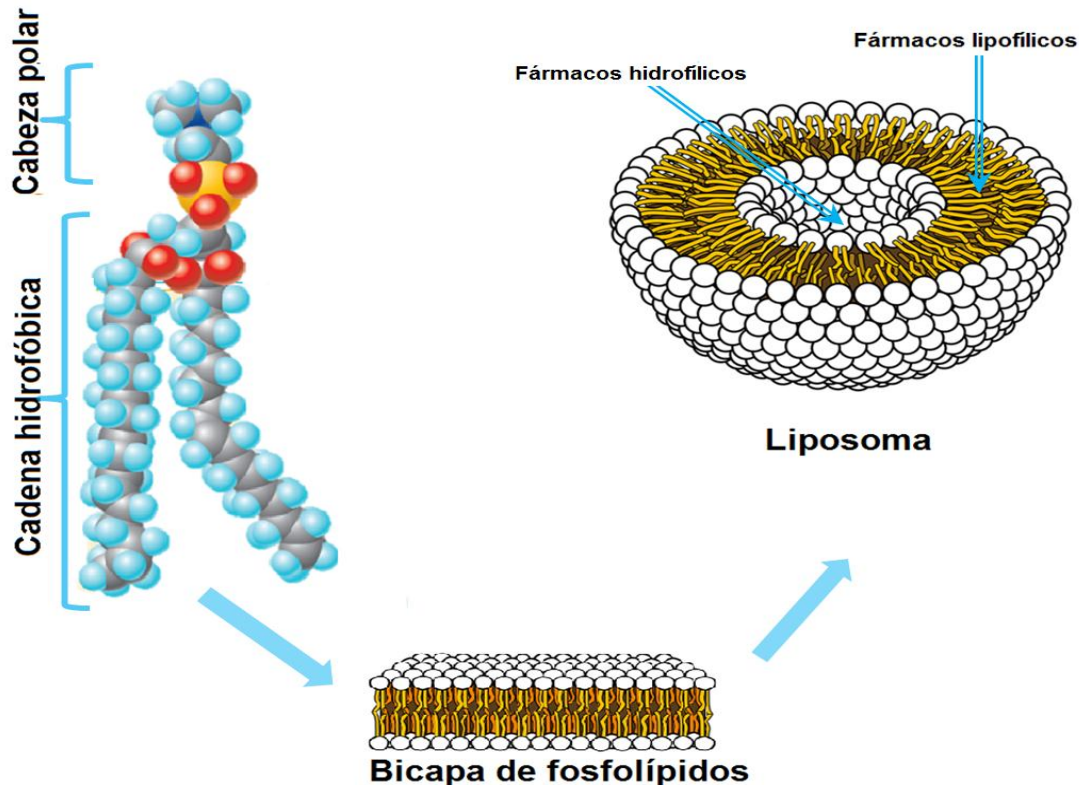


Figura 2. Esquema de la estructura de la bicapa formada por fosfolípidos y el atrapamiento de fármacos lipofílicos e hidrofílicos en el liposoma.

La mayoría de los liposomas son fabricados principalmente por fosfolípidos naturales, generalmente son inmiscibles para soluciones acuosas pero muy solubles para solventes orgánicos.

Los fosfolípidos son los lípidos más comúnmente utilizados en la elaboración de liposomas. La variabilidad de éstos depende de los grupos acilo enlazados a los carbonos del esqueleto de glicerol y a que grupo de cabeza complementa al fosfato unido al tercer carbono. Algunos ejemplos de estos son: ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. Dentro de los fosfolípidos, la fosfatidilcolina es la más utilizada (Tabla 1)⁵, puesto que es el fosfolípido más abundante en las membranas celulares y es fácilmente extraíble de la semilla de soja y de la yema de huevo^{5,8}.

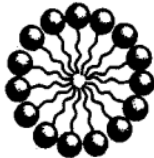
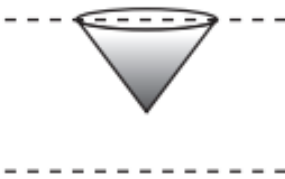
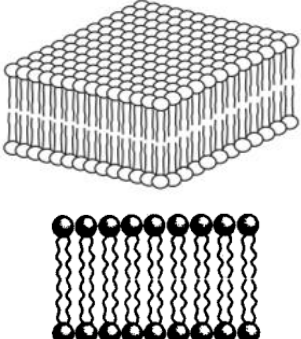
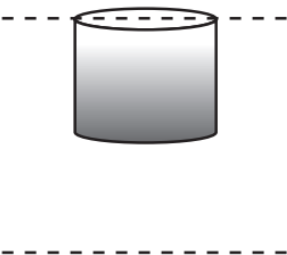
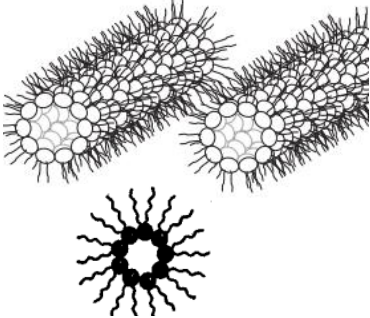
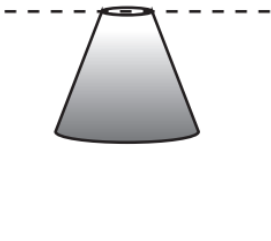
Lípidos	Fase estructural	Forma molecular
<p>Lisofosfolípidos</p> <p>Detergentes</p>	 <p>Micela</p>	
<p>Fosfatidilcolina</p> <p>Esfingomiolina</p> <p>Fosfatidilserina</p> <p>Fosfatidilinositol</p> <p>Fosfatidilglicerol</p> <p>Ácido fosfatídico</p> <p>Cardiolipina</p> <p>Digalactosil diacilglicerol</p> <p>Diglucozil diacilglicerol</p>	 <p>Bicapas</p>	 <p>Cilíndrica</p>
<p>Fosfatidiletanolamina</p> <p>Cardiolipina - Ca^{2+}</p> <p>Ácido fosfatídico - Ca^{2+}</p> <p>Ácido fosfatídico (pH <3.0)</p> <p>Fosfatidilserina (pH <4.0)</p> <p>Monogalactosil diacilglicerol</p> <p>Monoglucozil diacilglicerol</p>	 <p>Hexagonal (H_{II})</p>	 <p>Cono</p>

Tabla 1. Lípidos utilizados en los liposomas y formas moleculares dinámicas que adoptan los lípidos de acuerdo a su composición.

3.1.3 Clasificación

Los liposomas se pueden clasificar según el método de preparación (vesículas de evaporación en fase inversa, sonicación o técnica de extrusión de vesículas), por su tamaño (pequeño, intermedio o grande) y lamelaridad (vesículas uni, oligo y multilamelares). La formación de vesículas unilamelares (ULV) o vesículas multilamelares (MLV) depende de los métodos de síntesis y procesamiento que se utilicen para su formación (*Tabla 2*)^{2,8,9}.


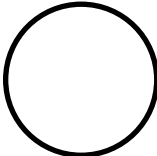
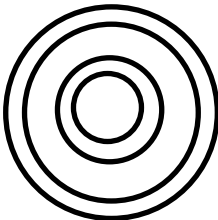
Cantidad de lamelas	Nombre		Características
Unilaminares	SUV Vesícula unilamelar pequeña (Small Unilamelar Vesicle)	 SUV 20-100	Debido a su elevado radio de curvatura, presentan una importante relación superficie/lípido. El porcentaje de encapsulación es bajo no es recomendable para moléculas hidrosolubles.
	LUV Large Unilamelar Vesicle	 LUV > 100nm	Bicapa lipídica, 100–250 nm. Presentan una elevada capacidad de encapsulación. El elevado volumen del compartimiento interno permite una encapsulación eficaz de fármacos hidrofílicos.
Plurilaminares	MLV Multilamelar Large Vesicle	 MLV > 500nm	Tiene dos o más bicapas lipídicas concéntricas organizadas, 1–5 µm. Atrapan preferentemente fármacos solubles en lípidos. Además de la capacidad de atrapar medicamentos con diferentes características de solubilidad.

Tabla 2. Clasificación de los liposomas.

Métodos de Fabricación

Es de suma importancia las características del liposoma a diseñar y las del fármaco a contener, se tienen que tomar ciertas consideraciones; como son las propiedades fisicoquímicas de los componentes, la concentración de la sustancia cargada, la toxicidad, el tamaño e incluso la aplicación terapéutica.

Uno de estos métodos es por hidratación de una delgada película de lípidos anfipáticos que es el método de preparación más utilizado para fabricar liposomas. Los componentes lipídicos con o sin un fármaco se disuelven en un disolvente orgánico, el disolvente se evapora, seguido de la rehidratación de la película en un disolvente acuoso. Otros métodos son la evaporación en fase reversa, el secado por congelación e inyección de etanol, la extrusión por membranas de tamaño de poro reducido, la sonicación, la homogeneización y la congelación-descongelación, estos métodos ayudan a controlar el tamaño y la lamellaridad que se requiere ^{1, 2, 9}.

Para su fabricación por sonicación se requiere utilizar un instrumento que aporte ondas de ultrasonido a la suspensión, las cuales transfieren un aporte de alta energía que al colocar un tubo de ensayo que contiene la suspensión de lípidos permite la formación de los liposomas, el sonicador puede ser de punta de sonda o de baño ultrasónico ^{10, 11}.

3.1.4 Usos

Los liposomas se utilizan como transportadores de numerosas moléculas en las industrias cosméticas, farmacéuticas e incluso en las industrias alimentarias y agrícolas. Se ha descrito su uso de la encapsulación de antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes y elementos bioactivos para proteger su funcionalidad. Como ya se mencionó, los liposomas pueden atrapar compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, evitar su descomposición y liberarlos en objetivos específicos ^{8, 12}.

La encapsulación de fármacos en liposomas mejoró los índices terapéuticos de diversos fármacos, principalmente a través de alteraciones en su farmacocinética

y farmacodinámica. Los fármacos con diferente solubilidad pueden encapsularse en liposomas, los fármacos hidrófobos tienen afinidad con la bicapa de fosfolípidos y los fármacos hidrófilos quedan atrapados en la cavidad acuosa¹.

El uso de liposomas como sistema de administración de medicamentos, se ha dado gracias a sus características como son baja toxicidad, biocompatibilidad, menores tasas de eliminación, una administración selectiva al sitio de acción, así mismo una liberación controlada de fármacos y un índice terapéutico mejorado^{1,2}. Los fármacos cargados en liposomas no son biodisponibles; solo se vuelven biodisponibles cuando son liberados, el optimizar la velocidad de liberación de un fármaco es una forma de alcanzar su nivel dentro de su ventana terapéutica y en una velocidad y período suficiente para mejorar su actividad, terapéutica y/o una toxicidad reducida en comparación con el fármaco libre^{1,3}.

De acuerdo con estudios clínicos realizados en los últimos años, los medicamentos antitumorales cargados en liposomas demostraron la reducción de su toxicidad, al tiempo que aumentaron la eficacia¹. En general, el cambio en la farmacocinética de los fármacos liposomales puede conducir a una mejor biodisponibilidad del fármaco para células diana que se encuentran en la circulación, estos vehículos también se llegan a utilizar para enfermedades parasitarias que normalmente existen en las células del sistema fagocítico mononuclear (MPS) como por ejemplo leishmaniasis y algunas otras infecciones fúngicas e incluso en sitios de enfermedades extravasculares^{1,3}; por ejemplo, tumores, algunos ejemplos son el uso de vincristina, doxorubicina y anfotericina así como también los que se muestran en la (*Tabla 3*)^{1,2}.

Ejemplos	Molécula Activa	Beneficios de la carga de Fármaco en liposomas
Ambisome®, Marqibo®	Anfotericina B, antraciclinas (Vincristina).	Solubilidad mejorada de fármacos lipofílicos y anfifílicos
Visudyne®, Vacuna Novasome®	Porfirinas (verteporfin), vacunas, inmunomoduladores.	Orientación pasiva a las células del sistema inmune, especialmente células del sistema fagocítico mononuclear.
DOXIL/ CAELIX, DepoCyt(intratecal)	Doxorrubicina, citosina arabinósido, cortisonas, proteínas biológicas o péptidos tales como vasopresina.	Sistema de liberación sostenida de forma sistémica o local. liposomas administrados
Dolant®, Myocet®	Medicamentos antiinflamatorios (Diclofenaco), anticancerígenos, antiinfecciosos.	Orientación específica del sitio.
Mykasome®	Antibióticos (amikacina), quelantes, plásmidos y genes.	Transferencia mejorada de moléculas hidrofílicas cargadas.
ELA-Max®	Corticosteroides, anestésicos (lidocaína) e insulina.	Penetración mejorada en los tejidos.

Tabla 3. Liposomas comercializados así como algunos beneficios que obtuvieron con las formulaciones que contienen liposomas.

3.2 Artritis Reumatoide (AR)

3.2.1 Afección

Se estima que 1.5 por ciento de la población mexicana padece AR, la cual llega a causar discapacidad por el intenso dolor e inflamación en articulaciones, particularmente en manos y rodillas ¹³.

La AR es una enfermedad sistémica crónica autoinmune. Se caracteriza por la inflamación persistente de la membrana sinovial, que provoca la destrucción progresiva del cartílago articular y del hueso (*Figura 3*) ^{14,15}.

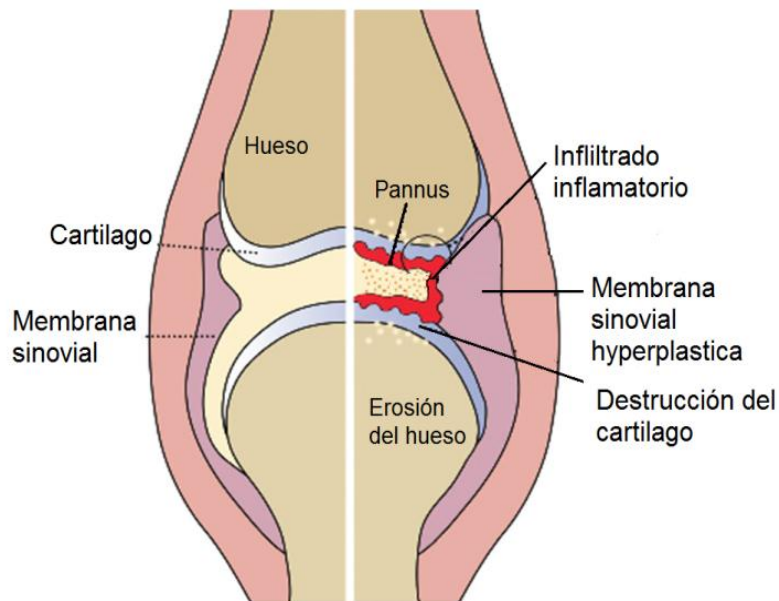


Figura 3. Esquema de articulación afectada por AR.

La AR al ser una enfermedad autoinmune provoca no solo la inflamación sino incluso con el tiempo la destrucción de tejidos por anticuerpos propios llegando a ser incapacitante, afectando tanto a las articulaciones pequeñas y medianas como la columna cervical y cadera que reducen progresivamente la movilidad. Lo anterior es importante porque este padecimiento se presenta en mayor medida entre personas 35 y 50 años de edad ¹⁴.

La membrana sinovial es una estructura especializada que tapiza la cara interna de las articulaciones y las vainas de los tendones, además contiene células inmunitarias, por lo que es un lugar donde se producen reacciones inflamatorias¹⁶.

La inflamación del tejido sinovial implica interacciones entre citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, como macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos sinoviales y otras células del sinovio inflamado, como los mastocitos, las células dendríticas y las células plasmáticas^{15,17}. Además es importante mencionar que los macrófagos activados son los principales efectores de la inflamación en la AR al liberar continuamente citocinas proinflamatorias como son el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que es un potente estimulador de las células productoras de mediadores inflamatorios y las interleucinas IL-6 e IL-1, así como intermediarios reactivos de oxígeno, entre otras¹⁷.

El sistema inmunitario tiene como objetivo proteger al organismo de elementos que representan una amenaza, como son los microorganismos o las células tumorales. La inflamación es una respuesta protectora normal a una lesión tisular causada por traumatismos físicos, sustancias químicas o agentes microbianos; en el cual el organismo inactiva o destruye a los microorganismos invasores, elimina las sustancias irritantes y sienta las bases para la reparación del tejido; sin embargo, en la AR los leucocitos perciben a la membrana sinovial como un elemento desconocido e inician un ataque, lo que desencadena un proceso inflamatorio.^{16,18}

El proceso inflamatorio se inicia por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas, generando una respuesta de las células T, lo que a su vez activa macrófagos además de fibroblastos sinoviales y por último quimiocinas, cuyo efecto final en la AR es la destrucción del cartílago y el hueso subyacente. Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular (< 30 kD) con vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, actúan como mediadores de transmisión de señales intra e intercelulares¹⁷.

3.2.2 Factores Generadores

Las citocinas proinflamatorias se liberan debido a la secreción de mediadores proinflamatorios, estas actúan como moléculas efectoras, tales como el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y la IL-17 siendo éstos los principales factores que provocan el proceso inflamatorio crónico en la AR que a su vez produce la estimulación de la degradación del cartílago. Esto ocurre a través de la proliferación del tejido sinovial llamado pannus que invade el cartílago con la ayuda de enzimas proteolíticas^{18,19}.

Las células en la membrana sinovial inflamada y del pannus liberan más citocinas, como el interferón gamma (INF- γ) además de las citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-23 que contribuyen a la inflamación y que pueden afectar directamente al hueso y potenciar la actividad de otras citocinas proinflamatorias. Especialmente la IL-1 β participa en la destrucción del cartílago y hueso a través de la secreción de metaloproteinasas y la disminución de la síntesis de glucosaminoglucanos^{17,19}.

Las células T cooperadoras (Th) son un subgrupo de células T auxiliares, son las células principales de sistema inmunológico que controlan las actividades de los linfocitos así como la respuesta inmunitaria, la AR se considera una patología autoinmune debido a que las células Th17 producen selectivamente IL-17 una de las citocinas que han demostrado tener gran relevancia en el proceso de inflamación de la AR.^{20,21}

Aunque la IL-17 es producida predominante por las células T del subconjunto CD4⁺, las células del subconjunto CD8⁺ producen cantidades considerables de IL-17 del tipo a, éstas a su vez, tienen la capacidad de activar las vías proinflamatorias que estimulan la diferenciación de los osteoclastos e inducen la degradación directa de los proteoglucanos del cartílago *in vivo* y *ex vivo*. Los mastocitos son las células que presentan más receptores a la IL-17a en la membrana sinovial²²

Por su parte la IL-18 induce la activación de los linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (NKs); además induce la secreción de INF- γ e IL-23 que a su vez inducen la secreción de IL-1 β y TNF- α ²³.

Existen los inhibidores naturales de las citocinas proinflamatorias, como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL1-Ra), sIL1-RI, sIL1-RII, sTNFR1 y sTNFR2, los cuales se incrementan en la inflamación, desafortunadamente en la AR no se encuentran en cantidad suficiente como para contrarrestar el efecto inflamatorio¹⁷.

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

El TNF- α , es llamado así por su capacidad para causar tumores necróticos de forma rápida, se sabe que tiene funciones pleiotrópicas que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la activación y la apoptosis. El TNF- α se produce principalmente por macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos durante la inflamación aguda²⁴

El TNF- α puede inducir inflamación articular y proliferación de fibroblastos sinoviales, desencadenando la destrucción del cartílago al inducir la colagenasa que inhibe la síntesis de proteoglicanos por los condrocitos articulares y estimula osteoclastogénesis y resorción ósea²⁴.

3.2.3 Tratamientos para AR

Existen varios tratamientos para la AR cuyo objetivo es disminuir los síntomas, como la inflamación y el dolor, además de disminuir el daño articular en lo posible.

3.2.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)

El tratamiento de primera instancia son los AINE's que tienen efectos antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos, controlan la inflamación y el dolor en la AR y son superiores a los analgésicos como el paracetamol. No existe diferencia en la eficacia entre los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX) y los AINE's no selectivos ^{14,25,26}.

Los efectos secundarios de los AINE's son dependientes de la dosis y la duración del tratamiento, siendo los principales efectos en el tracto gastrointestinal, la retención de líquidos e hipertensión, los efectos adversos aumentan con la edad, lo que limita su utilidad clínica en la población geriátrica ²⁵. Sin embargo, cuando se han confirmado el diagnóstico de AR y la progresión grave de la enfermedad reumática, la otra opción es administrar un fármaco modificador de la enfermedad (FARME), el cual controla su actividad o retrasa la progresión del daño articular ²⁶.

3.2.3.2 Corticoesteroides

Los corticoesteroides son medicamentos esteroideos que se administran a los pacientes con AR para reducir la inflamación y ayudar a regular la actividad autoinmune ya que reducen los niveles de inflamación que a su vez causan dolor en las articulaciones, rigidez y deterioro de los huesos y cartílagos. Los corticoesteroides también actúan como inhibidores del sistema inmunitario (o moduladores inmunitarios) al suprimir la formación de anticuerpos y los ataques subsiguientes que causan inflamación en los pacientes con AR ²⁵.

3.2.3.3 Modificadores de respuesta biológica (MRB)

Existen también los fármacos biológicos que modifican la respuesta biológica (MRB), actuando en AR como agentes bloqueadores del TNF- α , algunos de éstos son infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab y certolizumab. Estos agentes tienen efectos variados a nivel molecular que incluyen la unión de TNF- α soluble y la inducción de la apoptosis de las células que expresan TNF- α ²⁷.

Debido a su costo y perfil de efectos secundarios, el uso de biológicos generalmente se recomienda después de que los pacientes hayan fallado en el uso de la terapia convencional o combinada con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (*FARME*)²⁷.

3.2.3.4 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

Los FARME, actúan disminuyendo la inflamación al suprimir la hiperactividad del sistema inmunológico y ralentizan la progresión, pero el grado en que esto se logra es variable²⁸.

Algunos FARME para uso en AR incluyen: cloroquina, leflunomida, metotrexato, ciclosporina A, sulfasalazina y D-penicilamina, siendo esta última un principio activo que actúa como inmunosupresor en AR²⁸.

Hoy en día se han desarrollado algunas formulaciones de liposomas para modelos de inflamación como por ejemplo glucocorticosteroides encapsulados en liposomas (GCS), antiinflamatorios no esteroideos (AINES), enzimas antioxidantes y radioisótopos.

3.3 D-penicilamina

La penicilamina es el producto de degradación de la penicilina pero no tiene actividad antimicrobiana. Fue aislado por primera vez y caracterizado en 1943.

3.3.1 Propiedades Generales

*Nombre genérico: D-penicilamina; Penicilamina; Cuprimina, Dimetilcisteína, Metalcaptasa, Adalcan y Sufortan ²⁹.

*Fórmula condensada: C₅H₁₁NO₂S (Figura 4)

Su nombre químico *Ácido 2-amino-3-metil-3-sulfanilbutanoico* ²⁹.

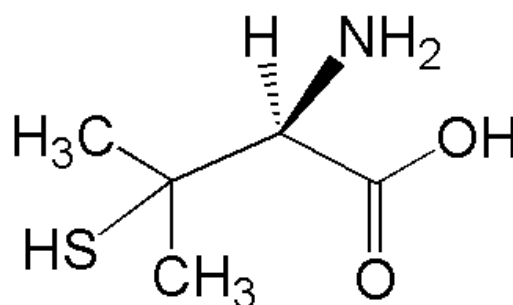


Figura 4. Fórmula desarrollada de Penicilamina.

Propiedades físicas

Es un polvo fino, prácticamente blanco, de olor característico y sabor ligeramente amargo. Su peso molecular es 149,208 g/mol, posee un punto de fusión entre 202-206 °C, soluble en agua (100 mg/mL), ligeramente soluble en etanol, insoluble en cloroformo, presenta un polimorfo, por espectroscopia infrarroja (Figura 4) y cristalografía de rayos X se encuentra entre picos a 1078 y 1101 cm que son menos intensos que los picos adyacentes a aproximadamente 1050 y 116 cm de difracción, mientras que el polimorfo 1 tiene un pico de absorción (Figura 5) a 1092 cm de difracción que es más intenso que los picos adyacentes a aproximadamente 1050 y 1160 cm, esto indica que puede existir como dos enantiómeros, los isómeros D y L, el primero es el que tiene uso clínico, mientras el último no puede ser usado debido a su exceso de toxicidad ^{29,30}.

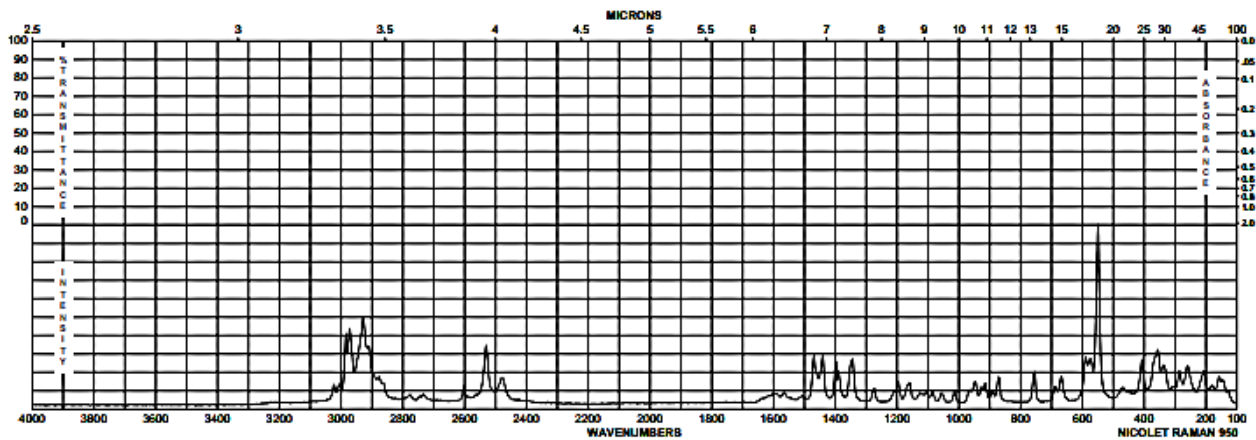


Figura 5. Espectro de I.R. de Penicilamina.

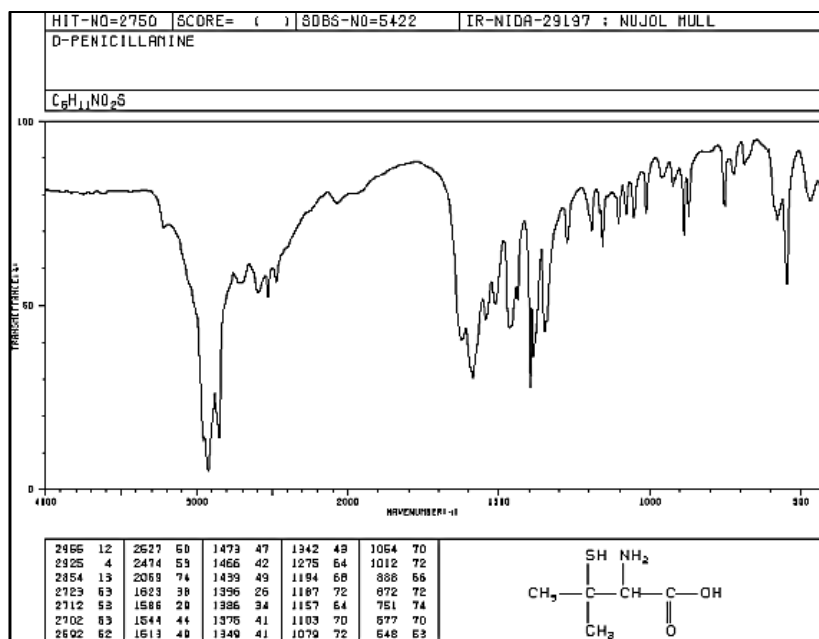


Figura 6. Espectro de Absorción de Penicilamina.

Las condiciones para la identificación por cromatografía de la penicilamina son las siguientes proporciones de la fase móvil y estacionaria³⁰ (Tabla 4 y 5)

Solvente		Rf
Butanol – Ácido acético glacial – Agua	(120:30:50)	19
Solvente A -Fenol – Agua	(160: 40)	50
Solvente A Hidróxido de amonio concentrado	(200:1)	55
Solvente A -Etanol – Agua	(150:40:10)	33
Etanol – Agua – Hidróxido de amonio concentrado	(180:10:10)	11
Metanol – Agua – Piridina	(160:40:8)	42
2-propanol – ácido fórmico – Agua	(75:12.5:12.5)	73

Tabla 4. Sistemas de elución para cromatografía de Penicilamina.

Fase Estacionaria	Solventes	Visualización
Sílica Gel	Acetato de butilo – Metanol – Butanol – Agua – AcOH (75:45:45:30:7.5)	2% Ninhidrina en etanol (p/v)
Sílica Gel	2-isopropanol – Agua (85:15) Butanol – Ácido acético – Agua (75:18:18) Metanol – Agua (64:36)	Ninhidrina rociado

Tabla 5. Fase estacionaria. Sistemas para cromatografía en capa fina.

3.3.2 Usos

La penicilamina funciona como un agente quelante utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Wilson, también se utiliza para reducir la excreción de cistina en la cistinuria y en el tratamiento de la AR severa que no responde a otros tratamientos^{30,31}.

En el caso de la AR, la penicilamina tiene propiedades inmunomoduladoras lo que significa que tiene la capacidad de aumentar o disminuir la respuesta inmune debido a que puede llegar a alterar los receptores de la superficie celular mediante la reducción de grupos sulfhidrilos, también genera peróxidos que afectarían a las distintas funciones celulares (linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos alterando receptores de la membrana de linfocitos T, reduciendo el número de éstos y de macrófagos e inhibiendo la función de la IL-1 y el TNF- α , debido a la interacción con el grupo tiol; por lo que es un principio activo útil para esta enfermedad ^{30,31}.

Se han propuesto dos mecanismos de acción para la D-penicilamina, por una parte, su molécula contiene un grupo tiol que podría alterar los receptores de la superficie celular mediante la reducción de grupos sulfhidrilos; por otra, la oxidación de la D-penicilamina puede originar grupos peróxidos que afectarían a las distintas funciones celulares (linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos)²⁸.

La dosis en adultos es de 1.5 mg/kg, la cual puede ir aumentando si se requiere durante varios meses hasta 3 mg/kg. Las dosis preestablecidas para el tratamiento de AR con penicilamina se inician a partir de 125 o 250 mg/día, y luego se va incrementando en intervalos de uno a tres meses en 125 o 250 mg/día, según la respuesta del paciente y su tolerancia al fármaco, la dosis final oscila entre 500 mg-1500mg ^{32,33}.

Debido a su toxicidad por vía oral y su baja disponibilidad, el uso de penicilamina para AR se ha suspendido y se limita a aquellos pacientes que tienen una enfermedad activa grave y que no han respondido a un tratamiento convencional.

También se tiene reportado que la D-penicilamina ha sido utilizada para tratar el envenenamiento por plomo, vasculitis, síndrome de Sjögren, esclerodermia, cirrosis biliar primaria; sin embargo, actualmente ya no se utiliza como un tratamiento de primera instancia por su baja absorción y sus efectos adversos ³⁰.

3.3.3 Efectos adversos

Los efectos adversos de la D-penicilamina que se han reportado en la literatura son trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, ulceración oral y estomatitis³¹.

Además, pueden presentarse reacciones agudas de sensibilidad manifestada por erupciones cutáneas que aparecen en las primeras etapas del tratamiento y que pueden asociarse a prurito, urticaria y fiebre. Los efectos adversos hematológicos incluyen trombocitopenia y frecuentemente leucopenia; éstos son generalmente reversibles, pero en la agranulocitosis y anemia aplásica se han reportado daños fatales ^{31,34}.

Otro efecto que ocurre frecuentemente es la proteinuria y en algunos pacientes puede desarrollarse glomerulonefritis o síndrome nefrótico. Cuando la D-penicilamina induce hematuria se debe discontinuar inmediatamente el tratamiento. También se ha presentado nefrotoxicidad en algunos pacientes después de una prolongada administración o en dosis altas del fármaco³⁴.

3.4 Formas Farmacéuticas

Las formas farmacéuticas permiten administrar el fármaco de una forma segura, eficaz, reproducible y adecuada; la administración dependerá para qué está destinado; además, de las propiedades del principio activo (API), de la vía de administración e incluso de la biodisponibilidad. Existen formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, líquidas y dispersas en una fase gaseosa. La importancia que tiene el uso de cada forma farmacéutica es la de resolver algunos problemas de interacción química, solubilizar principios activos insolubles, mejorar sabores y

mejorar aspecto, entre otras. Dependiendo de cómo se encuentre el API con los excipientes se facilitará su dosificación y administración.

Existen ciertas consideraciones principales para elegir una forma farmacéutica, como son las propiedades fisicoquímicas del propio fármaco, consideraciones biofarmacéuticas como la elección de la vía de administración ya que de ésta depende la velocidad de la absorción del fármaco, frecuencia de dosis, duración del efecto farmacéutico y por último las consideraciones terapéuticas sobre la enfermedad a tratar³⁵.

3.4.1 Gel

El gel es una preparación semisólida, que contiene el o los fármacos y aditivos, constituido por lo general por macromoléculas dispersas en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, formando una red que atrapa al líquido y le restringe movimiento, por lo que son preparaciones viscosas³⁶. Su vía de administración es tópica.

En la formulación de un vehículo para la aplicación tópica de fármacos deben considerarse varios factores como la estabilidad del fármaco, el uso específico del producto, el sitio de aplicación y que al combinarse el API con la forma farmacéutica quede disponible de forma tal que al encontrarse en contacto con la piel el API se libere³⁷.

Los liposomas proporcionan una administración eficaz y conveniente de fármacos; sin embargo, se requiere formular en una forma farmacéutica para poder administrar una suspensión, un aerosol o formas semisólidas como gel, crema y loción. Los liposomas pueden administrarse a través de diferentes vías como oral, intramuscular, subcutánea y tópica. La piel es el órgano más grande del cuerpo, su accesibilidad y la posibilidad de mantener aplicada por un tiempo prolongado una forma farmacéutica, permite obtener un efecto local, regional e incluso sistémico.

3.5 Estudios de Estabilidad

Teniendo en cuenta que se requiere garantizar la eficacia de un medicamento desde que es fabricado hasta que llegue al paciente; es importante asegurar que se mantiene su calidad debido a que puede pasar un periodo prolongado hasta el momento de su consumo. Por lo anterior, es necesario someterlo a diversas pruebas por un tiempo determinado que permitan determinar su estabilidad. De lo anterior la importancia de contar con evidencia documentada del fármaco o medicamento garantizando su seguridad y eficacia.

Los estudios de estabilidad son las pruebas que se realizan a un fármaco o medicamento, bajo la influencia de diferentes condiciones de humedad, luz o temperatura por un periodo de tiempo, permitiendo determinar las condiciones adecuadas de almacenamiento para que puedan mantener su efectividad, calidad, potencia e identidad y se determina su fecha de caducidad³⁸.

La estabilidad de un fármaco o medicamento depende de diversos factores ambientales, así como también propiedades físicas y químicas del principio activo, de los excipientes farmacéuticos, además de los productos de degradación que se llegaran a formar, e incluso de la forma farmacéutica, de ahí la importancia para determinar la estabilidad del producto de interés a las condiciones que pueden llegar a estar expuestas, en el caso de la temperatura es un factor muy importante ya que los medicamentos llegan a sufrir variaciones durante su almacenamiento o traslado, además pueden llegar a afectados por otros factores ambientales como luz, aire, humedad e interacción con el empaque; todo dependerá de la composición de la formulación y estos estudios permiten determinar la vida útil del medicamento en condiciones de almacenamiento adecuadas^{38,39}.

Los estudios acelerados de estabilidad son diseñados con el fin de aumentar la degradación química o física de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento para simular el desgaste real en un período largo de tiempo.

En México los medicamentos o fármacos que se consumen y/o comercialicen en el país deben cumplir con la regulación sanitaria vigente, por lo que es necesario que se ajusten a ciertas Normas, como es el caso de la Norma Oficial Mexicana **NOM-073-SSA1-2015**, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como remedios herbolarios; donde se establecen las especificaciones para someterlos a estudios de estabilidad³⁸.

Con la finalidad de facilitar la interpretación encontramos las siguientes definiciones en la norma:

Calidad: al cumplimiento de especificaciones establecidas para garantizar la aptitud de uso de un fármaco, medicamento o remedio herbolario.

Condiciones de almacenamiento: a las que se indican en la etiqueta del fármaco, del medicamento o del remedio herbolario

Especificaciones de estabilidad: a los requisitos físicos, químicos y biológicos, que un fármaco, medicamento o remedio herbolario debe cumplir a lo largo de su vida útil.

Estabilidad: a la capacidad de un fármaco, un medicamento o un remedio herbolario contenido en un sistema contenedor-cierre de determinado material, para mantener, durante el tiempo de almacenamiento y uso, las especificaciones de calidad establecidas.

Estudios de estabilidad: a las pruebas que se efectúan a un fármaco, a un medicamento o a un remedio herbolario por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene, para demostrar el periodo de vida útil de éstos y determinar su fecha de caducidad.

Estudios de estabilidad acelerada: a los diseñados bajo condiciones extremas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco, de un medicamento o de un remedio herbolario.

Estudios de estabilidad a largo plazo: a los diseñados bajo condiciones de almacenaje de temperatura y humedad, que permiten comprobar de un fármaco, un medicamento o un remedio herbolario, las condiciones de almacenaje y de vida de anaquel, a través de un programa de tiempos de muestreo y de evaluación de los requisitos físicos, químicos, biológicos, que comprueban la conservación de sus propiedades durante su periodo de vida útil.

Limites microbianos: son pruebas que evalúan la calidad microbiológica de productos farmacéuticos (materias primas, productos intermedios y terminados) mediante el recuento de organismos mesofílicos aeróbicos y hongos filamentosos.

Lote de producción: al destinado para comercialización.

Lote piloto: al elaborado por un procedimiento representativo que simule al de producción. En el caso de formas farmacéuticas sólidas deberá corresponder al menos al 10% del lote de producción o 100,000 tabletas o cápsulas; en el caso de otras formas farmacéuticas se presentará justificación técnica de su tamaño.

Periodo de caducidad o vida útil: al tiempo durante el cual un medicamento o un remedio herbolario contenido en el sistema contenedor-cierre autorizado y conservado en las condiciones indicadas en la etiqueta, permanece dentro de las especificaciones establecidas.

Producto de degradación: a la sustancia que resulta de un cambio químico en el fármaco generado a través del tiempo o por efecto de algunos factores como la luz, temperatura, pH, agua, por reacción con un excipiente o con el sistema contenedor-cierre. También se llama producto de descomposición.

Protocolo de estabilidad: al diseño del estudio relativo a pruebas y criterios de aceptación, características del lote, manejo de las muestras, condiciones del estudio, métodos analíticos y materiales de envase primario y secundario.

Pruebas de fotoestabilidad: a las que indican el impacto de exposición a la luz en el fármaco, medicamento o remedio herbolario dentro y fuera de su material de empaque.

3.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica analítica cuantitativa que permite analizar múltiples características simultáneamente de células por lo general; sin embargo, pueden ser detectados eventos, partículas o vesículas individuales, a medida que fluyen individualmente a través de un haz de luz que detecta y correlaciona las señales de esas partículas, como el tamaño, granularidad relativa o complejidad interna e intensidad de fluorescencia ^{41,42}.

Es un sistema de acoplamiento óptico a electrónico, el citómetro de flujo registra cómo la célula o partícula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia, permitiendo una medición rápida, cuantitativa y precisa. Debido a que la citometría de flujo es una técnica para el análisis de partículas individuales se debe comenzar obteniendo una suspensión de ellas ⁴³.

La dispersión de la luz que emite el láser hacia las partículas que se analizan depende en gran medida de las características físicas de la partícula, específicamente la complejidad interna y el tamaño, la forma de la célula, la membrana, el núcleo y el material granular. El citómetro de flujo permite la medición de dos parámetros principales, el *Forward Scatter* (FSC) que es una medición de luz difractada detectada al eje de incidencia del láser, dando como resultado el diámetro de la célula, esto se debe a que la intensidad del FSC es proporcional a la difracción de la luz alrededor de la célula; el otro parámetro *Side Scatter* (SSC) mide la dispersión en un ángulo 90° con respecto al láser, la luz de dispersión lateral (SSC), es proporcional a la granularidad celular o la complejidad interna ^{43,44}.

Un citómetro de flujo se compone de tres sistemas principales: fluídica, óptica y electrónica ^{42,43,44} (*Figura 7*)

- El sistema de fluidos transporta partículas en una corriente al rayo láser para análisis.
- El sistema óptico está constituido por una serie de láseres para iluminar las partículas en la corriente de muestra y de filtros ópticos que permiten dirigir las señales a los detectores apropiados.

- El sistema electrónico convierte las señales luminosas que se detectan a señales electrónicas las cuales son procesadas por una computadora.

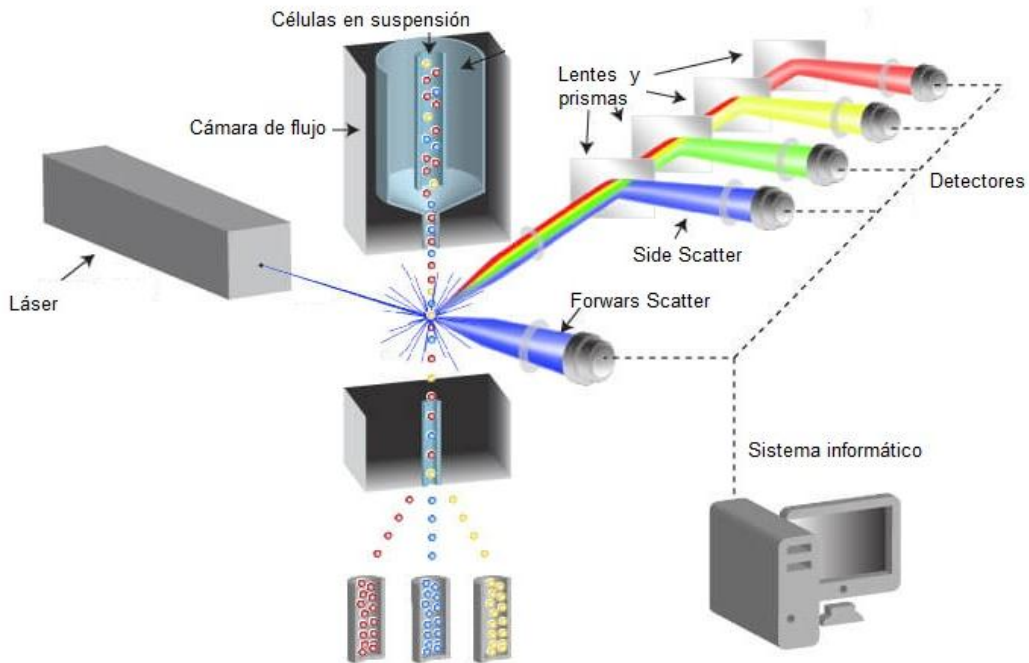


Figura 7. Esquema del sistema de citometría de flujo y componentes críticos.

Históricamente, las partículas analizadas por citometría de flujo en su mayoría eran células sanguíneas; estas al ser células individuales, no requieren manipulación antes del análisis citométrico. Las células cultivadas o las líneas celulares también son adecuadas para ser analizadas por citometría de flujo, aunque las células adherentes requieren de tratamientos para retirarlas de la superficie en la que crecen. Durante los últimos años, se ha demostrado que la citometría de flujo es útil para una gran variedad de aplicaciones biológicas como analizar bacterias, espermatozoides y plancton ^{41,44}.

La citometría de flujo permite caracterizar suspensiones de partículas, al evaluar el tamaño y complejidad relativa, este método es muy útil al determinar si hay cambios de la población de lo que se analiza con respecto a su uniformidad.

3.7 Modelo animal

Existen modelos específicos en animales que son reconocidos para el estudio de la actividad del fármaco en los seres humanos, los modelos animales de artritis han demostrado ser extremadamente útiles para esclarecer la patología, además de ser de gran ayuda para evaluar los efectos de los nuevos tratamientos.

La mayoría de los estudios de poliartritis inducida experimentalmente se realizan en artritis inducida por colágeno tipo II en ratones o ratas, además de estos experimentos en modelos animales, la patología artrítica también se ha descrito como la cantidad de expresión y/o producción desregulada de TNF- α en ratones⁴⁵. Los ratones o ratas se inmunizan con colágeno heterólogo tipo II, lo que provoca una respuesta inmunitaria al colágeno dependiente de células T CD4⁺, las lesiones secundarias a esta respuesta se parecen a las de la AR incluyendo inflamación sinovial, formación de pannus sinovial, erosión del cartílago y del hueso⁴⁶.

Otros modelos de artritis son inducidos por anticuerpos, en éstos se inyectan anticuerpos anti-colágeno tipo II como antiglucosa-6-fosfoisomerasa. Aunque se cuenta con este tipo de modelos que pueden asemejar los síntomas de AR, aun no existe un modelo que la represente en su totalidad⁴⁶.

El ensayo en la oreja y el procedimiento del granuloma en las ratas son métodos para estimar la actividad antiinflamatoria de los esteroides, los modelos de ensayo en animales de esta naturaleza, en particular los ensayos de esteroide antiinflamatorios, resultan ser muy útiles⁴⁷.

En el caso de la artritis reumatoide varios estudios han demostrado que existe una presencia abundante de macrófagos en la membrana sinovial inflamada y en la unión cartílago-pannus en pacientes con AR lo que provoca una respuesta inflamatoria excesiva que causan una inflamación crónica, por lo que el modelo de implantación subcutánea de pellets de algodón da como resultado la formación de granuloma en el sitio del implante, provocado una respuesta inflamatoria

excesiva causada por la presencia de una alta cantidad de macrófagos desregulados que liberan multitud de mediadores proinflamatorios.^{48,49}

En el presente trabajo se utilizó este modelo de granuloma *in vivo* para estudiar la actividad antiinflamatoria del sistema liposomal formulado en gel (GMLP), en ratones de la cepa CBA, (*Figura 8*) los cuales son una cepa singénica muy sensible y que proporciona respuestas uniformes a los tratamientos, además de presentan las siguientes características:

- Buen rendimiento de cría.
- Actividad baja y dócil.
- Alta incidencia global de tumores, incluyendo hepatomas y tumores mamarios
- Resistente a la inducción de aterosclerosis por dieta alta en grasas.
- Ampliamente distribuido como cepa de uso general.
- Alta tasa de mutaciones espontáneas.

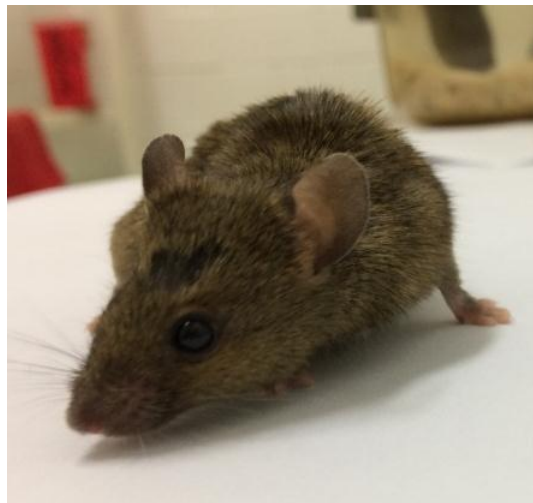


Figura 8. Ratón CBA

3.8 Farmacodinamia

El control del efecto depende de la concentración del fármaco en el sitio de acción; sin embargo, la relación de los efectos con la concentración puede ser compleja y no suele ser lineal.

Esta relación dosis-respuesta permite determinar la dosis necesaria, la frecuencia y el índice terapéutico de un fármaco para una población dada. El incremento de la dosis de un fármaco que posee un índice terapéutico pequeño aumenta la probabilidad de toxicidad o de ineficacia del fármaco ⁵⁰.

Los efectos de los fármacos son una respuesta a la interacción con componentes macromoleculares del organismo. Estas interacciones generan cambios bioquímicos y fisiológicos que son característicos como respuesta al fármaco

La medición básica en la farmacología de efecto de un fármaco es la curva de dosis-respuesta (o curva de concentración-respuesta) (Figura 9).

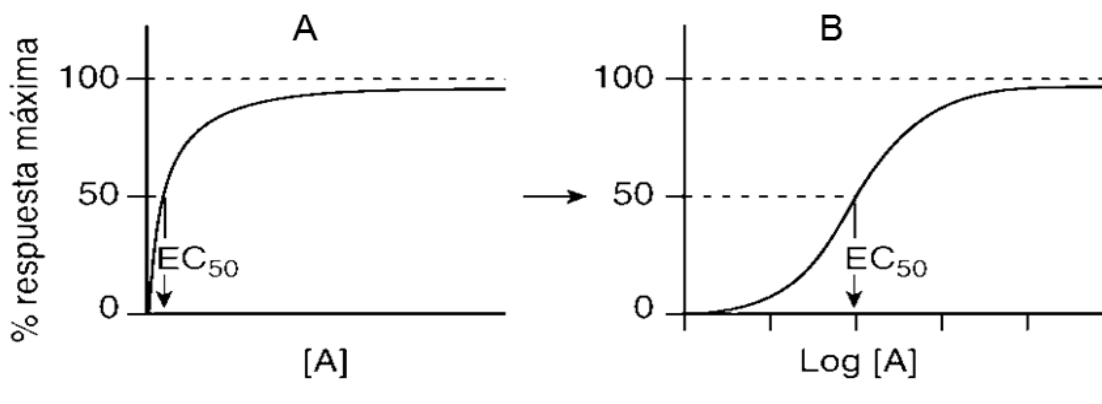


Figura 9. Curva de dosis-respuesta

La respuesta gradual (en el eje de las ordenadas) se muestra como porcentaje de respuesta máxima expresada como función de la concentración del fármaco a diferencia de la forma hiperbólica que se observa recuadro A, se torna sigmoidea cuando se grafica en forma semilogarítmica como se muestra en el recuadro B.

La curva dosis-respuesta brinda información sobre la concentración del fármaco que produce 50% de la respuesta máxima siendo la dosis efectiva media (DE) aquella a la cual el 50 % de los individuos o animales presentan el efecto cuantitativo específico. Las curvas de dosis/respuesta que se presentan en esta forma tienen una disposición sigmoidea y tienen tres propiedades: umbral, pendiente y asíntota máxima. Estos tres parámetros cuantifican la actividad del fármaco⁵¹.

4 Planteamiento del problema

La artritis reumatoide (AR) se caracteriza por dolor y deterioro progresivo de las articulaciones y la membrana sinovial; puede persistir durante muchos años, suele afectar diferentes articulaciones del cuerpo y puede causar daños en tejidos conectivos, músculos, tendones y en el tejido fibroso.

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁵², la enfermedad afecta a entre 1 y 1.5 por ciento de la población del planeta; sin embargo, en México no existe un registro sobre casos de enfermedades reumáticas ni de AR. Estudios realizados por Peláez-Ballestas en el 2011, s el Consejo Mexicano de Reumatología, indican que esta enfermedad en nuestro país oscila entre 0.5 y 2.5 por ciento⁵³.

La AR es una enfermedad de alta prevalencia en las personas de edad avanzada; sin embargo, tiende a aparecer en la edad productiva, la edad de inicio es a los 40 ± 10 años (25-50 años) siendo más frecuente en mujeres que en hombres con una relación de 3:1.

En México, generalmente el diagnóstico no se hace de manera oportuna, por lo que una vez identificada esta enfermedad debe iniciarse un tratamiento adecuado de inmediato, existe evidencia de que la respuesta y la evolución de la enfermedad son superiores cuando se inicia un FARME en los primeros meses¹⁸. En los primeros años se produce un daño articular severo e irreversible, por lo que tener un tratamiento lo más rápido posible incrementa la probabilidad de controlar el proceso inflamatorio y reducir el daño⁵⁴.

La D-Penicilamina es una muy buena opción para el tratamiento de AR; no obstante, debido a su mala absorción intestinal y a los efectos adversos que se presentan con su uso, tales como gastrointestinales, nefropatía y problemas respiratorios; solo se llega a utilizar en aquellos pacientes que tienen una enfermedad activa grave y que no han respondido a la terapia convencional³⁰. Seguramente de no ser por sus efectos secundarios sería la primera opción de terapia antirreumática.

Debido a lo mencionado anteriormente, en este proyecto se propone encapsular D-penicilamina en liposomas que conformen un sistema nanoacarreador que se utilizará como un vehículo, esperando que de esta forma alcance un efecto terapéutico más eficiente. Además, se pretende dirigir a un sitio específico donde se presenta la afección, utilizando la aplicación del sistema nanoacarreador formulado en un gel mucoadhesivo lo que esperamos permita utilizar una dosis menor, lo que limitaría aún más su toxicidad.

5 Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto antiinflamatorio de un sistema nanoacarreador formulado en gel que contiene D-penicilamina en un modelo de artritis reumatoide en ratones CBA.

Objetivos específicos

- Diseñar, fabricar y determinar las características físicas del sistema nanoacarreador liposomal cargado de D-penicilamina.
- Preformular y evaluar la estabilidad del gel que contiene nanoacarreadores liposomales cargado de D-penicilamina por medio de citometría de flujo.
- Implementar un proceso inflamatorio como modelo de artritis reumatoide en ratones CBA.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de la formulación en gel del sistema nanoacarreador liposomal cargado de D-penicilamina en un proceso inflamatorio crónico inducido, que asemeje al principal síntoma de la artritis reumatoide.

6 Hipótesis

La penicilamina es un fármaco actualmente utilizado en solo algunos casos de artritis reumatoide que no responden a otros tratamientos debido a los efectos adversos que se asocian. Se sabe que los liposomas como sistema nanoacarreador disminuyen la toxicidad de los fármacos acarreados y favorecen su liberación sitio-específica, por lo que a través de la encapsulación de la penicilamina en un sistema nanoacarreador (liposomal) y su aplicación en un gel mucoadhesivo, se tendrá la posibilidad de aumentar el efecto antiinflamatorio y al mismo tiempo disminuir su toxicidad.

7 Protocolo de estabilidad de acuerdo a la NOM-073

- Nombre del fármaco medicamento: Sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina
- Forma farmacéutica: Gel Mucoadhesivo
- Presentación Micro tubos graduados con 2 mL
- Concentración: 1 mg/ mL
- Fabricante y domicilio del sitio de fabricación: Laboratorio de Oncología celular L-4 Planta Baja, UMIEZ, Fes Zaragoza, UNAM
- Grado técnico de aditivos

Principio activo: D- penicilamina

Excipientes: Espermidin-Colesterol, grado reactivo

Fosfatidilcolina, grado reactivo

Polycarbophyl 940, grado reactivo

Agua milli Q

Trietanolamina, grado reactivo

- Lotes

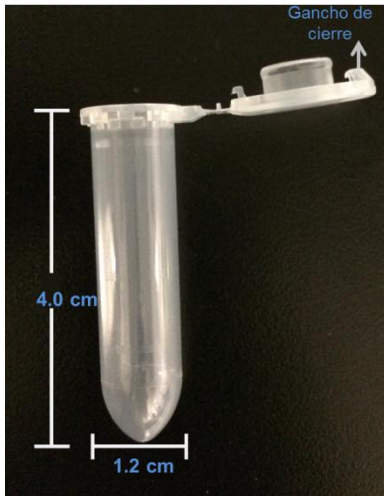
Tipo: Piloto

Tamaño: 25 microtubos de 2 mL

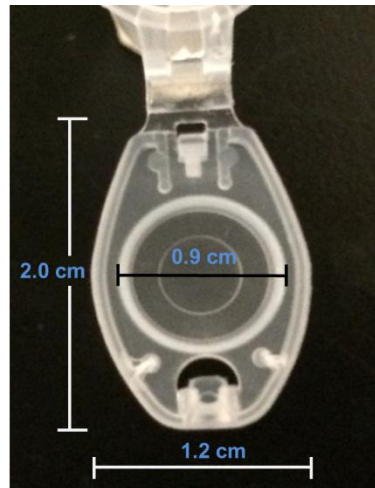
Número de lotes: 2

- Descripción sistema contenedor-cierre:

Microtubo graduado de polipropileno Eppendorf®, con tapa de polipropileno cuenta con una bisagra con un gancho pequeño que encaja alrededor del borde del tubo, con capacidad de 2 mL.



Microtubo de polipropileno



Tapa de polipropileno



Microtubo con tapa y bisagra

- Condiciones del estudio;

Tabla 5. Condiciones del estudio para un medicamento nuevo en condiciones de refrigeración.

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	25°C ± 2°C / 60% ± 5% HR	6 meses	0,3,6 meses
Estabilidad a Largo plazo	5°C ±3°C	12 meses	0,3,6,9 meses

Tabla 6. Prueba para el sistema liposomal Gel mucoadhesivo que contiene liposomas cargados de penicilamina.

Tipo de estabilidad	Método de análisis	Observaciones
Física	Citometría de flujo	Se realizaron los muestreos del sistema liposomal
Física	Microscopia Óptica	Se utilizó para caracterizar el liposoma

Tabla 7. Pruebas a realizar para semisólidos.

	Gel, crema, ungüento tópico
Apariencia/Descripción/Aspecto	✓
Color	✓
Olor	✓ 1
Valoración	✓
pH	✓ 1
Material particulado	NA
Pérdida De Peso	✓ 2
Viscosidad	✓
Contenido De Conservadores	✓ 1
Esterilidad (inicial y final)	NA
Limites Microbianos(Inicio y final)	✓
Identidad (inicial y final)	✓ 3

1 Cuando Aplique

2 Cuando el envase primario sea semipermeable

3 Solo para remedios herbolarios

- Tiempos de muestreo y análisis

Tabla 8. Tiempos de muestreo y análisis para GMLP a tiempo acelerado.

Tiempo de análisis / Condición	Muestreos		
	Inicial	3 meses	6 meses
	Control	Muestreo 2	Muestreo 3
25°C ± 2°C / 60% ± 5% HR	1	2	3
4°C ± 2°C / 60% ± 5% HR	1	2	3
40°C ± 2°C / 75% ± 5% HR	1	2	3

Tabla 9. Tiempos de muestreo y análisis para GMLP a largo plazo.

Tiempo de análisis / Condición	Muestreos				
	Inicial	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
5°C ± 3°C	Sep/18	Dic/18	Mar/19	Jun/19	Sep/19

- Parámetros de prueba:

Por análisis de citometría de flujo

Tamaño FSC (Forward Scatter)

Complejidad SSC (Side Scatter)

Relación entre complejidad FSC (Forward Scatter) y tamaño SSC (Side Scatter)

Concentración: 1mg/mL

- Especificaciones de estabilidad

Estabilidad física por citometría de flujo con un valor inicial de 10,000 eventos $\pm 5\%$ de variación permitida.

Se realizó la fabricación y caracterización por citometría de flujo de gel mucoadhesivo que contiene el sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina para después utilizarlo en el tratamiento de la inflamación crónica inducida.

8 Material y métodos

8.1 Material

Fabricación de liposomas

- Equipo
 - Campana de flujo laminar
 - Citómetro de flujo BD
 - Taque de nitrógeno alta pureza
- Soluciones y reactivos
 - Espermitidil-colesterol
 - Fosfatidilcolina, grado farmacéutico
 - PBS
 - Solución Stock de penicilamina $60 \text{ mg}/2 \text{ mL}$
 - Cloroformo grado biotecnológico
- Instrumentos
 - Micropipeta de 1000 μL
 - Balanza analítica
 - Jeringa Hamilton 50 μL
- Material
 - Tubos de ensaye esterilizados
 - Pipetas Pasteur
 - Tubos cónicos de 0.5mL marca Eppendorf[®].
 - Tubos cónicos de 2mL marca Eppendorf[®]
 - Filtro de membrana de 0.22 micra

Fabricación de Gel mucoadhesivo

- Equipo
 - Campana de flujo laminar
 - Citómetro de flujo BD
 - Caframo[®]
 - Placa de calentamiento
- Instrumentos
 - Micropipeta de 1000µL
 - Balanza analítica
 - Potenciómetro
- Soluciones y reactivos
 - Noveon[®]
 - Agua Milli Q
- Trietanolamina
- Material
 - Vaso de precipitado de 50 mL esterilizado
 - Probeta 25 mL esterilizado
 - Pipetas Pasteur
 - Tubos cónicos de 0.2mL marca Eppendorf[®].
 - Tubos cónicos de 2mL marca Eppendorf[®]
 - Filtro de membrana de 0.22 micras

Caracterización de gel mucoadhesivo con el sistema nanoacarreador liposomal que contiene penicilamina (GMLP)

- Equipo
 - Campana de flujo laminar
 - Citómetro de flujo BD
 - Estufa de estabilidad a 60 °C
 - Congelador a -20 °C
 - Refrigerador a 4°C
 - Lámpara luz U.V y luz blanca
 - Campana de extracción
- Instrumentos
 - Micropipeta de 1000µL
 - Balanza analítica
- Soluciones y reactivos
 - Solución buffer de 5.5
 - Solución buffer de 6
 - Solución buffer de 6.5
 - PBS
- Material
 - Viales ámbar de 2 mL esterilizados
 - Matraz aforado de 10 mL, 20 mL
 - Tubos cónicos de 0.5mL marca Eppendorf[®]
 - Tubos cónicos de 2mL marca Eppendorf[®]
 - Mechero-bunsen
 - Matraz Erlenmeyer 125 mL
 - Caja Petri

Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma en ratones.

- Instrumentos
 - Micropipeta de 1000µL
 - Balanza analítica
 - Jeringas 1 mL
 - Balanza granataria con canastilla para pesar animales
- Soluciones y reactivos
 - Solución de Iodo-etanol
 - Etanol
- Material Biológico
 - Ratones hembra (CBA)
- Material
 - Pellet de algodón 10 mg ± 0.5
 - Jeringas 0.5 mL
 - Vasos de precipitados de 20 mL
 - Pinzas de Sujeción
 - Tubo de acero inoxidable de 5 mm
 - Varilla de acero inoxidable 4mm
 - Bisturí
 - Pinzas
 - Tijeras de cirugía
 - Mechero bunsen
 - Caja Petri
 - Tabla de sujeción
 - Rasuradora

8.2 Método

8.2.1 Preparación de liposomas catiónicos que contienen D-penicilamina

La fabricación de liposomas catiónicos que contienen D-penicilamina se realizó en campana de flujo laminar y bajo condiciones específicas de un procedimiento normalizado establecido en el laboratorio; para el lote de liposomas que contienen penicilamina se utilizó el siguiente método:

En un tubo de ensayo se mezclaron fosfatidilcolina (fosfolípido) y un lípido catiónico en proporción 1:1 se adiciono cloroformo hasta obtener una mezcla homogénea, se evaporo el disolvente mediante una corriente de nitrógeno y se adicionaron 300 µL de solución stock de D-penicilamina.

Posteriormente se realizó un proceso de sonicación de ciclos de 5 segundos con descanso de 10 segundos entre cada ciclo, después se resuspendieron a un volumen determinado con solución buffer de fosfatos (PBS) y se acondicionaron en viales Eppendorf de 2 mL, por último el lote fabricado se analizó por citometría de flujo.

Los liposomas obtenidos se caracterizaron y se sometieron a estudios de estabilidad tal como pH, fotosensibilidad y temperatura por citometría de flujo.

8.2.2 Caracterización del sistema nanoacarreador liposomal por citometría de flujo

Para la caracterización de las poblaciones de liposomas con o sin penicilamina se utilizaron los parámetros FSC (difracción del rayo láser) y SSC (refracción) para tener una representación del tamaño o la complejidad relativa de las vesículas, respectivamente. Para lograr lo anterior, se diluyo 1:10 en PBS la suspensión y el gel que contiene el sistema nanoacarreador liposomal, las diluciones respectivas se colocaron en tubos especiales para ser evaluados en el citómetro de flujo (FACS) Aria flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA). Los resultados obtenidos se presentaron en diagramas de dispersión de puntos de los eventos evaluados (10,000) para mostrar la distribución de la población de vesículas

contenidas en la dilución correspondiente los cuales nos proporcionaron el tamaño y la complejidad relativa. Se compararon las preparaciones liposomales a partir de histogramas que al superponerse permiten evaluar estadísticamente las diferencias significativas.

8.2.3 Determinación de la morfología de liposomas por microscopia electrónica de transmisión

Se prepararon sistemas liposomales vacíos (LIP-VAC) y sistemas liposomales con penicilamina (LOCECP), posteriormente se tomaron alícuotas de 5 μ L de liposomas diluidos 1:10 en PBS y se colocaron en rejillas de cobre con 200 mallas que estaban cubiertas con Formvar, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y después se eliminó el líquido por decantación con papel filtro. Posteriormente las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos, se elimina el exceso de líquido y se deja secar durante 24 hr. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión y se tomaron fotografías a 40 K, 75 K y 150K⁵⁵.

8.2.4 Fabricación de Gel mucoadhesivo

Para la fabricación del gel mucoadhesivo, se pesaron 40 mg de Noveon[®], en un vaso de precipitado, se adicionaron 20 mL de agua Milli Q[®], se agito hasta incorporar por completo seguido se adicionaron 10 mL más de agua, después se agito a 600 rpm en un Caframo[®] Posteriormente se midió el pH y se dejó hidratar por 24 horas, transcurrido el tiempo se agito por 15 minutos a 800 rpm, al finalizar se adicionaron unas gotas de trietanolamina y se dejó agitar por 5 minutos más, se midió el pH del gel manteniéndolo entre 5.0 a 6.0.

Por último, para la formulación del sistema nanoacarreador liposomal en gel se incorporaron los liposomas que contienen D-penicilamina a 50 rpm; una vez mezclado por completo, el lote fabricado se acondiciono en viales Eppendorf[®] de 2 mL y se analizó por citometría de flujo.

8.2.5 Caracterización de gel mucoadhesivo con liposomas que contienen penicilamina (GMLP)

Para llevar a cabo la caracterización del sistema liposomal que contiene penicilamina en gel por citometría de flujo, se realizó la medición de la complejidad y tamaño relativos iniciales, para posteriormente comparar si sufre cambios físicos debido a la exposición de las diferentes condiciones que se establecieron en protocolo de estabilidad de acuerdo a la NOM-073.

pH

La prueba se hizo por triplicado; se mezclaron 200 µL de buffer a pH 5.5, 6.5 y 7.0 respectivamente con 200 µL de gel mucoadhesivo formulado con el sistema nanoacarreador liposomal que contiene penicilamina (GMLP) a 4°C de temperatura, estos fueron evaluados cada 24 h durante 5 días.

Fotosensibilidad

Se expusieron microtubos de 200 µL que contienen GMLP a luz UV y visible, con por 12, 24, 36, 48 y 60 horas a temperatura ambiente, posteriormente se evaluaron por citometría de flujo y se compararon con los parámetros obtenidos del sistema nanoacarreador inicial.

Temperatura 4°, 25° y 40°C

Se introdujeron viales con 300 µL de GMLP en estufas de estabilidad a las temperaturas de 25° y 60°C y viales para 4°C se introdujeron al refrigerador; se mantuvieron a la temperatura correspondiente por un periodo de 6 semanas, se monitoreo la temperatura para asegurar las condiciones establecidas.

Ciclaje

En viales de capacidad de 2 mL se colocaron 300 μ L de GMLP e introdujeron en estufas de estabilidad a las temperaturas de 25°C y 60°C y en refrigeración a 4°C. Se mantuvo en la temperatura correspondiente por 6 semanas; cada 2 semanas se realizó una rotación de cada grupo de viales bajo las condiciones especificadas hasta finalizar el tiempo establecido.

Estudio de estabilidad a Largo plazo a 4°

Se introdujeron viales con 500 μ L de GMLP a 4°C \pm 2 en el refrigerador; se mantuvieron a la temperatura correspondiente por un periodo de 9 meses y se muestrearon al inicio, a los 3, 6 y 9 meses (tiempos 1 al 4 respectivamente). Los viales se monitorearon todos los días para corroborar que se encontraran en las condiciones establecidas.

Todas las muestras fueron evaluadas al tiempo determinado por citometría de flujo para tamaño y complejidad contra un control inicial de liposomas que contienen D-penicilamina.

Limites microbianos

Las pruebas fueron realizadas en condiciones asépticas para evitar afectar a la muestra, se diluyeron 500 μ L de gel en 5 mL de agua destilada. Utilizando el método de recuento en placa; se prepararon 40 mL de Agar soya tripticaseína y 40 mL de Agar Papa dextrosa, se esterilizaron y se vació en cajas Petri, todo se preparó por duplicado cada medio de cultivo, una vez solidificado se inocularon 2 mL de la muestra preparada, en seguida se incubaron las placas, las placas que contenían Agar soya tripticaseína fueron incubadas por 5 días a 35°C y las del Agar Papa dextrosa fueron incubados de 5-7 días a 25°C; transcurrido el tiempo se calculó el promedio de las colonias formadas y se determinó el número de UFC por mililitro/gramo por unidad de muestra ³⁶.

8.2.6 Evaluación del efecto antiinflamatorio

Se realizó el estudio farmacocinético con ratones hembra de la cepa CBA de más de 1 año de edad, mantenidas en el bioterio estéril para roedores de Campus II de la FES Zaragoza, estos individuos se mantuvieron alimentados con Teklad Global Diets, con agua esterilizada, contaban con un control de temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 3$ y porcentaje de H.R \pm 6.3 y ciclos de luz oscuridad de 12 horas, durante el procedimiento llevado a cabo por dos semanas.

Se pesaron 50 pellets de algodón de $10 \text{ mg} \pm 0.5$, se esterilizaron por calor húmedo y se secaron a 100°C en la estufa por 48 horas.

Se formaron tres grupos de ratones hembras, cinco ratones por cada grupo, se marcaron de acuerdo a la dosis utilizada. Se implantaron subcutáneamente en el dorso los pellets de algodón a cada uno, se mantuvieron en observación por los siguientes 10 días revisando que se produjera la inflamación.

Trascurrido el tiempo, se administró el gel mucoadhesivo que contiene el sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina por vía tópica a cada ratón en dosis de 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 y 4.8 mg/Kg, por cinco días consecutivos, cabe aclarar que se administró la cantidad de gel correspondiente de acuerdo al peso.

Al control positivo (+) se le administró hidrocortisona en gel mucoadhesivo (GMH) (15mg/Kg) y al control negativo (-) gel mucoadhesivo sin fármacos por cinco días.

Al decimosexto día se sacrificaron cada uno de los ratones en la cámara de CO_2 , seguido de una dislocación. Se extrajo el pellet de cada ratón y se colocó en una microplaca, se pesaron todos para obtener el peso húmedo, posteriormente se colocaron en la estufa a 37°C durante una semana, transcurrido ese lapso se pesaron para obtener el peso seco.^{47,56}

9 Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental prospectivo, longitudinal, comparativo

Población a estudiar: Ratones hembras CBA

Criterios de exclusión para la evaluación del efecto antiinflamatorio en un modelo experimental de AR.

➤ Inclusión

Ratones hembras CBA de más de un año de edad.

Ratones hembras CBA de más de 20 g

Ratones CBA hembras a las que se implantaron pellets con éxito $10 \text{ mg} \pm 0.5$

➤ Exclusión

Ratones CBA hembra que hayan retirado el pellet.

Ratón lastimado por agresiones percibidas en su camada

Técnica de implantación incorrecta del pellet

➤ Eliminación

Ratón lesionado durante la implantación del pellet

Ratón CBA muerto.

Ratón hembra que haya desarrollado tumores

10 Resultados

➤ Caracterización por citometría de flujo del sistema nanoacarreador liposomal que contiene D-penicilamina.

El sistema liposomal en suspensión que contiene D-penicilamina (LOCECP), se evaluó mediante citometría de flujo. La determinación del tamaño relativo (FSC) y la complejidad relativa (SSC), permitieron caracterizar y a la vez confirmar la formación del sistema liposomal. (Imagen 1). Los resultados se muestran en un gráfico de dispersión de puntos que relacionan el tamaño y la complejidad, claramente se puede observar una región donde se encuentra la población mayoritaria del sistema liposomal que contiene penicilamina (Región 1), la cual es nuestra población de interés y dos pequeñas poblaciones que se alejan del grupo central. Esta determinación nos permitirá comparar los cambios obtenidos en los estudios de estabilidad.

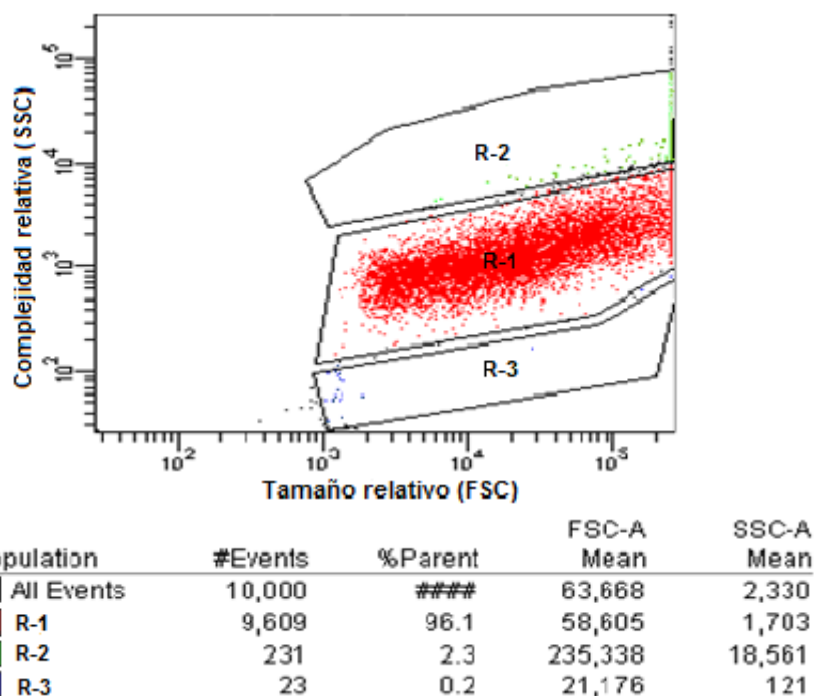


Imagen 1. Muestra la relación de tamaño y complejidad de un lote del sistema nanoacarreador liposomal en suspensión con penicilamina; la Región R1 (roja) representa la población estándar, tanto la región R2, R3 (verde y azul respectivamente) indican desviación de la población mayoritaria.

➤ **Caracterización por citometría de flujo del sistema nanoacarreador liposomal sin penicilamina.**

Con el fin de observar si la encapsulación del fármaco pudiese haber modificado las características del sistema con respecto a la complejidad (SSC) y tamaño relativo (FSC), se realizó una comparación de ambas poblaciones mediante la superposición de histogramas que representan la dispersión de eventos evaluados. Los resultados obtenidos de la superposición de histogramas del sistema nanoacarreador liposomal en suspensión con (LOCECP) y sin penicilamina indican que comparten características, siendo semejantes en cuanto a complejidad y tamaño relativo (*Imágenes 2 y 3*).

Tamaño

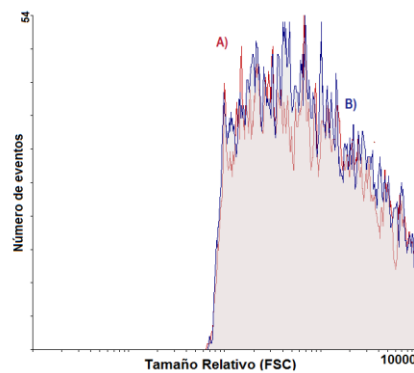


Imagen 2. A) Se superponen los histogramas del tamaño relativo de la población del sistema nanoacarreador liposomal en suspensión sin penicilamina (LIP_VAC) (en rojo) y B) del tamaño de la población con penicilamina (LOCECP) (en azul).

Complejidad

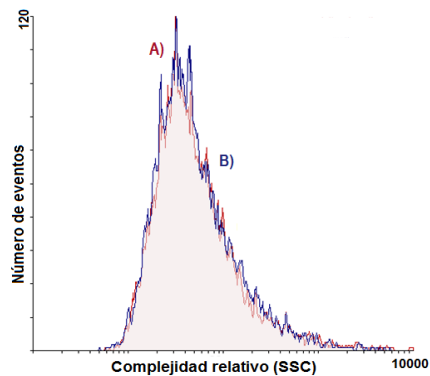


Imagen 3. A) Se superponen los histogramas de la complejidad relativa del sistema nanoacarreador liposomal en suspensión sin penicilamina (LIP_VAC) (rojo) y B) la complejidad relativa de la población con penicilamina (LOCECP) (azul).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo indican que las poblaciones de sistemas acarreadores liposomales con y sin penicilamina no presentan diferencias significativas. Ambos gráficos observados como distribución de puntos coinciden en permanecer en la región de interés o R-1 (*Imagen 4*), se muestran los eventos con respecto a la complejidad y el tamaño relativo de cada una de las poblaciones de liposomas, ambos gráficos coinciden en la región que mantiene la mayor población de liposomas, por lo que se determinó la R-1 para el estudio posterior de estas poblaciones bajo diferentes condiciones que pudiese afectar su estabilidad.

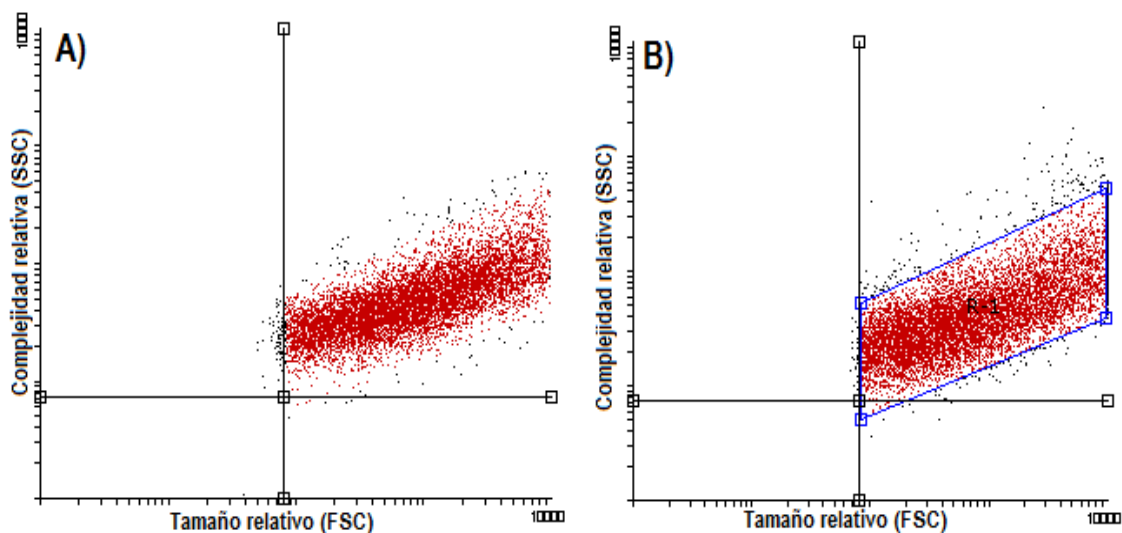


Imagen 4. Gráficos de dispersión de eventos tamaño-complejidad correspondientes: A) Sistema nanoacarreador liposomal sin penicilamina (LIP_VAC) en suspensión. B) Sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina en suspensión (LOCECP), se delimita área de azul que corresponde a la región donde se encuentran la mayoría de los eventos que caracterizan a la población de interés.

➤ **Determinación de morfología y tamaño de los liposomas cargados de penicilamina**

Para caracterizar la morfología y tamaño del sistema liposomal cargados de penicilamina se usó microscopía electrónica de transmisión (TEM); para ello, se fabricaron tanto liposomas en suspensión vacíos (LIP- VAC) así como cargados de penicilamina (LOCECP); por último, se formuló el sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina en gel mucoadhesivo (GMLP). Se prepararon las muestras en tinción negativa como se detalla en la metodología para su observación en el microscopio electrónico de transmisión [JEOL TEM, USA]. Se observó que ambos sistemas nanoacarreadores liposomales en suspensión presentaron una forma esférica y un tamaño que varía entre 100-200 nm de diámetro, siendo estos últimos los que se hacen más presentes; los liposomas cargados de penicilamina formulados en gel tienen un tamaño uniforme muy cercano a los 200 nm de diámetro (Figuras 10 y 11).

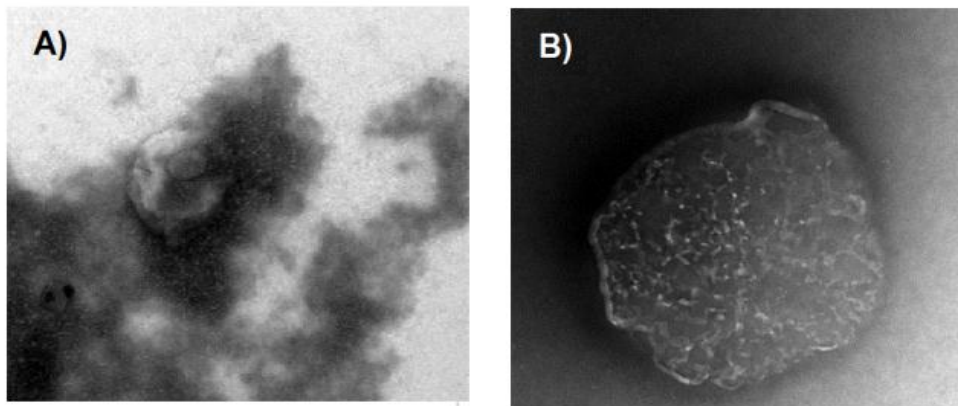


Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de los sistemas liposomales en suspensión. A) Sistema liposomal en suspensión sin penicilamina, B) Sistema liposomal en suspensión con penicilamina.

El sistema liposomal formulado en gel mostró que mantiene su morfología y su tamaño de 200 nm (*Figura 11*); sin embargo, la presencia del gel provoca interferencia.

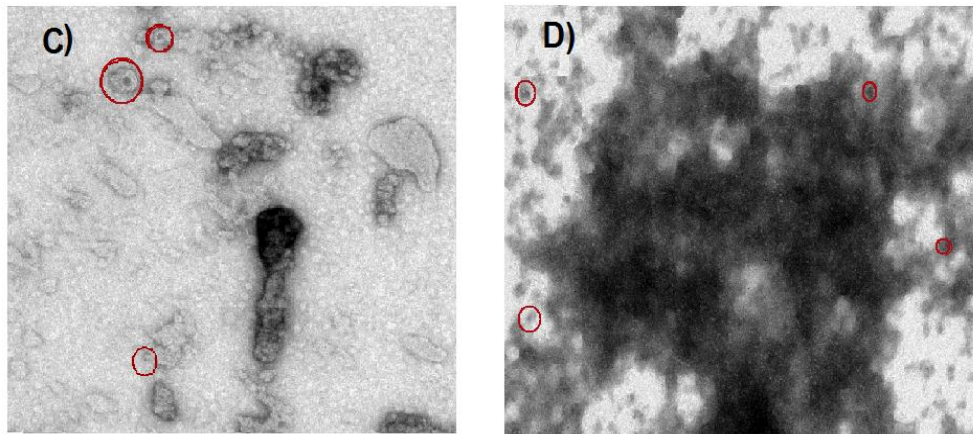


Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión del sistema nanoacarreador liposomal formulado en gel mucoadhesivo C) (GMA-LIPVAC) Sistema liposomal en gel vacío, D) (GMLP) Sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo.

Caracterización y pruebas de estabilidad para el sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo.

De la misma forma que se caracterizó el sistema liposomal en suspensión, se realizó la evaluación inicial de tamaño y complejidad relativa del sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo (GMLP) por citometría de flujo. Los resultados obtenidos por citometría de flujo (*Imagen 5*), indican que existe un ligero aumento de eventos fuera de la región principal o R-1 desplazándose a la región que denominamos R-3; sin embargo, en su gran mayoría la población permanece en la región 1 similar a la obtenida para el sistema liposomal en suspensión.

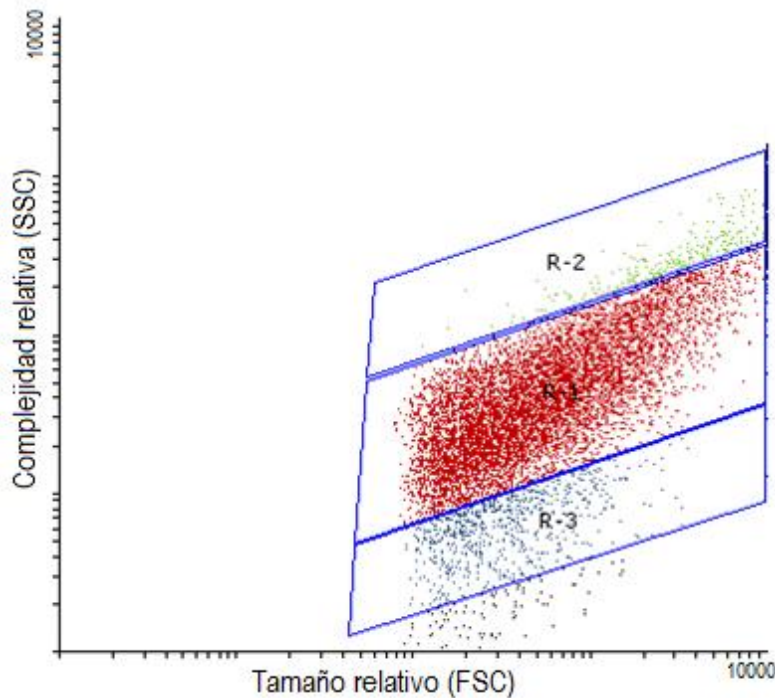


Imagen 5. Muestra gráfico de dispersión de eventos tamaño-complejidad relativa correspondientes a lote del sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo (GMLP). La R-1 es la región donde se encuentra la población mayoritaria del sistema en suspensión al tiempo inicial. .

Una vez caracterizada la población inicial del sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo, y considerando que la integridad de un sistema liposomal no solo depende del contenido, sino de las interacciones entre sus componentes, del tipo de contenedor, así como también de la temperatura, humedad, del pH e incluso de la iluminación a la que se encuentre expuesta, es importante realizar pruebas de estabilidad que aseguren que el medicamento se mantendrá seguro y eficaz ante diversas condiciones. Por lo anterior, para determinar las condiciones más adecuadas para almacenar esta formulación, se fabricaron dos lotes del sistema liposomal con penicilamina en gel mucoadhesivo (GMLP) y se sometieron a estudios de estabilidad a corto y largo plazo.

Uno de los lotes de GMLP se sometió a un estudio de estabilidad acelerado durante 6 semanas; para lo cual se expusieron a 4°, 25° y 40°C (*Tablas 10, 11 y 12*) respectivamente, finalizada la exposición en los tiempos establecidos, se evaluó por citometría de flujo el tamaño y complejidad relativos para después al superponer los histogramas comparar los posibles cambios debidos a la exposición mencionada. Los resultados obtenidos de los muestreos permitieron estimar que la temperatura ideal de conservación del sistema liposomal es de 4°C pues no se presentan cambios significativos en comparación con la población inicial (*Imagen 7*), a diferencia de las temperaturas de 25°C y 40° que a partir de la semana 4 que corresponde al tiempo 2 de muestreo se observan dispersiones significativas desplazándose la población hacia la regiones R-2 y R-3 (*Imágenes 7 y 8*).

➤ Temperatura 4°

	Total de eventos	% de Eventos		
		R1	R2	R3
LOCECP	10000	96.6%	2.1%	0.2%
Tiempo 1	10000	88.5%	3.2%	6.6%
Tiempo 2	10000	86.3%	12.7%	0.3%
Tiempo 3	10000	92.9%	3.9%	2.3%

Tabla 10. Comparación de los porcentajes del desplazamiento de la población de un lote de GMLP a 4 °C con la población del sistema liposomal con penicilamina en suspensión (LOCECP. Los porcentajes se expresan como presencia en las regiones R-1, R-2 y R-3 previamente establecidas.

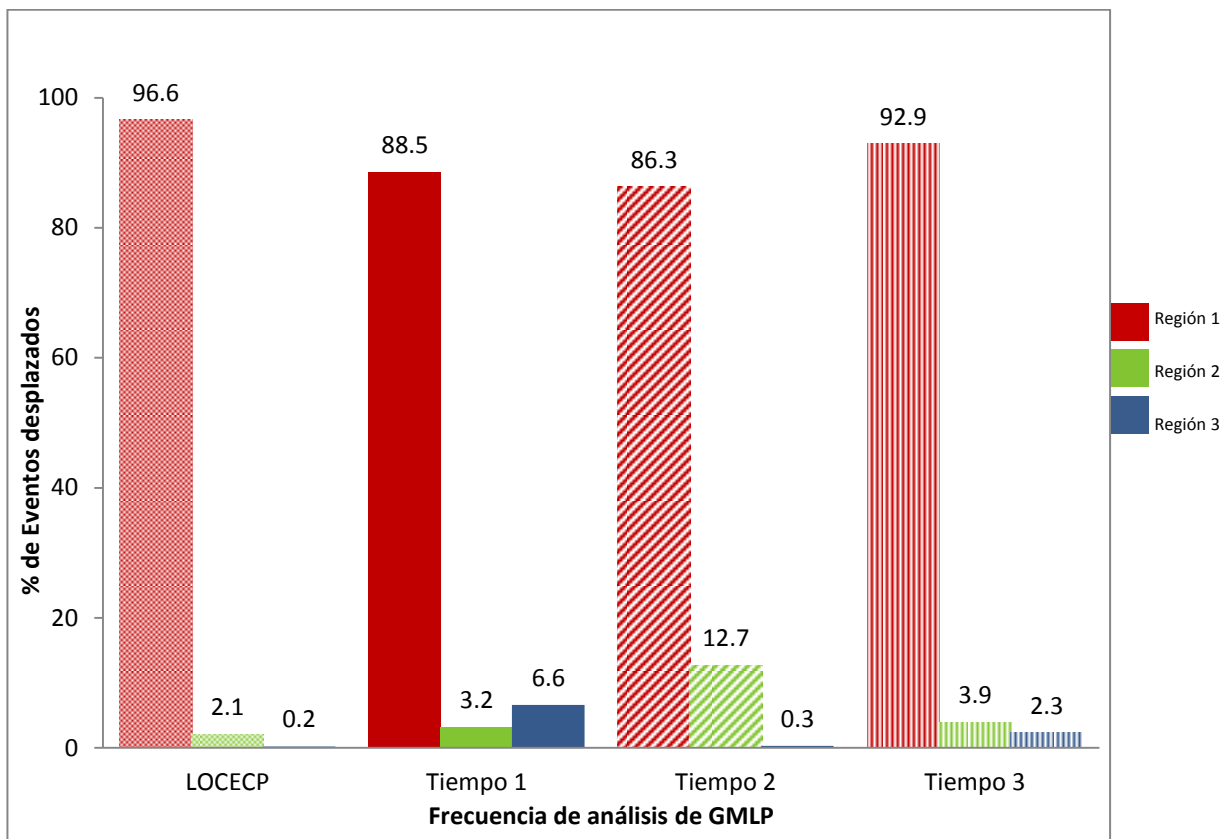


Imagen 6. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de eventos correspondientes a cada región asignada a partir de LOCECP, el Tiempo 1 se utilizó como control para evaluar el desplazamiento de los eventos correspondientes con respecto a tiempos de muestreos, se observa que a 4°C no hay un cambio significativo del comportamiento de la población del sistema liposomal de penicilamina en gel mucoadhesivo.

➤ Temperatura 25°

	Total de eventos	% de Eventos		
		R1	R2	R3
Control GMLP	10000	88.5%	3.2%	6.6%
Tiempo 1	10000	90.7%	2.6%	5.6%
Tiempo 2	10000	76.1%	21.3%	1.7%
Tiempo 3	10000	78.8%	2.2%	16%

Tabla 11. Comparación de los eventos obtenidos y porcentajes del desplazamiento de la población de un lote de GMLP a 25 °C, correspondiente a cada región establecida a diferentes tiempos de muestreo. Para la comparación se utilizó como control el tiempo 1 de muestreo de GMLP a 4°C.

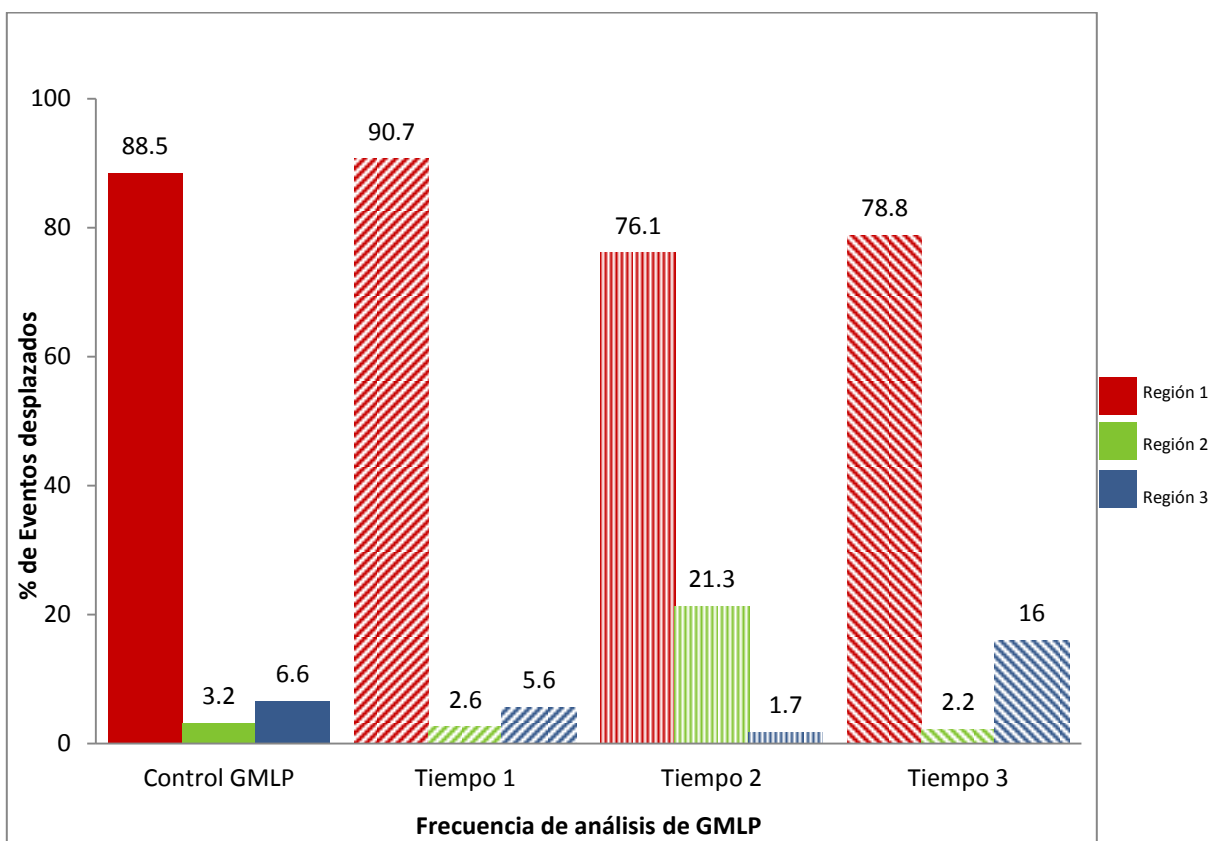


Imagen 7. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de eventos correspondientes a cada región, se observa que a 25°C hay un desplazamiento significativo de la población de liposomas de la R-1 a regiones R-2 y R-3 en diferentes proporciones a partir del Tiempo 2 (semana 4).

➤ Temperatura 40°

	Total de eventos	% de Eventos		
		R1	R2	R3
Control GMLP	10000	88.5%	3.2%	6.6%
Tiempo 1	10000	85%	11.5%	2.8%
Tiempo 2	10000	83.7%	6.0%	8.2%
Tiempo 3	10000	69.5%	3.6%	20.6%

Tabla 12. Comparación de los eventos obtenidos y porcentajes del desplazamiento de la población de un lote de GMLP a 40 °C correspondiente a cada región establecida a diferentes tiempos de muestreo.

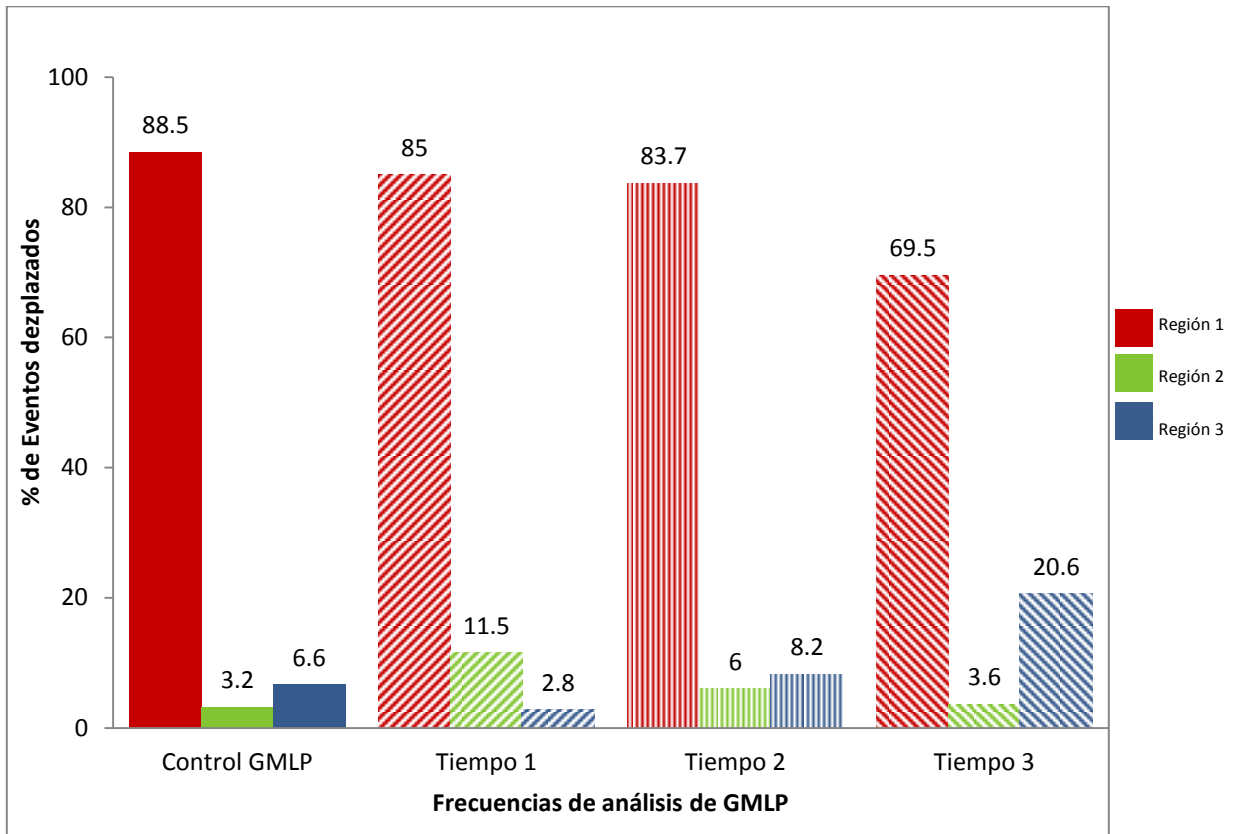


Imagen 8. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de eventos correspondientes a cada región asignada, se observa que a 40 °C hay un desplazamiento significativo de la población de liposomas de la R-1 a regiones R-2 y R-3 en diferentes proporciones en cada muestreo.

➤ Ciclaje

Durante el traslado y almacenamiento de los medicamentos pueden llegar a sufrir variaciones de temperatura, por lo que es conveniente realizar un estudio de ciclaje, este estudio simula condiciones estresantes, estos cambios térmicos pueden llegar modificar características de las formas farmacéuticas; por lo anterior, se sometió parte de un lote de GMLP a un estudio de ciclaje que consistió en exponer la formulación a tres temperaturas 4°, 25°C y por último a 60 °C por un periodo de 6 semanas, se asignaron como muestra A, B y C. Cada una fueron expuestas por dos semanas a las temperaturas establecidas para este estudio (*Tabla 13*). Los resultados indicaron que en condiciones extremas al menos el 76% de la población se mantiene en la región principal inicial (*Imagen 9*).

	Rotación de muestras		
	4°	25°	60°
Semana 2	A	C	B
Semana 4	B	A	C
Semana 6	C	B	A

Tabla 13. Rotación de muestras para la prueba de ciclaje a diferentes temperaturas con respecto a tiempo, cada muestra se mantuvo por 2 semanas por cada temperatura durante un total de seis semanas pasando por las tres temperaturas.

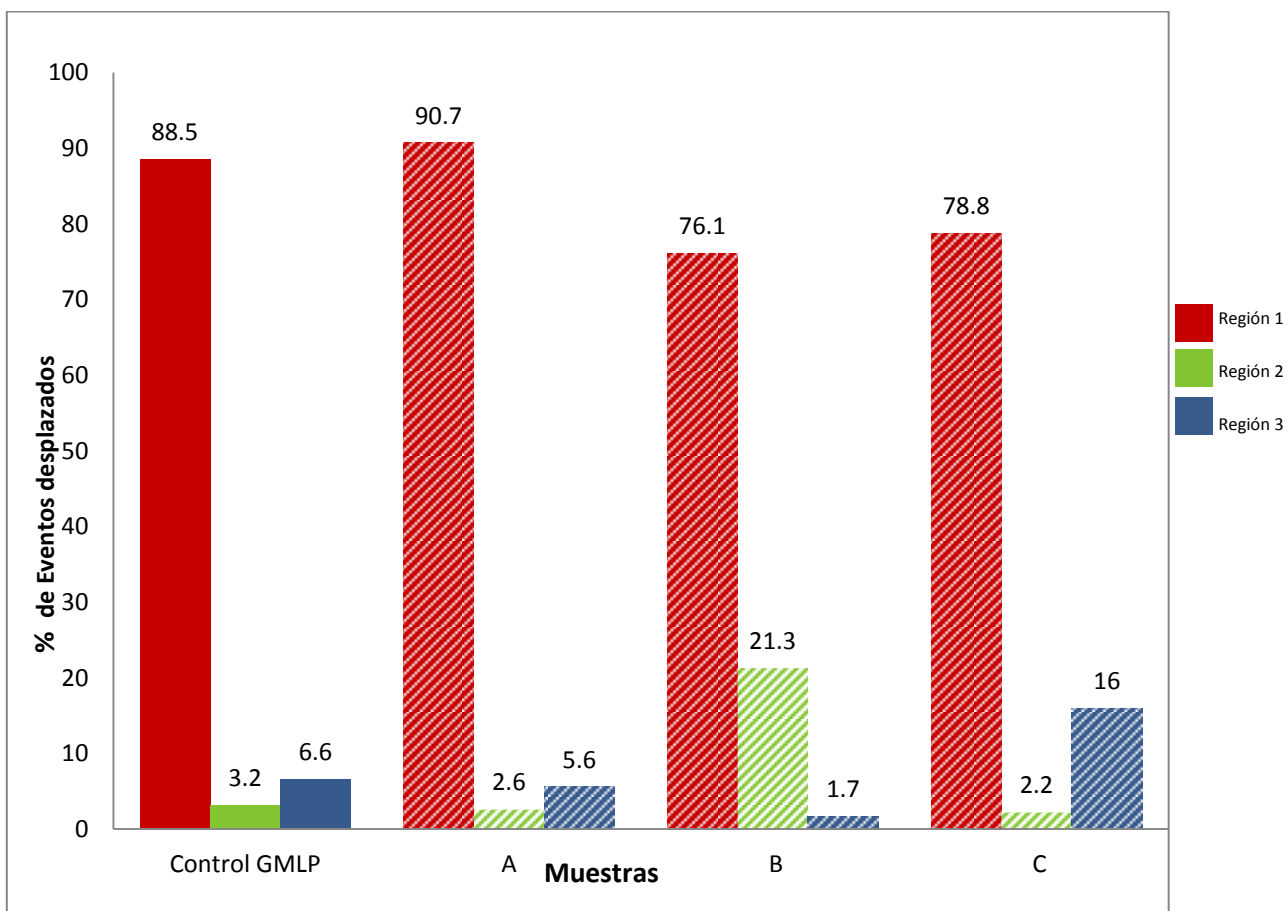


Imagen 9. Gráfico de barras donde se muestra porcentaje de eventos desplazados de la población de GMLP en un estudio de ciclaje para la muestra A, B y C que fueron expuestas a 4°C, 25°C y 60°C realizando una rotación de cada dos semanas por un periodo de 6 semanas.

➤ pH

Para mantener la estructura e integridad de los liposomas se requiere cuidar de las propiedades fisicoquímicas de la formulación, esto dependerá de factores como las características del fármaco encapsulado, la capacidad de la composición lipídica para mantenerlo dentro de la estructura, así también de la temperatura como ya se observó en el estudio de estabilidad acelerada e incluso del pH. La variabilidad en estas propiedades puede provocar la ruptura de los nanoacarreadores liposomales, desestabilizando la formulación. Por esta razón, determinamos cómo afectan los cambios de pH entre 5 y 7 en la formulación de GMLP en el tamaño y la complejidad relativa.

Los resultados obtenidos determinaron que el cambio de pH modifica la consistencia semisólida del gel, no obstante se encontró que tras cinco días de exposición a diferentes pH, en general la integridad de los liposomas se mantienen (*Imagen 10*) con respecto a su tamaño relativo; no así en la complejidad, donde se observan cambios significativos en todos los casos, especialmente en el pH de 7 que muestra ya dos subpoblaciones claramente diferentes (*Imagen 11*), (*Tabla 14*)

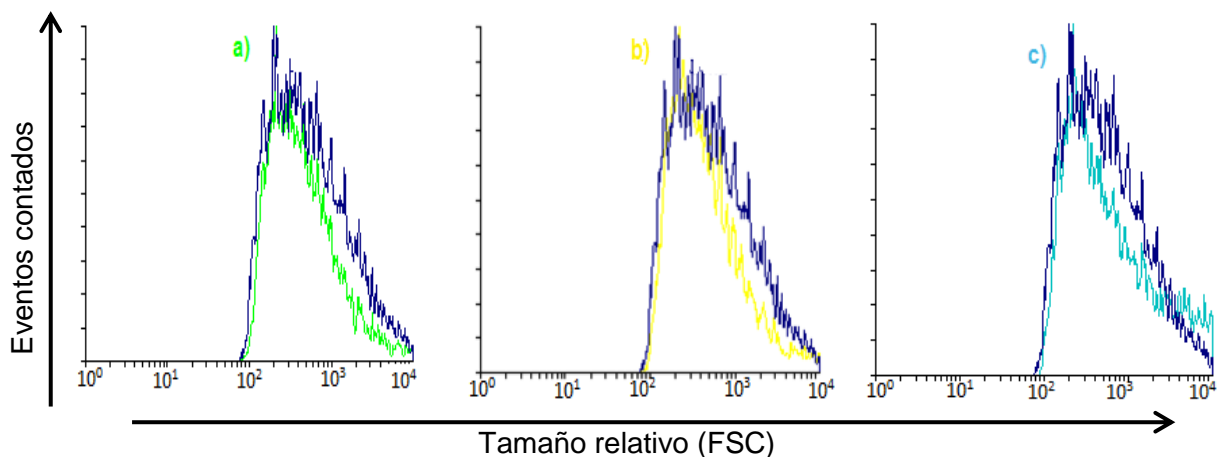


Imagen 10. Comparación de histograma de tamaño relativo (FSC) para estudio de estabilidad de pH. Histogramas sobrepuestos de un lote de liposomas con penicilamina que se encuentran en gel (GMLP) expuestos a diferentes pH; a) pH 5.5 (verde), b) pH 6.5 (amarillo), c) pH 7.0 (azul claro) con respecto a GMLP control (azul marino), tras 5 días de exposición.

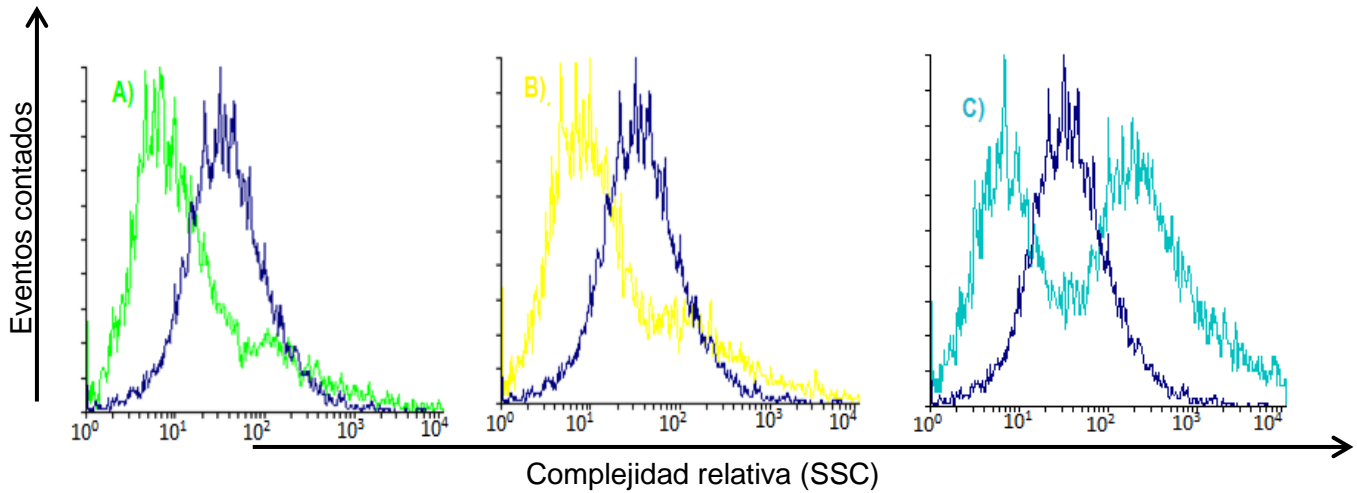


Imagen 11. Comparación de histograma para complejidad relativa (SSC) para el estudio de estabilidad de pH. Histogramas sobrepuestos de un lote de sistema liposomal con penicilamina que se encuentran en gel (GMLP) expuestos a diferentes pH; A) pH 5.5 (verde), B) pH 6.5 (amarillo), C) pH 7.0 (azul claro) con respecto a GMLP control (azul marino), tras 5 días (120 h) de exposición

	Tamaño (FSC)			Complejidad (SSC)		
Tiempo de muestreo	5.5	6.5	7.0	5.5	6.5	7.0
pH	Media Geométrica			Media Geométrica		
Control de GMLP	533.85	533.85	533.85	39.34	39.34	39.34
Tiempo a 24 h	500.07	507.41	514.22	28.42	28.38	30.11
Tiempo a 72 h	483.29	517.36	490.14	27.29	27.06	26.1
Tiempo a 120 h	477.12	511.12	667.86	27.48	29.13	42.11

Tabla 14. Comparación de las medias geométricas de la población a partir de los parámetros Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) en la Región 1 de un lote de GMLP que se sometió a prueba de pH 5.5, 6.5 y 7.0, realizando muestreo cada 24 horas durante 5 días

➤ Fotoestabilidad

Las pruebas de fotoestabilidad ayudan determinar si la exposición acelera la degradación del sistema en estudio por lo que formalmente estos estudios permiten determinar si un principio activo de un producto o medicamento tiende a degradarse⁴⁰, lo que nos lleva a prever las medidas que se deberán tomar en cuenta para la adecuada protección tanto del API como de la formulación resultante. Por lo anterior, el sistema liposomal GMLP se sometió a 60 horas de exposición de luz UV a temperatura ambiente, después de las cuales se evaluaron por citometría de flujo. Los resultados mostraron que tras la exposición de 60 horas a la luz UV, la población del sistema liposomal (*Imágenes 12 y 13*) no se ve afectada en tamaño o complejidad relativa.

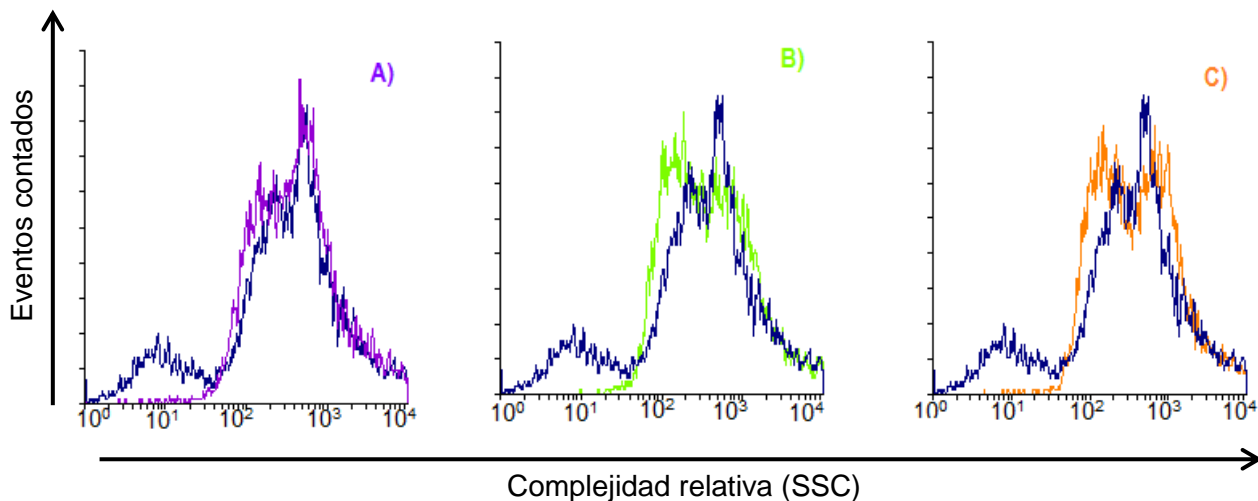


Imagen 12. Comparación de histograma para complejidad relativa (SSC) para la prueba de foto sensibilidad por exposición de luz ultravioleta; A) Muestreo de GMLP a 12 horas (morado); B) Muestro de GMLP tras 48 horas (verde); C) Muestreo final de GMLP a 60 horas de exposición (naranja); se realizó la comparación con GMLP basal (azul).

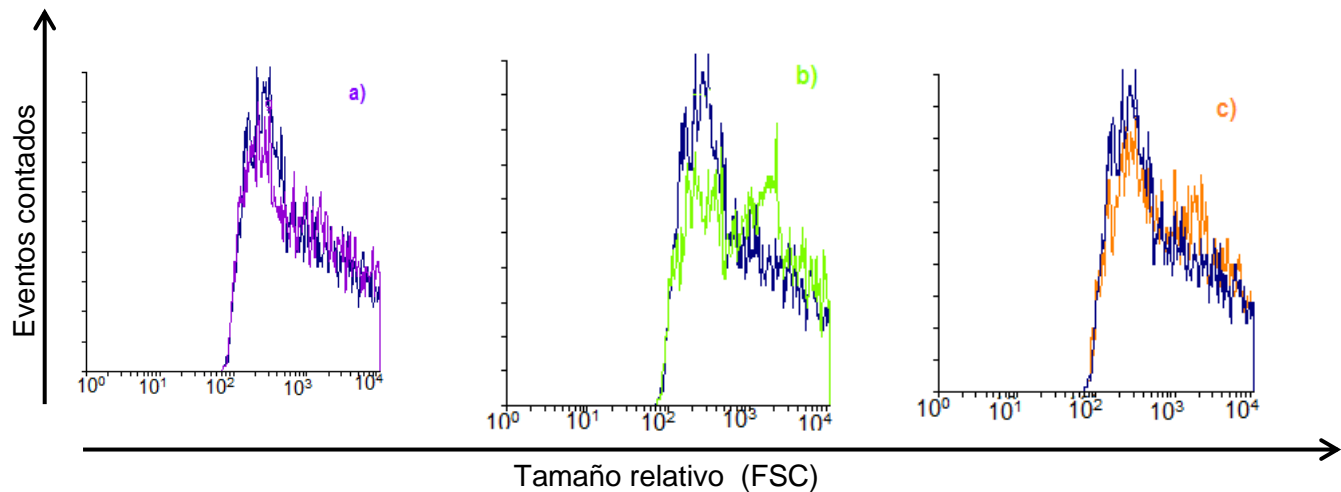


Imagen 13. Comparación de histograma para correspondiente para tamaño relativo de GMLP para la prueba de foto sensibilidad a exposición de Luz ultravioleta; A) Muestreo de GMLP a 12 horas (morado); B) Muestro de GMLP tras 48 horas (verde); C) Muestreo final de GMLP a 60 horas de exposición (naranja); se realizó la comparación con GMLP basal (azul).

➤ Estudio de Estabilidad a Largo plazo a temperatura de 4°C

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas aceleradas de estabilidad a las que se sometió el sistema nanoacarreador liposomal, se determinó que a 4 °C no había cambios significativos, por lo que se procedió a realizar estudios de estabilidad a largo plazo a un lote del sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo. El lote se sometió a 4°C durante nueve meses, la frecuencia de los muestreos fue a 0, 3, 6 y 9 meses. Pasado los tiempos mencionados, las muestras fueran evaluadas por citometría de flujo y contrastadas con el tiempo inicial.

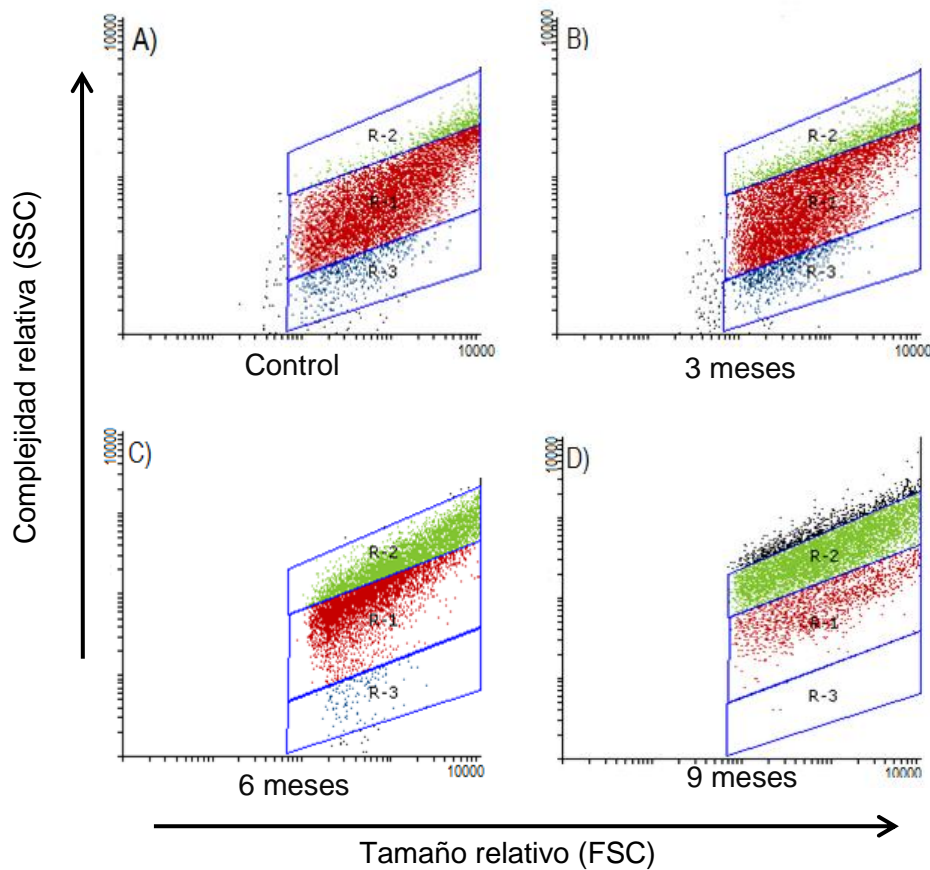


Imagen 14. Muestra gráficos de dispersión de eventos correspondientes de un lote de sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo sometido a un estudio de estabilidad a largo plazo a una temperatura de 4°C. A) Muestreo inicial a tiempo 0, se utilizara como control para la evaluación del GMLP; B) GMLP a 3 meses; C) GMLP a 6 meses y D) GMLP a 9 meses de muestreo.

Con los resultados obtenidos por citometría de flujo, se realizó la comparación de los muestreos a 3, 6 y 9 meses con respecto al muestreo basal (*Tiempo 0*), la trasposición de los histogramas indicaron que la formulación de GMLP presentaron cambios significativos en complejidad relativa a partir de los seis meses como se observa (*Imagen 15*).

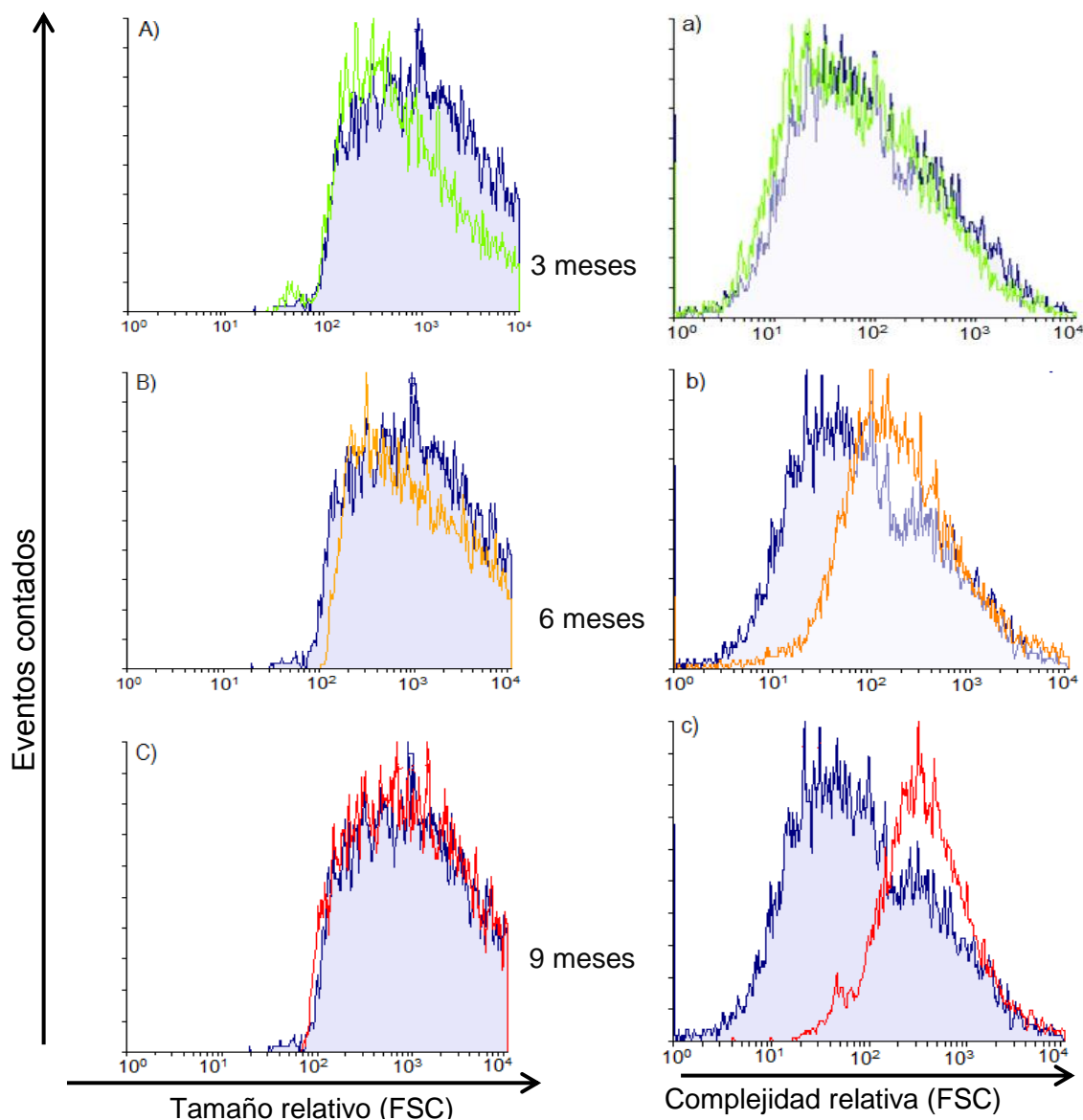


Imagen 15. Histogramas sobrepuestos de un lote de sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina que se encuentran en gel (GMLP) para el estudio de estabilidad a largo plazo a 4°C para complejidad relativa (SSC) y su respectivo tamaño (FSC). A) GMLP a 3 meses (verde); B) GMLP a 6 meses (naranja) y C) GMLP a 9 meses de muestreo (rojo), con su con se realizó la comparación con GMLP basal (azul).

➤ Análisis para semisólido del sistema liposomal que contiene penicilamina formulado en gel mucoadhesivo.

Para continuar con los estudios de estabilidad de acuerdo a la NOM-073, se realizó la descripción física, color, olor, pH y límites microbianos para la formulación liposomal en gel (*Tabla 15*), estas pruebas se realizaron al inicio y al término del estudio de estabilidad a largo plazo de 4°C como se observa en la Figura 12,13 y 14. Para la prueba de límites microbianos en la cual no hubo un crecimiento significativo de microorganismos, véase en el anexo, los resultados obtenidos indican que el GLMP mantiene la calidad, la inocuidad y la eficacia a lo largo del tiempo de almacenamiento del producto.

Análisis	Inicial	Final
Apariencia/ Descripción/ Aspecto	Semisólido, Gel de consistencia viscosa	Semisólido, Gel de consistencia viscosa
Color	Ligeramente opaco a traslucido	Ligeramente opaco a traslucido
Olor	De olor característico	De olor característico
pH	5.45	5.65
Límites Microbianos Inicio y final	Inicial No hubo crecimiento de microorganismos	Final No hubo crecimiento significativo de microorganismos

Tabla 15 Pruebas para semisólidos al sistema liposomal con penicilamina formulado en gel mucoadhesivo a tiempo inicial y al término de estudio de estabilidad a largo plazo a 4 °C

➤ **Evaluación del efecto antiinflamatorio de GMLP en un modelo de inflamación crónica inducida en ratones, como modelo experimental de Artritis reumatoide.**

Una vez que nuestros resultados previos indicaron que el sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina en gel mucoadhesivo es una formulación estable, fabricado en el Laboratorio 4 PB del Edificio UMIEZ de la FES-Zaragoza,; consideramos pertinente evaluar su efecto antiinflamatorio con un modelo experimental para inflamación crónica, el modelo se implementó para artritis reumatoide, de acuerdo con lo descrito en la sección de metodología. Los resultados obtenidos del peso de pellets húmedo y el peso seco (Tabla 16) para cada una de las dosis administradas, no se observa una diferencia estadística significativa.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Peso Húmedo	Peso seco
GMA vacío (+)	--	95.64±10.0	24.94±2.43
GMLP	1.6	92.44±16.44	21.62±2.76
GMLP	2.4	84.74±13.93	23.52±3.58
GMLP	3.2	81.08±10.3	23.14±3.93
GMLP	4	105.94±14.50	21.76±2.37
GMLP	4.8	97.98± 22.48	25.50±4.55
Gel Hidrocortisona (-)	15	76.92±16.55	23.58±3.70

Tabla 16. Peso húmedo y peso seco de los pellets de cada uno de los tratamientos.

Se observan que el sistema liposomal de penicilamina presenta una actividad antiinflamatoria con respecto a los grupos estudiados que se utilizaron para este ensayo, a partir del tejido granulomatoso formado, se observa (Tabla 17) que lo que fueron tratados con GMLP que el porcentaje de inhibición de la inflamación en los animales fue menor que el del grupo control positivo (hidrocortisona) y fue mayor con respecto al grupo positivo (placebo) de gel mucoadhesivo, además se observa que a la dosis 3.2 mg de GMLP se produjo una inhibición significativa, vease en Anexo tabla 20 en este se observa que el control positivo tiene la media más baja en comparación con las demás dosis.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Granuloma Peso seco	% inhibición
GMA vacío	--	24.94±1.09	-----
GMLP	1.6	23.52±1.60	5.6936648
GMLP	2.4	23.14±1.56	7.21732157
GMLP	3.2	21.76±1.06	12.7506014
GMLP	4	25.5±2.03	-2.24538893
GMLP	4.8	23.58±1.65	5.45308741
Gel Hidrocortisona	15	21.62±1.23	13.3119487

Tabla 17. Efecto de Gel mucoadhesivo contiene liposomas cargados de penicilamina en la formación granuloma en ratón a diferentes dosis a determinada inhibición.

11 Discusión de Resultados

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica degenerativa, que llega a incapacitar a alrededor del 2 por ciento de la población mexicana ¹³. En las últimas décadas se han desarrollado nuevos tratamientos para los pacientes que padecen AR, esto con la finalidad de disminuir los síntomas provocados por esta enfermedad y modificar su avance; sin embargo, la mayoría de los tratamientos presentan una baja biodisponibilidad, altas tasas de eliminación, selectividad limitada, efectos tóxicos, necesidad de altas dosis, además de costos elevados. Por esta razón, el desarrollo de nuevos medicamentos y liberación controlada son de suma importancia ya que buscan reducir toxicidad y en consecuencia mejorar el índice terapéutico⁵⁷

Los liposomas son una buena opción para transportar algunos fármacos debido a su composición y propiedades fisicoquímicas que les permiten no solo atrapar o contener un amplio espectro de fármacos, sino que también poseen la capacidad de una liberación específica y controlada de los mismos, esto a su vez, minimiza la cantidad de fármaco requerida para controlar en nuestro caso, la inflamación articular; razones por las cuales, hoy en día las formulaciones liposomales, especialmente de tamaño nanométrico, son de gran interés para el uso en el tratamiento^{58,59}.

Uno de los fármacos utilizados para el tratamiento de AR es la D-penicilamina como fármaco modulador de la enfermedad; no obstante, su uso se ha limitado a casos en los que no se hay respuesta a otros tratamientos, debido a su baja disponibilidad por vía oral y a sus efectos tóxicos a nivel sistémico.

Por lo anterior, se diseñaron liposomas como un sistema nanoacarreador capaces de encapsular a la D-penicilamina, dando como resultado una formulación inicialmente en suspensión que contiene un sistema liposomal que contiene D-penicilamina. Nuestros primeros resultados indicaron que los nanoacarreadores liposomales son esféricos y de tamaño entre 150 y 200 nm (*Figura 11*), así como que la encapsulación de la D-penicilamina no afectaba las propiedades ya conocidas del nanoacarreador en cuanto a tamaño y complejidad, lo que sugiere que la composición del sistema liposomal es la adecuada para una posible aplicación tópica. Es importante mencionar que aunque el sistema sí posee dimensiones nanométricas no es tan pequeño como para considerarse como un nanoacarreador formal; sin embargo, este tamaño favorece que el acarreador no pase por la piel completo, sino que quede adherido para que el fármaco pueda ser liberado lentamente entre las separaciones intercelulares de la piel.

Por otro lado, la morfología depende en gran medida del tipo de acarreador liposomal, así como el fármaco a encapsular, por lo que la microscopía de transmisión electrónica (TEM) permite caracterizar y fotografiar el sistema nanoacarreador proporcionando datos de su morfología, tamaño, lameridad e incluso la eficiencia de encapsulación.^{60,}

Comparando las imágenes de TEM se observa que el sistema acarreador liposomal sin penicilamina tiene un tamaño ligeramente menor, mientras que los liposomas que contienen penicilamina son de mayor tamaño y ligeramente más rugosos; además, que no cambian su morfología al formularlos en un gel. El cambio en el tamaño del sistema liposomal puede deberse a las propiedades fisicoquímicas de la D-penicilamina que al ser un aminoácido puede interactuar repeliendo los cationes presentes en uno de los lípidos que lo forma llamado espermidil-colesterol.

La mayoría de las formas farmacéuticas, especialmente los biológicos, están sujetos a cambios de temperaturas desde su proceso de fabricación, así como su traslado y almacenamiento; por lo que se requiere determinar su estabilidad para

poder ofrecer un medicamento seguro y eficaz. Dado que nuestra formulación del sistema liposomal con penicilamina en gel mucoadhesivo es una innovación se requirió caracterizarlo y someterlo a estudios de estabilidad con el objetivo de determinar si tanto la formulación como los componentes lipídicos y el fármaco encapsulado no se ven afectados ante variaciones de temperatura, permitiendo establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas para evitar la degradación de la penicilamina, además de seguir manteniendo sus propiedades después de un cierto periodo de tiempo ^{38,63}.

En cuanto a los resultados obtenidos de un lote del sistema liposomal que fue expuesto a tres temperaturas (4°C, 25°C y 40 °C) en un estudio de estabilidad a tiempo acelerado, los resultados correspondientes indicaron que la temperatura de mayor estabilidad es de 4°C y la menos estable es de 40°C lo que se considera excelente para su almacenamiento y para su liberación en la piel^{62,63}.

Con respecto al estudio de ciclaje se llevó al mismo tiempo que el estudio a tiempo acelerado, las condiciones de estrés de este estudio simulan variaciones de temperatura a las que el sistema liposomal formulado puede llegar a estar expuesto. Los resultados de ciclos de temperatura para GMLP a 4°, 25° C y 60° C indicaron que si el cambio de temperatura ocurre gradualmente, comenzando desde de 4° seguido de 25°C hasta llegar a 60°C, no se afecta al sistema liposomal que se mantiene en la Región 1 o principal al inicio ^{64, 65}.

Los primeros estudios que se realizaron a la formulacion del GMLP, determinaron que las vesículas que conforman el sistema acarreador liposomal eran estables a 4°C, por lo que se les sometio a un estudio de estabilidad a largo plazo por un periodo de 9 meses. Los resultados indicaron una estabilidad máxima de seis meses en refrigeración antes de que sucedan aglomeraciones de las vesículas. A este respecto nuestro grupo de trabajo ha solicitado una patente para mantener al sistema liposomal formulado en gel congelado hasta por 12 meses, lo que ayudaría a mantenerlo un tiempo adecuado en estante y además es importante

mencionar que el hecho de que las vesículas tiendan a agruparse no significa que pierdan su tamaño e integridad.

Los estudios de estabilidad proporcionan información muy relevante de las nuevas sustancias y productos farmacológicos que se desarrollan, contar con estos estudios que aseguren la calidad de un producto por un periodo de tiempo definido es de suma importancia, no solo garantiza la conservación de sus propiedades durante su periodo de vida útil sino además la seguridad de utilizarlos, de acuerdo a las pruebas que se realizaron como forma farmacéutica,^{40,62} el GMLP mantuvo su apariencia semisólida, de una consistencia viscosa con un color blanco translucido, además que tras un periodo de almacenamiento de casi 9 meses, en la prueba de límites microbianos, el recuento de microorganismos es prácticamente nulo por que el envase de polipropileno en la que se encuentra es el adecuado, además que contribuye en gran medida la baja temperatura a la que se mantuvo almacenada por lo que se vio limitada la contaminación del GMLP, estas pruebas ayudan a determinar el tiempo de degradación química, física y biológica.

Existen ciertas formulaciones que pueden llegar desestabilizarse cuando se cambia el pH externo; generalmente de un pH neutro o ligeramente alcalino a un pH ácido, en el caso de esta formulación de GMLP el comportamiento del sistema liposomal a diferentes pH en función al tiempo, tras cinco días de exposición,, el tamaño relativo de la población no tuvo cambios que sugieran que la integridad del sistema liposomal sea afectada, es importante que el tamaño se mantenga porque el aumento de tamaño puede afectar directamente su eficacia; mientras que al comparar los histogramas con respecto a complejidad se observa que al modificarse el pH la complejidad se afecta significativamente a pH 7.0. Este cambio sugiere que los cambios de pH no solo modifican la consistencia del gel, sino también la complejidad o aglomeración del sistema. Los resultados obtenidos por citometría de flujo a pH 7 muestran la presencia de dos poblaciones indicando que se alteró la complejidad relativa, lo que podría significar un daño a la integridad del liposoma; característica que en un pH fisiológico facilitaría la

liberación adecuada del fármaco, siendo en algunos casos el desarrollo de formulaciones de liposomas sensibles a cierto margen de pH, para una administración intracelular efectiva de terapias antígeno, quimioterapia, ADN esto permite que sirvan como adyuvantes inmunológicos para mejorar la respuesta inmune⁶⁶

En cuanto a las pruebas de fotoestabilidad, indicaron que nuestro sistema liposomal acondicionado en un sistema contenedor no es fotosensible, lo que podría implicar que su presentación pudiera ser más económica al no requerir protección a la luz.

Con los resultados obtenidos de la caracterización y las pruebas de estrés a las que fue sometido la formulación del sistema nanoacarreador liposomal con penicilamina en gel (GMLP), se puede pensar que esta formulación que se encuentra en proceso de patentamiento, tiene la capacidad de mantener los liposomas de penicilamina estables, por un periodo de aproximadamente 6 meses, debe mantenerse a pH entre 5.0-5.5 y a 4°C lo que permite mantener su apariencia semi-sólida e íntegra.

Es de suma importancia formas farmacéuticas estables estas permitirán llevar una adecuada administración e incluso dependerá el efecto buscado, anteriormente se sugería en el caso de la penicilamina que se requería de un portador específico para su absorción⁶⁷. Por lo tanto las características de nuestro novedoso sistema liposomal lo colocan como un buen candidato para vehicular por vía tópica a la D-penicilamina, al facilitar una liberación lenta por su tamaño así como por la adhesividad a la piel; permitiendo que la liberación pueda ser sitio específica en el lugar de la inflamación articular, evitando efectos adversos y mala absorción.

Existen diversas investigaciones donde se hace uso de formulaciones de gel liposomal para un suministro tópico, se ha demostrado que los liposomas pueden aumentar la penetración de algunos fármacos a través de la piel, lo que evita la degradación gástrica y minimiza los efectos secundarios sistémicos, en el caso

de la AR reumatoide se han desarrollado varias formulaciones que contienen liposomas que van desde antiinflamatorios hasta FARMES; una de esas formulaciones es gel niosomal con celecoxib y los estudios *in vivo* revelaron una reducción significativa del edema de la pata de la rata en comparación con celecoxib libre, lo que sugiere que en este caso el gel niosomal disminuyó la inflamación al aumentar la permeabilidad de la piel, la localización y la liberación prolongada del fármaco ^{58,68,69}

El fluido adsorbido influye en gran medida en el peso húmedo del granuloma, mientras que el peso seco se correlaciona con la cantidad de tejido granulomatoso formado⁷⁰. Este ensayo con el pellet de algodón dio como resultado la formación de tejido granulomatoso, que está constituido principalmente por macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, dependiendo de los agentes etiológicos involucrados en la inflamación crónica ^{48,71,72}.

La actividad antiinflamatoria de la formulación de GMLP, mostró una reducción significativa en la formación de tejido granulomatoso dependiente de las dosis que se administraron, probablemente se ejerció un efecto inhibitorio sobre algunos de los mediadores de la inflamación inducida.

Por otro lado el análisis estadístico ANOVA se observó diferencia significativa del grupo tratado con GMLP con respecto al grupo control negativo $p < 0.05$, lo que indica que el sistema liposomal de penicilamina en gel demostró que se presenta un efecto antiinflamatorio siendo una dosis intermedia de la formulación, ya que se desarrolló una inhibición similar al control positivo en el que se usó hidrocortisona.

Podemos determinar qué el modelo experimental que se implementó para desarrollar uno de los síntomas principales de la AR, y el efecto antiinflamatorio que genera la formulación de GMLP, permite que se considere un modelo *in vivo* confiable para estudiar la afección inflamatoria crónica presente en la membrana sinovial de pacientes con AR

El comportamiento de una formulación liposomal que contenga un principio activo puede ser muy diferente de este al ser administrado en forma directa, lo puede tener impacto notable en la eficacia y seguridad del producto, por esta razón, es de suma importancia contar con los estudios preclínicos de la formulación liposomal, para ello el presente trabajo está aportando la adecuada caracterización de la formulación.

12 Conclusiones

- Se fabricó y caracterizó una formulación en gel que contiene liposomas cargados de D-penicilamina determinando su morfología esférica y su tamaño entre 150-200 nm.
- Se determinó la estabilidad de la formulación en gel a 4°C y a un pH 5-5.5.
- Se implementó un modelo de inflamación crónica de para artritis reumatoide en ratones CBA.
- Se encontró que a 3.2 mg/Kg de gel liposomal con D-penicilamina se alcanza la máxima actividad antiinflamatoria.

13 Perspectivas

La formulación que se desarrolló en el laboratorio L4 de la planta baja de la UMIEZ, de la FES Zaragoza, de acuerdo a los resultados se obtuvo una formulación estable de gel mucoadhesivo que contiene liposomas catiónicos cargados de penicilamina.

Por otra parte se requiere cuantificar la penicilamina que está siendo encapsulada dentro del liposoma, durante el desarrollo de este proyecto se procedió a la cuantificación de penicilamina, por medio de una reacción de ninhidrina que reacciona en presencia de grupos amino formando el complejo de púrpura de Ruhemann, sin embargo al no ser un método validado, no fue factible debido a la sensibilidad de la reacción, ya que se debe tener cuidado con la temperatura, el tiempo de exposición a la reacción, la luz, el pH para llevarla a cabo, por lo que se requiere desarrollar y validar un método por HPLC que permita realizar la cuantificación adecuada de cada componente de la formulación, considerando que para la composición del liposoma se utiliza un lípido catiónico que contiene múltiples aminas en su estructura, se requiere para determinar la eficacia de atrapamiento de la penicilamina, a su mismo se podrá determinar el porcentaje de degradación del fármaco.

Con el desarrollo de la formulación de GMLP se observó una actividad antiinflamatoria, se sugiere seguir la línea de investigación con este modelo de inflamación crónica, siendo el siguiente paso una curva-dosis cuantitativa para determinar DE₅₀ y validar los resultados obtenidos recomendaría realizar un inmunoensayo para medir cuantitativamente la disminución de citocinas que se presentan durante la enfermedad RA, como son la Interleucina₆ (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Interferón- γ (IFN- γ), El factor de necrosis tumoral (TNF).

14 Anexos

Limites microbianos



Figura 12. Placas de cultivo para la prueba de límites microbianos para GMLP, se muestra placas de Agar Papa Dextrosa para el recuento de hongos filamentosos y levaduras de Gel Mucoadhesivo que contiene liposomas cargados de penicilamina al tiempo inicial del estudio.

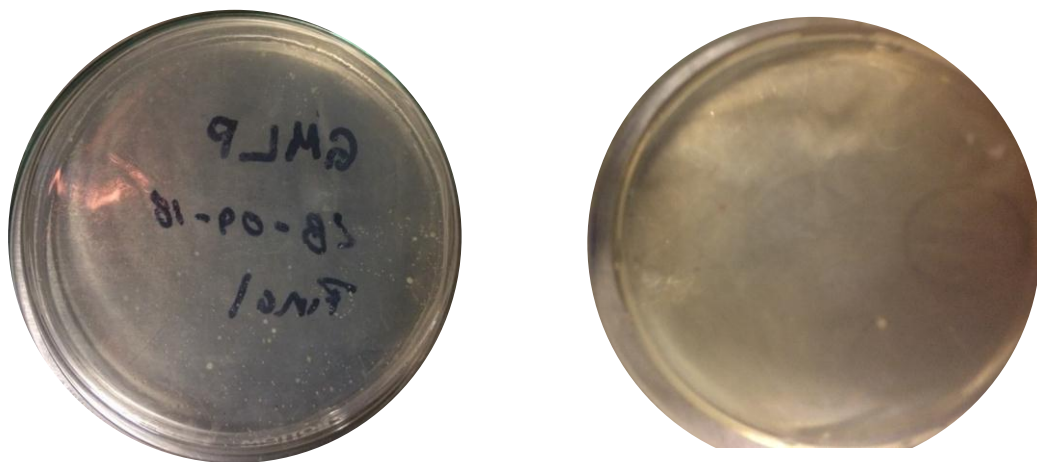


Figura 13 Placas de cultivo para la prueba de límites microbianos para GMLP, se muestra placas de Agar Papa Dextrosa para el recuento de hongos filamentosos y levaduras de Gel Mucoadhesivo que contiene liposomas cargados de penicilamina al tiempo final del estudio de estabilidad a largo plazo.

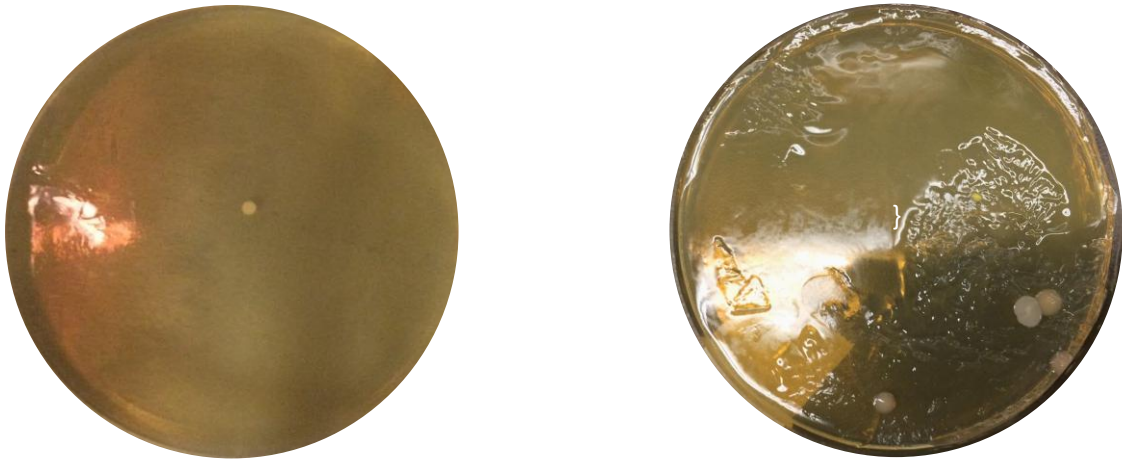


Figura 14. Placas de cultivo para la prueba de límites microbianos para GMLP, se muestra placas de Agar Soya Trypticaseína para el recuento de microorganismos mesofílicos aerobios en Gel Mucoadhesivo que contiene liposomas cargados de penicilamina de lado izquierdo se observa al inicio del estudio y a la derecha se observa una cantidad de colonias de bacterias mínima al muestreo de tiempo final del estudio.

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	S.E.M	Intervalo de confianza para la media 95%		Mínimo	Máximo
					Mínimo	Máximo		
Gel vacío	5	24.94	2.4378	1.0902	21.913	27.967	21.8	28.6
Gel Hidrocortisona	5	21.62	2.7635	1.2359	18.189	25.051	18.2	24.5
GMLP 1.6 mg/Kg	5	23.52	3.5843	1.6029	19.070	27.970	18.4	27.6
GMLP 2.4 mg/Kg	5	23.14	3.9342	1.7594	18.255	28.025	18.6	28.1
GMLP 3.2 mg/Kg	5	21.76	2.3744	1.0619	18.812	24.708	18.9	23.9
GMLP 4 mg/Kg	5	25.50	4.5541	2.0367	19.845	31.155	19.7	32.0
GMLP 4.8 mg/Kg	5	23.58	3.7090	1.6587	18.975	28.185	18.1	27.8
Total	35	23.43	3.2745	1.4643	19.294	27.580	19.1	27.5

Tabla 18. Valores de la media, desviación estándar y el error típico para peso pellets seco

Comparaciones múltiples

Peso de Pellets Seco (mg)

HSD Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Gel vacío	Gel	3.3200	2.1652	.723	-3.548	10.188
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 1.6</u>	1.4200	2.1652	.994	-5.448	8.288
	<u>GMLP 2.4</u>	1.8000	2.1652	.979	-5.068	8.668
	<u>GMPL 3.2</u>	3.1800	2.1652	.760	-3.688	10.048
	<u>GMLP 4.0</u>	-.5600	2.1652	1.000	-7.428	6.308
	<u>GMLP 4.8</u>	1.3600	2.1652	.995	-5.508	8.228
Gel hidrocortisona	<u>Gel vacío</u>	-3.3200	2.1652	.723	-10.188	3.548
	<u>GMLP 1.6</u>	-1.9000	2.1652	.973	-8.768	4.968
	<u>GMLP 2.4</u>	-1.5200	2.1652	.991	-8.388	5.348
	<u>GMPL 3.2</u>	-.1400	2.1652	1.000	-7.008	6.728
	<u>GMLP 4.0</u>	-3.8800	2.1652	.564	-10.748	2.988
	<u>GMLP 4.8</u>	-1.9600	2.1652	.969	-8.828	4.908
GMLP 1.6	<u>Gel vacío</u>	-1.4200	2.1652	.994	-8.288	5.448
	<u>Gel</u>	1.9000	2.1652	.973	-4.968	8.768
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 2.4</u>	.3800	2.1652	1.000	-6.488	7.248
	<u>GMPL 3.2</u>	1.7600	2.1652	.982	-5.108	8.628
	<u>GMLP 4.0</u>	-1.9800	2.1652	.967	-8.848	4.888
	<u>GMLP 4.8</u>	-.0600	2.1652	1.000	-6.928	6.808
GMLP 2.4	<u>Gel vacío</u>	-1.8000	2.1652	.979	-8.668	5.068
	<u>Gel</u>	1.5200	2.1652	.991	-5.348	8.388
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 1.6</u>	-.3800	2.1652	1.000	-7.248	6.488
	<u>GMPL 3.2</u>	1.3800	2.1652	.995	-5.488	8.248
	<u>GMLP 4.0</u>	-2.3600	2.1652	.926	-9.228	4.508
	<u>GMLP 4.8</u>	-.4400	2.1652	1.000	-7.308	6.428

<i>Continuación de tabla</i>						
GMPL 3.2	<u>Gel vacío</u>	-3.1800	2.1652	.760	-10.048	3.688
	<u>Gel</u>	.1400	2.1652	1.000	-6.728	7.008
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 1.6</u>	-1.7600	2.1652	.982	-8.628	5.108
	<u>GMLP 2.4</u>	-1.3800	2.1652	.995	-8.248	5.488
	<u>GMLP 4.0</u>	-3.7400	2.1652	.604	-10.608	3.128
	<u>GMLP 4.8</u>	-1.8200	2.1652	.978	-8.688	5.048
GMLP 4.0	<u>Gel vacío</u>	.5600	2.1652	1.000	-6.308	7.428
	<u>Gel</u>	3.8800	2.1652	.564	-2.988	10.748
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 1.6</u>	1.9800	2.1652	.967	-4.888	8.848
	<u>GMLP 2.4</u>	2.3600	2.1652	.926	-4.508	9.228
	<u>GMPL 3.2</u>	3.7400	2.1652	.604	-3.128	10.608
	<u>GMLP 4.8</u>	1.9200	2.1652	.972	-4.948	8.788
GMLP 4.8	<u>Gel vacío</u>	-1.3600	2.1652	.995	-8.228	5.508
	<u>Gel</u>	1.9600	2.1652	.969	-4.908	8.828
	<u>hidrocortisona</u>					
	<u>GMLP 1.6</u>	.0600	2.1652	1.000	-6.808	6.928
	<u>GMLP 2.4</u>	.4400	2.1652	1.000	-6.428	7.308
	<u>GMPL 3.2</u>	1.8200	2.1652	.978	-5.048	8.688
	<u>GMLP 4.0</u>	-1.9200	2.1652	.972	-8.788	4.948

Tabla 19 Descriptivo del peso seco, en el que se observa una diferencia significativa entre los grupos control (+) hidrocortisona, Grupo (-) y la diferentes dosis de GMLP

Peso de Pellets Seco (mg)		
HSD Tukey ^a		
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Gel	5	21.620
hidrocortisona		
GMPL 3.2	5	21.760
GMLP 2.4	5	23.140
GMLP 1.6	5	23.520
GMLP 4.8	5	23.580
Gel vacío	5	24.940
GMLP 4.0	5	25.500
Sig.		.564

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.000.

Tabla. 20 Valor promedio de la media obtenida de los pellets secos

15 Bibliografía

1. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2015 [Citado 10 Agosto 2018];10(102):975-99. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324542/#b7-ijn-10-975>
2. Akbaradeh A., Davaran S., Rezael-Sadabady R., Zaraghami N. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [Internet]. 2013 [Citado 10 Ago 2018];8(102):1-9. Disponible: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
3. Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A., and Ciccolini J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm.* [Internet]. 2012 [Citado 08 Ago 2019]; Published online (2012):11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302123/>
4. Lasic D. Papahadjopoulos D. *Medical applications of liposomes*. Elsevier; Netherlands 1998 p.1-5
5. Dowhan W, Bogdanov M, Mileykovskaya E. Functional Roles of Lipids in Membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 6 ed. EUA; Elsevier; 2016. p. 1-14
6. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* [Internet]. 2017 [citado 08 Ago 2019]; 9(2): 12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489929/#>
7. Morris J, Harti D, Lue R. *Biology: How Life Work*, 2ed. New York: W.H Freeman and Company; 2016
8. Torelló M., Viscasillas A. Y Del Pozo A. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas *OFFARM* [Internet]. 2002 [Citado 10 Ago 2018];8(102):1-9 VOL 21 NÚM 9 OCTUBRE 2002
9. Alavi M., * N, and Safaei M, Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems *Adv Pharm Bull.* [Internet]. 2017 [Citado 21 de noviembre del 2018];7 (1): 3–9. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426731/>

10. Lapinski M. Castro-Forero A. Greiner A. Ofoli R. Blanchard G. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore ACS[Internet].2007 [23-Ago-19] , 23(11)677-683 Disponible en:
11. Dua J.. Rana A. Bhandari A. Liposome: methods of preparation and applications. IJPSR [Internet].2012 [23-Ago-19] 3(2):14-20 Disponible en: <https://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
12. Papahadjopoulos D, Kimelberg HK. Progress in Surface Science. Oxford: Pergamon; 1973. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins; pp. 141–149.
13. Gob.Mx. [Internet]. México:ISSSTE;2016 Día Mundial de la Artritis [actualizado 11 Oct 2016; citado 4 feb 2018]. Disponible en:<https://www.gob.mx/issste/articulos/dia-mundial-de-la-artritis-72879?idiom=es>
14. Guía de Práctica clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Artritis Reumatoide del Adulto. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010
15. Wang Q, Sun X. Recent advances in nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis. Biomater. Sci [Internet]. 2017[Citado 20 Sep 2019];5(8):1407 1420. Disponible: <https://doi.org/10.1039/c7bm00254>
16. Bazille C.,K Ea-H., Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. EMC [Internet]. 2008[Citado 3 Dic 2018]; 41(4): 1–6. Disponible:[https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(08\)70912-2](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(08)70912-2)
17. Ramon S., Sanchez-Longo F. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. Reumatol Clin; [Internet]. 2011[Citado 10 Oct 2018];8(102):1-9. Disponible: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/interleucinas-fisiopatologia-artritis-reumatoide-mas/articulo/S1699258X11000222/>

18. Izquierdo E., Pablo J. Pannus y artritis reumatoide: Revolución histórica y fisiopatológica. Elsevier. [Internet]. 2008[Citado 3 Dic 2018]; 14(4): 95–142. Disponible: <http://www.elsevier.es/es-revista-seminarios-fundacion-espanola-reumatologia-274-articulo-fibroblastos-sinoviales> S1577356613000419
19. Karmakar S, Kay J, Gravalles EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010;36: 385–388.
20. Saadany H. Hussein M. Gaber R. Th-17 cells and seruma IL-17 in rheumatoid arthritis patiens: Cond severy [Internet]. 2015; [Citado 8 Ene 2019] 38:1 -7
21. Cope A., T cells in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* ; [Internet]. 2008 [Citado 15 Nov 2018]; 10 (Suppl 1): S1. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582813/>
22. Cañete J. Introducción a la interleucina-17 *Reumatol Clin Supl*. [Internet]. 2018; [Citado 8 Ene 2019] 14(1):2-7
23. Gaffen S. Curr Rheuma Role of IL-17 in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis *The EGYothan Rheumatologist* [Internet]. 2009; [Citado 8 Ene 2019] 11(5):365-370; Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811488>
24. Gómez J., El papel del factor de necrosis tumoral en la inflamación y el daño articular en la artritis reumatoide *Reumatol Clin* [Internet]. 2002; [Citado 3 Dic 2018]; 1 (S2): 1-4. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582813/>
25. Guia de referencia rápida. Diagnóstico y Tratamiento de Artritis Reumatoide del Adulto. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, Consejo de Salubridad General 2010.
26. Laar M., Mart van Laar, Pergolizzi J, Mellinghoff H, Morón I., Nalamachu S, O'Brien J. Pain Treatment in Arthritis-Related Pain: Beyond NSAIDs. [Internet]. 2012; [Citado 21 Nov 2018]; 6:320–330. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527878/>
27. Kahlenberg M., Fox D., Advances in the Medical Treatment of Rheumatoid Arthritis Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135413/>
28. Ortiz A., Gonzales I., Laffon A. Mecanismos de acción de fármacos modificadores de la evolución de la artritis reumatoide. Elsevier.es [Internet].

2001; [Citado 23 Nov 2018] 10:405-436 - Vol. 28 Núm.10 Disponible:
<http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-mecanismos-accion-farmacos-modificadores-evolucion-13024115>

29. Moffat A. Osselton D. Widdop B. Clarke's Analysis of Drug and posion in pharmaceuticals. 13 ed. EUA; 2005.
30. Ching Chiu C, Penicillamine. En: Florey K, Bishara R, Grady R, et al, editors. Analytical profiles of drug substances. Vol 10. USA: Academic Press Inc; 1981. p. 598-637
31. Ishak R., Abbas O. Penicillamine Revisited: Historic Overview and Review of the Clinical Uses and Cutaneous Adverse Effects Am J Clin Dermatol [Internet]. (2013) [Citado 23 Nov 2018];14:223–233
32. Lacy C, Armstrong L, Lipsy R, LanceL.. Drug Information Handbook. . Cleveland: LEXI-COMP INC;1993. Pág 691-693
33. Poole V, Andrew M. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach. 2 ed. United states: lippincont William & Wilkins ;2006. Pág 527-534
34. S. Swetman. The complete Drug Reference Martindale, Vol. 1. 35 ed. Londres: Pharmaceutical; 2007.
35. Aulton M. Farmacia La ciencia del diseño de formas farmacéuticas. 2 ed, Madrid: Elsevier; 2004
36. Secretaria de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11ed (2016); México D.F.
37. Remington The Science and practice of pharmacy, 21 ed. USA: Lippincott William Awilkins; 2005
38. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios D.O.F. 07/06/2016
39. Sarabia M, López R, Rivera P. Cervantes A, Estabilidad de fármacos y medicamentos. México: UNAM;2004
40. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Directrices para las pruebas de estabilidad de

productos farmacéuticos que contienen sustancias medicamentosas bien establecidas en formas farmacéuticas corrientes. Geneva: World Health Organization; 2006. Anexo 5 del informe 34. Pág:71 -75

41. Hawley TS, Hawley RG. Flow Cytometry Protocols. 2 ed. Methods in molecular biology 263. USA:Human Press INS; 2004
42. Rahman M. Lane A, Swidell A, Introduction to Flow Cytometry. AbD Serotec ; USA 2005
43. Cell Signal [Internet]. Danvers MA : Cell Signaling Technologt; [2019 ;citado 4 sep 2019]. Disponible en:https://www.cellsignal.com/contents/_/overview-of-flow-cytometry/flow-cytometry-overview
44. Hawley TS, Hawley RG. Flow Cytometry Protocols. 4 ed. Methods in molecular biology 1678. Springer Science+Business Media. Human Press INS; USA 2018
45. Li P., Schwarz E. The KRN mouse model of inflammatory arthritis Springer Semin Immunopathol (2003) [Citado 21 Nov 2018];25:79–90
46. Guma M., Modelos animales en la artritis reumatoide Reumatol Clin [Internet]. 2008; [Citado 30 Ago 2018]4:129-31 - Vol. 4 Núm.4 Disponible: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/modelos-animales-artritis-reumatoide/articulo/S1699258X08718205/>.
47. Marroquín R, Flores M, Carreón R, García M, Mora J, Aguilar A, Hernández A. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. J Ethnopharmacol. 2009; 124(3):639-641
48. Kumar R, Kumar G, and Singh S. Anti-inflammatory and anti-granuloma activity of *Berberis aristata* DC. in experimental models of inflammation Indian J Pharmacol. 2016; 48(2): 155–161.
49. Balasubramanian T, Chatterjee T, Sarkar M , Sundar L Anti-inflammatory Effect of *Stereospermum Suaveolens* Ethanol Extract in Rats Pharm Biol 2010 Mar;48(3):318-23.

50. Brutoon L. Chabner B. Knollman B. Godman and Gilman, Las bases farmacológica y terapéutica, 12 ed. México: Mc Graw Hill Interamerican Editores; 2012
51. Moron F., Levi M. Farmacología General. Francisco J. Morón Rodríguez. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002
52. WHO. Chronic rheumatic conditions. [Internet]. World Health Organization; 201. [Citado 14 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>
53. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno J, Álvarez J, Burgos R, Garza M, et al., Grupo de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Músculo Articulares (GEEMA). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. J Rheumatol. 2011; 86:3-8.
54. ISSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado [Internet]. México: ISSTE gob.mx.; 2015 [citado 04 oct 2018]. Detección y tratamiento oportuno de artritis evitan hasta 80% de daño estructural a pacientes. Disponible en: <https://www.gob.mx/issste/prensa/deteccion-y-tratamiento-oportuno-de-artritis-evitan-hasta-80-de-dano-estructural-a-pacientes>
55. Rangel R., Corona T., Soto R., Weiss-Steider B., Gil E.. Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cancer de cervix uterino, empleando liposomas. An. Real Acad. Farm. 2014;80 (1)179-191
56. Olajide O.A., Makinde J, Awe S. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. Journal of Ethnopharmacology 66 (1999) 113 – 117
57. Rubinstein I. Weinberg G. Nanomedicines for chronic non-infectious arthritis: The clinician's perspective Nanomedicine: 8(2012) Pag 77-82
58. M. van den Hoven, H. Beijnen, G Storm Sophie R. Van Tomme, M. Metselaar, B. Nuijen, Liposomal Drug Formulations in the Treatment of Rheumatoid Arthritis.
59. Vanniasinghe A, Bender V, Manolios N, The Potential of Liposomal Drug Delivery for the Treatment of Inflammatory Arthritis. 2009 ;39(3):182-96.

60. K. Childers, S. Michalek, J. Eldridge, F. Denys, A. Berry, MR. cGhee. Characterization of liposome suspensions by flow cytometry
61. Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, L, et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. 2011; 6: 557–563.
62. Corona T., Soto R., Rangel R., Huante R., Aguilar L., Weiss-Steider B. A novel nanocarrier System for Cancer Treatment. *Current nanomedicine nanomedicine*. 2016;6:133-145
63. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation: Pharmaceutical Quality/CMC; 2018. 1-3,8-9 p
64. International Conference On Harmonization Of technical Requirements For Registration of Pharmaceutical For Human Use. ICH Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/biological product Q5C [January 6, 1996, PMSB/ELD Notification No.6]
65. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) Guidance for Industry Stability Testing of Drug Substances and Drug Products DRAFT GUIDANCE [June 1998]
66. Paliwal S, Paliwal R, S, A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery *Drug Deliv*. 2015 May;22(3):231-42
67. Wass M, Evered DF. Transport of penicillamine across mucosa of the rat small intestine in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1970 Apr;19(4):1287-95.
68. Alam Z, Omer S, Chan-Hee Y, Muhammad A, Hyung-Seo, Myung-Sic Kim et al. Enhanced anti-rheumatic activity of methotrexate-entrapped Ultradeformable liposomal gel in adjuvant-induced arthritis rat model. *International Journal Pharmaceutics* 525(2017) 92-100

69. Auda S, Fathalla D, Fetih G, EL Badry M, Shakeel F. Niosomes as transdermal drug delivery system for celecoxib: in vitro and in vivo studies volume 73, pages1229–1245(2016)
70. Deorukhakar R, Dethle A, Vohra R, Ghosh R, J. Chaudhary and Kadam V . Antiinflammatory activity of a polyherbal formulation. Indian J. Pharm. Sci., 2008, 70 (6): 785-787
71. Olajide O.A., Kolawole O.T. , Fagbohun T., and Ajayi F. Evaluation of the Anti-inflammatory Properties of Chlorophora excelsa Stem Bark Extract Pharmaceutical Biology 2005,. 43(9),746–748
72. Masashi K., Minagawa T., Up- regulation of granulomatous inflammation in interleukin-6 knockout mice infected with *Rodococcus aurantiacus*. *Immunology*.2003;110:501-506
73. Room G., Roffe L, And Maini R.N. Inhibitory effect of D- penicillamine on human lymphocyte cultures stimulated by phytohaemagglutinin, the antagonistic action of L-cysteine and synergistic action by copper sulphate. *Scand.J.Rheumatol, suppl.* (1979): 28, 45-57