

SISTEMAS NANOPARTICULADOS
BASADOS EN LÍPIDOS
DESTINADOS AL TRATAMIENTO DE
NEOVASCULARIZACIONES
OCULARES



Farm. María Lina Formica

2018

*Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica- CONICET*

SISTEMAS NANOPARTICULADOS BASADOS EN LÍPIDOS DESTINADOS AL TRATAMIENTO DE NEOVASCULARIZACIONES OCULARES

Trabajo de Tesis para acceder al grado de
Doctor en Ciencias Químicas de

Farm. María Lina Formica

Director

Prof. Dr. Santiago Daniel Palma

Co-Directora

Prof. Dra. María Cecilia Sánchez

Comisión Evaluadora

Prof. Dra. Gladys Ester Granero

Prof. Dr. Mario Eduardo Guido

Prof. Dra. Paula Susana Schaiquevich

Prof. Dr. Ismael Darío Bianco

A mis padres y hermano,

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera me han acompañado durante mi Trabajo de Tesis:

A mi director Santiago, por confiar en mi y abrirme las puertas de la investigación. Gracias por motivarme y presentarme siempre nuevos desafíos para seguir creciendo en esta hermosa profesión.

A la Dra. Cecilia Sánchez, por haber aceptado ser mi co-directora, por recibirme en su laboratorio, por su compromiso y conocimientos brindados.

A la comisión evaluadora: a la Dra. Gladys Granero y el Dr. Mario Guido por sus grandes aportes durante el desarrollo de la tesis. A la Dra. Paula Schaiquevich y Dr. Ismael Bianco por haber aceptado ser evaluadores externos del presente trabajo y por sus constructivas observaciones.

Al Dr. Jean-Pierre Benoit por recibirme y hacerme sentir parte de su laboratorio, por sus grandes contribuciones en este trabajo y por su predisposición para cada consulta.

A Gabi, por ayudarme en los primeros pasos en la "mesada" y su aporte científico en todas las etapas de este trabajo. Gracias por oficiar de traductora más de una vez, por las caminatas francesas y convertirme en una amiga.

Al Dr. Daniel Allemandi, director de UNITEFA, por tenerme siempre en cuenta y hacerme sentir parte de la Unidad.

Al departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por el espacio físico para desarrollar este trabajo y, a las instituciones y programas que brindaron los medios económicos para llevarlo a cabo: CONICET y SECYT-UNC, FONCYT. A los organismos que brindaron apoyo económico para mis estadías de investigación mediante los programas BEC.AR y Saint Exupery.

A Flori y Lauri, por su hermosa amistad y tantos momentos compartidos en esta etapa. Gracias por su ayuda desinteresada en lo académico, por su "asesoría" y HPLC eternos. Gracias, principalmente, por estar siempre, por la complicidad y ser incondicionales en la vida como "amigas-hermanas".

A los amigos del laboratorio "114/209 y anexos" por el aguante diario, la ayuda, los favores "morochos", las bromas, los mates, los bailes, la empatía y la buena onda para trabajar: Danielita, Carito Be., Ale, Juanpi, Nacho, Naty, Lu C., Mel, y Nahuel. A Marina y Caro Bo. por la contención y la linda amistad que construimos

estos años. A Franco B. por las charlas de café y tantas anécdotas. A mis "comunitarios" por la complementariedad para hacer docencia con alegría, dedicación y entusiasmo. A "Bessonita" por darme suerte en las entregas de papeles y ser una gran amiga.

A los compañeros del 210 y profes del grupo de Farmacotecnia por los lindos momentos compartidos. A los compañeros del departamento de Ciencias Farmacéuticas, especialmente a "Los de la Punta" por sus mates y buena onda.

A Coti, Pauli y Pablo del CIBICI, por la gran ayuda y paciencia en enseñarme e instruirme en un terreno desconocido para mí.

A los amigos que me acompañaron en las estadías en Angers, en especial a Juan y Hélène por todo lo compartido en viajes y horas francesas de laboratorio. A Jérôme y Samuel por su compromiso con el proyecto.

A mis "amigas, amigas", el clan al cual pertenezco desde mi niñez, por esta hermosa amistad que tiene tantos años como nuestra edad y que me acompañó durante toda esta etapa (gracias Pali por acompañarme y bancarme emocionalmente siempre). A mis amigas que están siempre presentes: Emi, Agus M., Lu B., Romi y a mis "amigachas" de la carrera.

A mi familia hermosa que disculpa mis ausencias y siempre se alegran de mis logros: a mis primos y primas, a mis tíos y tías, a mis ahijados y "pequeños", a mi madrina.

A mi abuela, "maestra de la vida", por transmitirme el placer por viajar y disfrutar de las pequeñas cosas de la vida. Gracias por tu calidez y tantos rezos.

A mi hermano querido por su compañerismo, bromas y aguante diario. Gracias "Tato" por ser tan incondicional y mi gran amigo.

A "MIS PAPÁS", que me construyeron de perseverancia, por enseñarme que ante todo se puede encontrar el camino para alcanzar las metas. Gracias por el amor y el apoyo incondicional. Gracias Papá por tu lealtad, contención y franqueza. Gracias Mamá por enseñarme a que las cosas se hacen bien (o no se hacen), por transmitirme la pasión por la ciencia, por enseñarme a volar desde pequeña con blusitas con voladitos.

Gracias Señor, porque nunca me dejas sola, por las pruebas, por la fortaleza, por el amor y por cruzarme con todas estas personas en el camino.

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis Doctoral, se centró en el desarrollo de nuevas Plataformas de Liberación de Fármacos (PLFs) basadas en nanotecnología como estrategia de optimización de la farmacoterapia relacionada a patologías oculares neovasculares. El trabajo comprendió, la obtención de nanocápsulas lipídicas para la vehiculización de acetónido de triamcinolona y bevacizumab, abordando la terapia convencional para el tratamiento de estas patologías. Además, se estudió el efecto de doxiciclina clorhidrato sobre la angiogénesis como terapia alternativa.

En cuanto al desarrollo tecnológico, por un lado, se obtuvieron nanocápsulas lipídicas cargadas con acetónido de triamcinolona (NCLs-TA) mediante el método de inversión de fases, luego de un estudio acabado sobre la composición, incorporación del fármaco y estabilidad de la formulación. Las NCLs-TA mostraron un tamaño medio de partícula (TMP) menor a 50 nm, una distribución estrecha de tamaño y un potencial zeta (PZ) levemente negativo. Además, las NCLs-TA no resultaron citotóxicas en Células Epiteliales de Córnea Humana y, mostraron una reducción de la secreción de interleuquina (IL)-6 en un modelo de eficacia terapéutica *in-vitro*, a partir del cual se puede inferir la efectividad de su efecto antiinflamatorio.

Por otro lado, se obtuvieron nanocápsulas lipídicas cargadas con bevacizumab (NCLs-BVZ) a partir de 1,5 mg; 2,5 mg y 3,0 mg inicales de anticuerpo, mediante el método de post-inserción. Las formulaciones mostraron un TMP entre 123 y 314 nm, un índice de polidispersidad entre 0,23 y 0,39; un PZ entre -28 y -14 mV, y una capacidad de carga de anticuerpo entre 1,30 y 2,94 mg. Las NCLs-BVZ demostraron la capacidad de bevacizumab de unión a su antígeno (Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular) *in-vitro* y, una reducción de la formación de túbulos en un estudio de angiogénesis *in-vitro*, a partir del cual se puede inferir su efecto antiangiogénico.

Por último, en el estudio de prueba de concepto del efecto antiangiogénico de doxiciclina clorhidrato, se demostró que este fármaco reduce la secreción de metaloproteinasas de matriz tanto en estudios *in-vitro* como en homogenatos de

retina provenientes de estudios *in-vivo* y, además, demostró la reducción de formación de túbulos en un estudio de angiogénesis *in-vitro*.

En este trabajo, tanto la mejora de la terapia convencional de enfermedades oculares neovasculares como la exploración de nuevas terapias alternativas se abordaron con éxito. En este sentido, ambas formulaciones de nanocápsulas lipídicas como el nuevo fármaco alternativo ensayado pueden ser una estrategia interesante para mejorar la efectividad y la seguridad de los tratamientos de las enfermedades oculares neovasculares.

SUMMARY

This Doctoral Thesis was focused on the development of a new drug delivery platform based on nanotechnology as strategy to optimize the pharmacotherapy related to neovascular eye diseases. In this work, lipid nanocapsules for delivery of triamcinolone acetonide and bevacizumab were obtained in order to overcome some unfavourable properties associated with these drugs. In addition, the effect of doxycycline hydrochloride on angiogenesis as an alternative therapy was studied.

Triamcinolone acetonide-loaded lipid nanocapsules (NCLs-TA) were obtained by the Phase Inversion Temperature method. A deep study of the formulation composition, drug incorporation and stability was performed. NCLs-TA showed an average particle size of less than 50 nm, a narrow size distribution and a slightly negative zeta potential. In addition, NCLs-TA resulted not cytotoxic in human corneal epithelial cells and it showed a reduced interleukin (IL)-6 production resulting of *in-vitro* therapeutic efficacy model, which suggested the effectiveness of its anti-inflammatory effect.

On the other hand, bevacizumab-loaded lipid nanocapsules (NCLs-BVZ) were obtained from 1.5 mg; 2.5 mg and 3 mg of antibody, using the post-insertion method. The formulations showed an average particle size between 123 and 314 nm, a polydispersity index between 0.23 and 0.39, a zeta potential between -28 and -14 mV and an antibody loading capacity between 1.30 and 2.94 mg. The NCLs-BVZ demonstrated the ability to bind to their antigen (Vascular Endothelial Growth Factor) and a reduced tube formation resulting of *in-vitro* assays, from which their anti-angiogenic effect can be inferred.

Finally, the anti-angiogenic effect of doxycycline hydrochloride was corroborated. A reduced secretion of matrix metalloproteinases both in *in-vitro* studies and in retinal homogenates from *in-vivo* studies was obtained. In addition, this drug showed anti-angiogenic effect using an *in-vitro* assay.

In this work, both the improvement of conventional neovascular eye diseases therapy and the exploration of new alternative therapies were successfully addressed. Both obtained nanocapsules formulations as the new alternative drug assayed can be an interesting strategy to improve the effectiveness and safety of treatment for neovascular eye diseases.

| Abreviatura o Acrónimo | Significado |
|-------------------------------------|--|
| %EE | Eficiencia de Encapsulación Porcentual |
| µg | Microgramo/s |
| AC | Anticuerpo (Acs anticuerpos) |
| bFGF | Factor de crecimiento de fibroblastos básico (del inglés " <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> ") |
| BVZ | Bevacizumab |
| CC | Capacidad de Carga |
| CD | Coefficiente de Difusión |
| cm | Centímetros |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| cols. | Colaboradores |
| DCR | Tasa de recuento derivada (del inglés " <i>Derived Count Rate</i> ") |
| DMAE | Degeneración Macular Asociada a la Edad |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DSPE-PEG ₂₀₀₀ -maleimida | 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000] |
| DX | Doxiciclina (<i>DX-CH</i> , <i>Doxiciclina Clorhidrato</i>) |
| ECM | Matriz extracelular (del inglés " <i>extracellular matrix</i> ") |
| EFC | Espectroscopia de Correlación Fotónica |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>) |
| HCE | Células Epiteliales de Córnea Humana (del inglés " <i>Human Corneal Epithelial</i> " <i>Cells</i>) |
| HLB | Equilibrio Hidrófilo - Lipófilo (del inglés " <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> ") |

| | |
|--------------|--|
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (del inglés <i>"High performance liquid chromatography"</i>) |
| HUVEC | Células endoteliales de vena umbilical humana (del inglés <i>"Human Umbilical Vein Endothelial Cells"</i>) |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a insulina 1 (del inglés <i>"Insulin-like Growth Factor-1"</i>) |
| IL-6 | Interleuquina-6 |
| IP | Índice de Polidispersidad |
| kg | Kilogramo |
| MEB | Microscopia electrónica de barrido |
| mg | Miligramos |
| MGC | Células de Müller (del inglés <i>"Müller Glial Cells"</i>) |
| min | minutos |
| ml | Mililitros |
| MMPs | Metaloproteinasas de Matriz (del inglés <i>"matrix metalloproteinases"</i>) |
| mOsm | Miliosmoles |
| mS | Milisiemens |
| mV | Milivoltio/s |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| NCL | Nanocápsula Lipídica (NCLs, nanocápsulas lipídicas) |
| nm | Nanómetros |
| OIR | Retinopatía inducida por oxígeno (del inglés <i>"Oxygen Induced Retinopathy"</i>) |
| OPS | Potenciales oscilatorios (del inglés <i>"Oscillatory Potentials"</i>) |
| PBS | Solución amortiguadora fosfato salina (del inglés <i>"Phosphate Buffered Saline"</i>) |
| PEDF | Factor derivado de epitelio pigmentario (del inglés <i>"Pigment epithelium-derived factor"</i>) |
| PEG | Polietilenglicol |

| | |
|---------------|---|
| PLFs | Plataforma/s de Liberación de Farmacos |
| PZ | Potencial Zeta |
| RD | Retinopatía Diabética |
| RNZ | Ranibizumab |
| ROP | Retinopatía del Prematuro (del inglés <i>"Retinopathy of Premature"</i>) |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio (del inglés <i>"sodium dodecyl sulfate"</i>) |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (del inglés, <i>"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"</i>) |
| SEC | Cromatografía de Exclusión de Tamaño Molecular (del inglés <i>"Size Exclusion Chromatography"</i>) |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| TA | Acetónido de Triamcinolona (del inglés <i>"Triamcinolone Acetonide"</i>) |
| TMP | Tamaño Medio de Partícula |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés <i>"tumour necrosis factor-α"</i>) |
| v/v | Volumen en volumen |
| VEGF | Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (del inglés <i>"Vascular Endothelial Growth Factor"</i>) |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 1 : INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 23 |
| 1.1-INTRODUCCIÓN | 23 |
| 1.1.1-Nanotecnología y Nanomedicina | 25 |
| 1.1.2-Aspectos generales de la anatomía y fisiología del ojo..... | 30 |
| 1.1.3-Farmacoterapia oftalmológica y Nanomedicina..... | 36 |
| 1.1.4-Patologías oculares abordadas, mecanismo fisiológico y tratamientos | 40 |
| 1.1.5-Motivaciones de la presente Tesis Doctoral | 50 |
| 1.1.6-Hipótesis y esquema del presente manuscrito | 51 |
| 1.2-OBJETIVOS | 53 |
| 1.2.1-Objetivo general | 53 |
| 1.2.2-Objetivos específicos..... | 53 |
| | |
| Capítulo 2 : DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA | 57 |
| 2.1-Marco de referencia | 57 |
| 2.2-Materiales | 61 |
| 2.2.1-Acetónido de triamcinolona y excipientes | 61 |
| 2.2.2-Línea de Células Epiteliales de Córnea Humana..... | 62 |
| 2.3-Metodología..... | 63 |
| 2.3.1-Estudios de solubilidad | 63 |
| 2.3.2-Método de Inversión de Fases..... | 63 |
| 2.3.3-Characterización de las NCLs..... | 67 |
| 2.3.4-Evaluación de la viabilidad celular | 71 |

| | |
|--|----|
| 2.3.5-Eficacia terapéutica <i>in-vitro</i> de las NCLs-TA | 72 |
| 2.4-Resultados y discusión..... | 74 |
| 2.4.1-Estudios de solubilidad..... | 74 |
| 2.4.2-Obtención de NCLs-blanco optimizadas para el cargado de TA | 75 |
| 2.4.3-Microscopía electrónica de barrido..... | 79 |
| 2.4.4-Estudios de obtención y caracterización de NCLs-TA..... | 80 |
| 2.4.5-Evaluación de la viabilidad celular | 86 |
| 2.4.6-Eficacia terapéutica <i>in-vitro</i> de las NCLs-TA | 90 |
| 2.5-Conclusiones parciales | 94 |

Capítulo 3 : DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE BEVACIZUMAB..... 99

| | |
|--|-----|
| 3.1-Marco de referencia | 99 |
| 3.2-Materiales | 103 |
| 3.2.1-Bevacizumab, excipientes y reactivos..... | 103 |
| 3.2.2-Cultivo celular..... | 104 |
| 3.3-Métodos..... | 104 |
| 3.3.1-Síntesis de NCLs-BVZ..... | 104 |
| 3.3.2-Estudios de caracterización de NCLs-BVZ..... | 108 |
| 3.3.3-Estudio del efecto antiangiogénico <i>in-vitro</i> de NCLs | 111 |
| 3.3.4-Estudios de obtención de NCLs cargadas con TA y BVZ | 112 |
| 3.3.5-Estudio de activación del sistema del complemento..... | 113 |
| 3.4-Resultados y discusión..... | 116 |
| 3.4.1-Obtención y purificación de NCLs-BVZ | 116 |
| 3.4.2-Estudios de caracterización de NCLs-BVZ..... | 122 |
| 3.4.3-Efecto antiangiogénico <i>in-vitro</i> de las NCLs-BVZ..... | 133 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.4-Obtención de NCLs cargadas con TA y BVZ (Estudio preliminar) | 140 |
| 3.4.5-Activación del sistema del complemento | 141 |
| 3.5-Conclusiones parciales | 145 |

Capítulo 4 : ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE DOXICICLINA EN LA NEOVASCULARIZACIÓN INTRAOCULAR..... 149

| | |
|--|-----|
| 4.1-Marco de referencia | 149 |
| 4.2-Materiales | 152 |
| 4.2.1-Doxiciclina y reactivos..... | 152 |
| 4.2.2-Líneas celulares..... | 152 |
| 4.2.3- Animales..... | 153 |
| 4.3-Metodología | 153 |
| 4.3.1-Estudios farmacéuticos: determinación de pH y osmolaridad..... | 153 |
| 4.3.2-Estudios <i>in-vitro</i> | 154 |
| 4.3.3-Estudios <i>in-vivo</i> | 155 |
| 4.3.4-Análisis estadístico | 160 |
| 4.4-Resultados y discusión | 160 |
| 4.4.1-Soluciones de DX-CH | 160 |
| 4.4.2-Estudios <i>in-vitro</i> | 161 |
| 4.4.3-Estudios <i>in-vivo</i> | 170 |
| 4.5-Conclusiones parciales | 179 |

Capítulo 5 : CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS 183

| | |
|-------------------------------|-----|
| 5.1-Conclusiones finales..... | 183 |
| 5.2-Proyecciones..... | 187 |

| | |
|--|-----|
| REFERENCIAS | 191 |
| ACTIVIDADES EN INVESTIGACIÓN RELACIONADAS A LA TESIS DOCTORAL... | 215 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Capítulo 1 : INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1-INTRODUCCIÓN

La investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) en el área de los medicamentos constituye uno de los pilares científicos y tecnológicos más relevantes a nivel mundial. Los medicamentos, como tecnología sanitaria, conforman una herramienta indispensable para el mejoramiento de la calidad de vida, que se asocia a beneficios en la reducción de la mortalidad, el aumento de la expectativa de vida, la disminución de la morbilidad, y hasta la prevención de numerosas enfermedades, como es el caso de las vacunas (Dominguez-Gil, Suárez y Martín, 1997).

Durante décadas, la I+D+i en ciencias farmacéuticas se enfocó tanto en la búsqueda de nuevas moléculas con nuevos efectos farmacológicos como en la modificación de estructuras químicas conocidas para obtener acciones terapéuticas más selectivas, duraderas o que presenten menos efectos adversos para el organismo. Sin embargo, los avances en el desarrollo de nuevos fármacos no han sido suficientes para lograr un progreso importante en la efectividad de la farmacoterapia. En este sentido, las formas farmacéuticas convencionales, con frecuencia, no resultan efectivas para tratar un importante número de patologías de manera satisfactoria. La utilización de las mismas busca lograr unidades de dosificación del fármaco adecuadas para la vía de administración y patología, bajo la consigna primaria de alcanzar máxima seguridad y efectividad con alta aceptación por parte del paciente. No obstante, la efectividad del fármaco puede estar condicionada por propiedades fisicoquímicas desfavorables, las cuales pueden dificultar su formulación y ser responsables de una baja absorción, una distribución no específica o rápido metabolismo o eliminación, causando una concentración insuficiente del mismo en el sitio de acción (Liu *et al.*, 2016).

La investigación en tecnología farmacéutica explora el desarrollo de nuevas plataformas de liberación de fármacos (PLFs) en virtud de solucionar los inconvenientes asociados a las formas farmacéuticas convencionales. Una PLFs consiste en un sistema portador constituido por una o más moléculas bioactivas (fármacos) y excipientes, con ventajas relativas comparadas con las formas farmacéuticas tradicionales (Kewal, 2008). A su vez, ciertas PLFs, están diseñadas para la vectorización de fármacos o moléculas bioactivas permitiendo la liberación selectiva a nivel de órganos, tejidos o células sobre los que han de ejercer su acción, mediante la utilización de sistemas portadores de distinta naturaleza.

Las PLFs están compuestos por el fármaco o ingrediente farmacéutico activo, ingredientes no activos y, además, pueden incorporar excipientes funcionales y, utilizar herramientas químicas, farmacotécnicas y tecnológicas con el objetivo de dirigir el fármaco hasta su sitio de acción. La utilización de PLFs pretende evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución posibilitando su acceso a la biofase, controlar su concentración, liberación en el organismo y, de esta manera, mejorar su eficacia y minimizar los efectos secundarios indeseables.

Una PLFs destinada a liberación controlada del ingrediente farmacéutico activo, involucra la liberación del mismo de manera eficiente en el lugar y tiempo adecuados, mientras se mantiene una alta concentración en el sitio de acción (órgano o tejido afectado) y lo más bajo posible en el tejido sano, permitiendo reducir significativamente los tiempos de administración y evitar toxicidad o acción no selectiva (Barros *et al.*, 2016). En general, la liberación controlada es facilitada principalmente por estrategias de estímulo-respuesta externas e internas. Las PLFs pueden ser sensibles a estímulos internos como cambios de pH, temperatura, estado redox y niveles enzimáticos, potencialmente anormales en diferentes patologías. Los principales mecanismos de liberación controlada que se han descubierto hasta ahora incluyen la difusión, la ósmosis, la erosión y la disolución (Wang *et al.*, 2017).

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud destacó la necesidad de priorizar el desarrollo de ciertas biotecnologías en países en vías de desarrollo o emergentes en un artículo publicado en la prestigiosa revista "*Nature Genetics*". En

un ranking de las diez principales, los sistemas portadores de fármacos fueron posicionados en el tercer lugar como herramientas fundamentales para el mejoramiento de la salud de la población (Daar *et al.*, 2002). En este sentido, las nuevas PLFs basadas en nanotecnología constituyen una estrategia innovadora para generar nuevos medicamentos, direccionada a obtener una terapéutica cada vez más eficaz y con menores riesgos asociados. La presente Tesis Doctoral, se centra en el desarrollo de nuevas PLFs basadas en nanotecnología como estrategia de optimización de la farmacoterapia ocular.

A continuación, se describen conceptos básicos relacionados a la Nanotecnología y a la Nanomedicina como herramienta de obtención de nuevas PLFs, los aspectos anatómicos y fisiológicos del ojo, las limitaciones de la farmacoterapia ocular, las patologías seleccionadas y sus tratamientos. Por último, se plantean la hipótesis, objetivos y organización de este Trabajo de Tesis.

1.1.1-Nanotecnología y Nanomedicina

De acuerdo a la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por su nombre en inglés *"The Food and Drug Administration"*) de los Estados Unidos, la Nanotecnología se considera como *"el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante la manipulación de la forma y el tamaño a nanoescala"*. Esta definición surge a partir de aquella propuesta por la *"National Nanotechnology Initiative"* (NNI, según sus siglas en inglés) del mismo país (Initiative and Society, 2008), la cual definió a la nanotecnología como *"la comprensión y el control de la materia en dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nanómetros, donde fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones. Abarcando ciencia, ingeniería y tecnología a nanoescala, la nanotecnología implica procesar imágenes, medir, modelar y manipular la materia a esta escala de longitud"* (Food and Drug Administration (FDA), 2008).

La Nanomedicina es considerada como uno de los campos de la nanotecnología con aplicaciones directas en medicina. Esta disciplina se puede definir como la ciencia y la tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas

a escala nanométrica, formados por al menos el principio activo o molécula biológicamente activa y el propio sistema, que genera una aplicabilidad especial relacionada con el diagnóstico, el monitoreo, el tratamiento, o la prevención de una enfermedad a expensas de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. (Torchilin, 2006; Irache, 2008; Mirza y Siddiqui, 2014; Fornaguera y García-Celma, 2017; Fornaguera y Solans, 2017).

La Nanomedicina puede ser una herramienta adecuada para generar nuevos medicamentos (Irache, 2008). En el diseño de "nanosistemas" o "nanoplateformas" se debe tener en cuenta que, además de ser seguros, deben obtenerse altas capacidades de carga y tiempos de circulación extendidos (Courant *et al.*, 2010). En general, la molécula bioactiva o el fármaco, puede estar adsorbido, encapsulado, atrapado o unido covalentemente a una matriz de nanopartículas (Torchilin, 2006) y, de esta manera, modificar su farmacocinética y farmacodinamia. La utilización de diferentes herramientas tecnológicas puede influir en las propiedades del nanosistema como su diámetro, morfología, carga superficial, capacidad de carga del fármaco, entre otras (Courant *et al.*, 2010; Fornaguera y Solans, 2017).

Los nanosistemas presentan tamaños en el rango de 1-1000 nm y, según sus propiedades y los materiales constitutivos pueden lograr un aumento de la solubilidad del fármaco, la protección de su degradación, la liberación prematura durante la biodistribución y, llegado el caso un direccionamiento al sitio específico y la reducción de efectos secundarios. El tamaño y la gran superficie de intercambio de estos sistemas facilita su paso a través de los vasos capilares más pequeños y evita el rápido aclaramiento por fagocitos (Courant *et al.*, 2010; Fornaguera y Solans, 2017). En diversos casos, se consideran buenos candidatos para la mejora de numerosas patologías debido a que pueden incorporar fármacos hidrófobos e hidrófilos, mejorar su solubilidad, permitir su administración por distintas vías y, presentar estabilidad elevada como liberación controlada y dirigida (Karim *et al.*, 2016; Mokhtarzadeh *et al.*, 2017).

En este sentido, ciertos nanosistemas, además de transportar el fármaco utilizan herramientas de "vectorización" que permiten dirigirlo al sitio de acción controlando su liberación, mejorando su biodisponibilidad (Torchilin, 2006) y,

garantizando una concentración óptima durante un período de tiempo deseado (Fornaguera y García-Celma, 2017). La vectorización puede ser pasiva con enlaces de fármaco-vector débiles o activa, mediante enlaces covalentes de vectores de fármacos capaces de separarse selectivamente en el sitio diana (Zhao y Astruc, 2012). Esta estrategia abarca el comportamiento coordinado entre el vector farmacéutico utilizado, la herramienta de direccionamiento y el fármaco vectorizado (Fornaguera y García-Celma, 2017). La asociación entre el vector y el fármaco, en condiciones adecuadas, debe ser suficientemente lábil al llegar a la ubicación específica para que el transporte del fármaco sea selectivo al órgano, tejido o célula donde se requiere su actividad. Además, se han desarrollado nanosistemas que permiten la administración simultánea de dos o más fármacos, la administración intracelular de fármacos macromoleculares de mayor tamaño (Barros *et al.*, 2016) y la marcación del vector para conocer su biodistribución y acumulación en el tejido deseado (Shen *et al.*, 2017).

Existe una gran variedad de nanosistemas con diferentes propiedades, tales como macromoléculas hidrosolubles, nanopartículas poliméricas, estructuras dendríticas, micelas, nanopartículas sólidas lipídicas, lípidos nanoestructurados, nanocápsulas lipídicas y liposomas, entre otros (Fornaguera y Solans, 2017). Para el presente Trabajo de Tesis Doctoral se exploró el uso de sistemas nanoparticulados basados en lípidos como estrategias de vehiculización de fármacos destinados al tratamiento de patologías oculares. A continuación, se mencionan las principales características de estas PLFs, esquematizadas en la *Figura 1.1*.

Liposomas

Los liposomas están compuestos por fosfolípidos que forman espontáneamente bicapas concéntricas uni o multilamelares, dando origen a estructuras vesiculares donde se dispone de un entorno acuoso separando las capas lipídicas. Los principales constituyentes de los liposomas son fosfolípidos, que tienen una estructura anfifílica, y colesterol (Gregoriadis y Florence, 1993; Wang *et al.*, 2015). En estos nanosistemas, la liberación del fármaco puede modificarse, de acuerdo a la proporción de sus componentes. En relación a su estructura, las regiones polares de los fosfolípidos están en contacto con la fase acuosa dentro y

fuera de los liposomas, y la región no polar está orientada hacia el entorno hidrofóbico. Distintas formulaciones de liposomas han demostrado biocompatibilidad en distintos sistemas celulares, disminución de la toxicidad del fármaco encapsulado y aumento en su tiempo de circulación y, por lo tanto, de su eficacia (Honda *et al.*, 2013; Bozzuto y Molinari, 2015). Desde su descubrimiento, varios de ellos han sido probados en ensayos clínicos, y algunos de ellos fueron aprobados por la FDA (Bulbake *et al.*, 2017) u otras agencias regulatorias como el ANMAT (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y tecnología Médica, Argentina).

Nanopartículas sólidas lipídicas

Las nanopartículas sólidas lipídicas son la primera generación de nanopartículas (50-1000 nm) que contienen lípidos sólidos a temperatura ambiente y corporal, estabilizadas por surfactantes. Estos lípidos son biocompatibles, biodegradables y capaces de incorporar tanto sustancias lipofílicas como hidrofílicas. Estos nanosistemas pueden ser administrados por distintas vías y, son

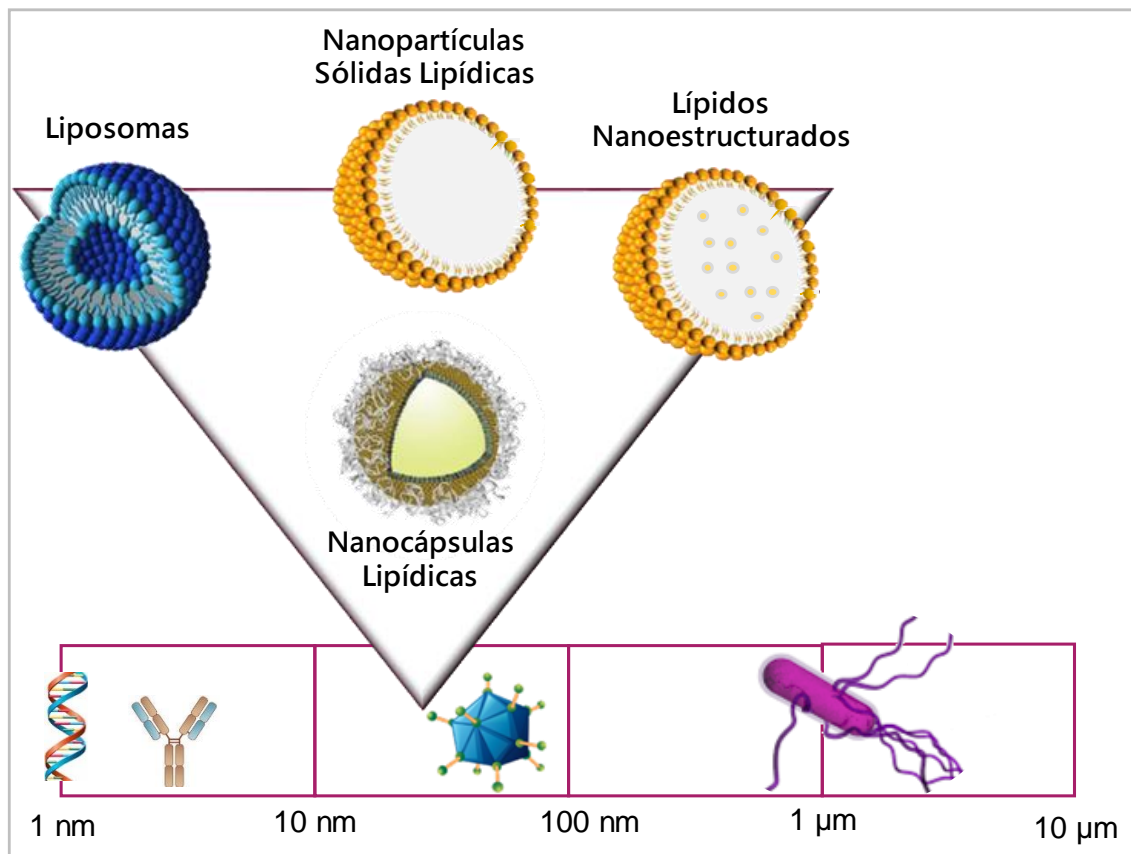


Figura 1.1. Nanopartículas basadas en lípidos

principalmente producidos por homogenización de alta presión, microemulsión, por emulsión-evaporación de solvente o difusión (Béduneau, 2007).

La capacidad de carga del fármaco en las nanopartículas sólidas lipídicas convencionales puede estar limitada debido a la baja solubilidad de fármacos en los lípidos fundidos o a la expulsión del fármaco luego de la transición polimórfica (Mader, 2006; Béduneau, 2007; Fang *et al.*, 2008; Zaro, 2015).

Lípidos nanoestructurados

Los lípidos nanoestructurados son partículas coloidales que típicamente varían en tamaño de 100 a 500 nm, y que están compuestos por mezclas de lípidos sólidos y lípidos líquidos a temperatura ambiente. Fueron obtenidos con el objetivo de superar los problemas asociados a las nanopartículas sólidas lipídicas, por lo cual, son considerados la segunda generación de este tipo de sistemas (Mader, 2006; Béduneau, 2007; Fang *et al.*, 2008; Zaro, 2015).

Nanocápsulas lipídicas

Las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs) pueden definirse como sistemas portadores biomiméticos caracterizados por poseer una estructura híbrida entre las nanocápsulas poliméricas y los liposomas. Su estructura general incluye un núcleo lipídico de triglicéridos de cadena media, rodeado por una membrana combinada de lecitinas que se orientan hacia la fase oleosa, y un surfactante hidrofílico con segmentos de polietilenglicol orientados hacia la fase acuosa. Las NCLs pueden ser obtenidas por el Método de Inversión de Fases y presentan un tamaño promedio en el rango de 20-100 nm dependiendo de la proporción de excipientes. Generalmente, están compuestas por lípidos biodegradables y biocompatibles, y permiten la incorporación tanto de fármacos hidrofílicos como lipofílicos (Heurtault *et al.*, 2002; Heurtault *et al.*, 2003). Las NCLs, al igual que las nanopartículas poliméricas, permiten modular la liberación del fármaco desde la matriz lipídica.

Debido a las bondades expuestas de las NCLs, en este Trabajo de Tesis doctoral, se seleccionaron estos sistemas para el desarrollo de PLFs para el tratamiento de patologías oculares neovasculares.

1.1.2-Aspectos generales de la anatomía y fisiología del ojo

El ojo es el órgano encargado de recibir los estímulos luminosos externos, codificarlos y enviarlos a través del nervio óptico a los centros de la visión en la parte occipital del cerebro, para que se produzca el complejo fenómeno de la visión. Para poder cumplir ésta función, diferentes estructuras mantienen al ojo protegido del medio externo (Barret *et al.*, 2010).

El globo ocular (*Figura 1.2*) está formado por tres capas concéntricas: i-la túnica externa de esclerótica y córnea, ii-la túnica media o vascular dividida en coroides, cuerpo ciliar y estroma de iris y, iii-la túnica interna, una capa retinal que incluye la retina neural y el epitelio pigmentario de la retina. En su interior limitan diferentes compartimentos: cámara anterior, posterior y vítreo (Liu *et al.*, 2017).

A su vez, el ojo está dividido en dos segmentos según la proximidad al ambiente externo: el segmento anterior y el segmento posterior.

Segmento anterior

El segmento anterior del ojo comprende la córnea, la conjuntiva, el iris, el cuerpo ciliar, las cámaras anterior y posterior y los lentes. Además, incluye el aparato lagrimal y los párpados (Stjernschantz J, 1993).

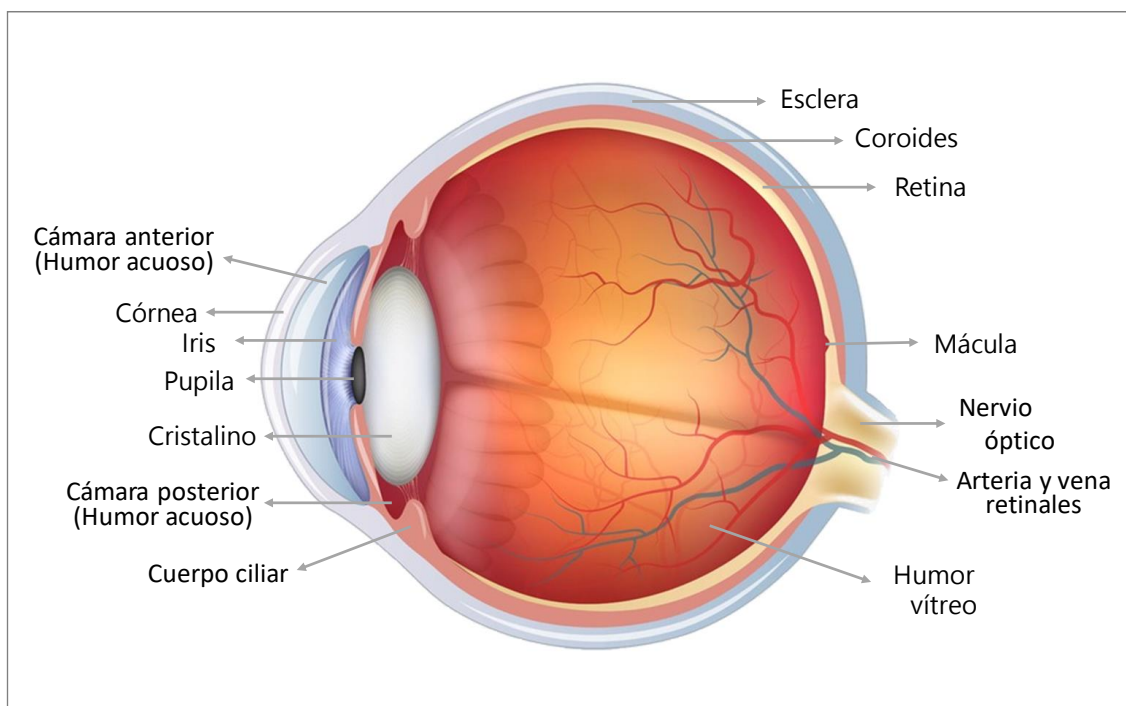


Figura 1.2. Esquema de la estructura del globo ocular.

La córnea es una membrana transparente que ocupa la porción frontal del globo ocular y que continúa como esclera en la parte posterior (Brunton y Lazo, 2013). Tiene una función óptica importante ya que refracta la luz que ingresa al ojo a través de la pupila y un poder refractario de 43 dioptrías representando el 70% del poder refractivo del ojo. La córnea es una estructura no vascular y presenta un espesor promedio de 0,57 mm en su parte central, mientras que en la periferia es más delgada (Dhanapal y Ratna, 2012). La córnea humana está compuesta de cinco capas que resisten la difusión pasiva de iones y moléculas, y mantienen la presión intraocular con las uniones estrechas alrededor de las células epiteliales dificultando su paso al estroma corneal (Stjernschantz J, 1993).

Por su parte, la conjuntiva es una barrera epitelial mucosa transparente delgada que recubre el interior de los párpados y cubre el tercio anterior del globo ocular. La superficie expuesta del ojo incluye la conjuntiva y la córnea, y está cubierta con la película lagrimal. La conjuntiva contribuye a la formación de esta película por medio de la secreción de electrolitos, fluidos y mucinas sustanciales (Dhanapal y Ratna, 2012). Cuando la mucina se despliega, hace que la superficie hidrófoba del epitelio sea más hidrófila y, por lo tanto, aumenta la humectabilidad. La película lagrimal tiene un papel multifuncional que comprende la hidratación, nutrición, limpieza y lubricación y, además, posee una función antibacteriana. La lágrima se extiende sobre la superficie del ojo durante el parpadeo.

La úvea anterior comprende el iris y el cuerpo ciliar que tiene dos funciones muy especializadas: la secreción de humor acuoso por la doble capa epitelial y la acomodación por el músculo ciliar. La cámara posterior se encuentra entre los lentes, procesos ciliares, y el iris, mientras que la cámara anterior se encuentra entre el iris, el ángulo cameral y la córnea. En este sistema, ambas cámaras se comunican a través de la pupila y se presenta bañado de humor acuoso, el cual posee una composición iónica similar al plasma con pequeñas cantidades de proteínas. Por su parte, el lente cristalino está situado detrás del iris en frente del vítreo. Este lente tiene un poder refractivo de aproximadamente 20 dioptrías, habilita la acomodación, y protege a la retina de la radiación ultravioleta (Stjernschantz J, 1993; Barret *et al.*, 2010; Dhanapal y Ratna, 2012; Brunton y Lazo, 2013).

Segmento posterior

El segmento posterior del ojo comprende la esclera, el vítreo, la coroides, la retina y el nervio óptico.

La esclera es una membrana fibrosa y firme que mantiene la forma globular del ojo (Dhanapal y Ratna, 2012). Posee un espesor de 0,5 a 1 mm y su superficie está revestida por una cubierta vascular epiescleral, por la cápsula de Tenon y por las conjuntivas. Es una estructura relativamente resistente que contiene principalmente paquetes de colágeno y algunas fibras elásticas, con fibroblastos y melanocitos dispersos (Stjernschantz J, 1993). Dentro de la envoltura escleral, la coroides nutre la parte externa de la retina (Brunton y Lazo, 2013).

La coroides es una membrana delgada altamente vascularizada compuesta por tres partes principales: la coroides vascular, la coriocapilar y la membrana de Bruch. La coroides vascular se compone de venas y arterias de gran tamaño mientras que, la coriocapilar presenta una red muy fina y densa de capilares de tipo fenestrado que permite la permeación a proteínas del plasma y coloides. La membrana de Bruch es una estructura delgada de pocos micrones que está en contacto directo con el epitelio pigmentario retinal y actúa como una barrera de intercambio semipermeable entre éste y la vasculatura coroidea que provee sangre a las capas externas de la retina. Está compuesta de la lámina basal del epitelio pigmentario y células endoteliales de la coriocapilar y, además, colágeno y fibras elásticas (Stjernschantz J, 1993).

La retina y el nervio óptico son embriológicamente una extensión del diencéfalo. El nervio óptico es responsable de transmitir las señales nerviosas del ojo al cerebro. El mismo penetra el polo posterior del ojo a través de la lámina cribosa y se encuentra rodeado por el líquido cerebroespinal y la duramadre cerebral. La retina (*Figura 1.3*) es una estructura delgada, transparente y muy organizada; que consta de neuronas, células gliales y vasos sanguíneos. Está compuesta de dos capas mayormente funcionales: la capa neural y el epitelio pigmentario en su parte más externa. La capa neural está compuesta por fotorreceptores conos y bastones, así como cuatro tipos de neuronas: bipolares, ganglionares, horizontales y amácrinas, quienes convierten la luz detectada en

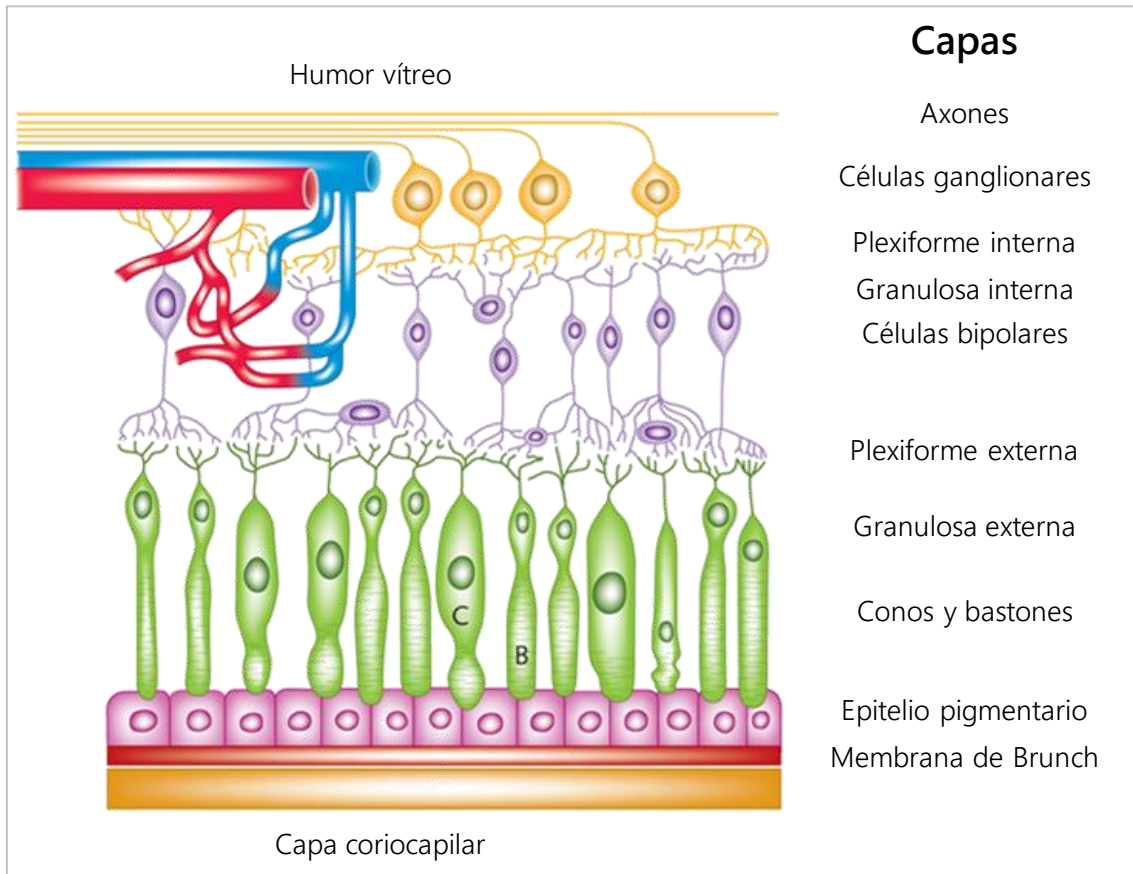


Figura 1.3. Esquema de la estructura de la retina.

(Imagen adaptada de Grau Wiechers y cols.)

impulsos nerviosos que luego se envían al cerebro a lo largo del nervio óptico (Stjernschantz J, 1993; Dhanapal y Ratna, 2012; Brunton y Lazo, 2013).

En el centro de la retina ligeramente lateral a la cabeza del nervio óptico se encuentra la mácula, una región que posee alta concentración de células fotorreceptoras. La fóvea es el centro de la mácula, responsable de la visión más nítida, contiene sólo conos y no presenta irrigación sanguínea. Los fotorreceptores, ubicados a un lado de la coroides, establecen sinapsis con las células bipolares y estas últimas con las células ganglionares. A su vez, los axones de las células ganglionares convergen y abandonan el ojo como nervio óptico. Las células horizontales conectan a las células receptoras con otras células del mismo tipo situadas en la capa plexiforme externa, mientras que, las células amácrinas conectan las células ganglionares entre sí en la capa plexiforme interna a través de prolongaciones de diversas longitudes y patrones. Adicionalmente a los elementos neuronales de la retina, existen células gliales llamadas células de Müller. Las

prolongaciones de estas células forman una membrana en la superficie interna de la retina y una membrana externa en la capa de fotorreceptores. Además, las neuronas de la retina también se unen por medio de conexiones comunicantes (Barret *et al.*, 2010).

El epitelio pigmentario retinal forma una barrera entre la coroides y la retina, en la cual las células epiteliales pigmentadas son conectadas con uniones estrechas. Este transfiere selectivamente nutrientes desde la coroides hacia la retina, posee varias funciones adicionales que incluyen la fagocitosis de los fotorreceptores, metabolismo de la vitamina A (retinol), procesos de transporte y la secreción de citocinas.

La cavidad ubicada entre la retina y el cristalino se encuentra llena de humor vítreo, un hidrogel que ocupa aproximadamente el 80% de cada ojo en el cuerpo humano. El humor vítreo contiene colágeno de tipo II, ácido hialurónico, proteoglicanos, y una diversidad de macromoléculas que comprenden glucosa, ácido ascórbico y aminoácidos, y varias sales inorgánicas. Presenta un pH de aproximadamente 7,5 y una elevada proporción de agua (98 a 99,7%) con un recambio cada 10-15 minutos (Stjernschantz J, 1993; Barret *et al.*, 2010; Dhanapal y Ratna, 2012; Brunton y Lazo, 2013; Kang-Mieler *et al.*, 2017).

Sistema vascular ocular

El ojo presenta un sistema vascular bien organizado. La principal entrada arterial es proporcionada por la arteria oftálmica que presenta varias ramificaciones que penetran la parte posterior de la retina en el globo ocular (*Figura 1.4*). Entre ellas, se encuentran la arteria central de la retina, las arterias ciliares posteriores cortas, las arterias posteriores ciliares largas y las arterias ciliares anteriores (Liu *et al.*, 2017).

En el segmento posterior del ojo, la arteria central de la retina y la coriocapilar derivada de las arterias ciliares posteriores cortas proveen sangre a la retina. La arteria retiniana central viaja a lo largo del margen inferior de la vaina del nervio óptico y penetra en el ojo a través del disco óptico y, a continuación, se ramifica en

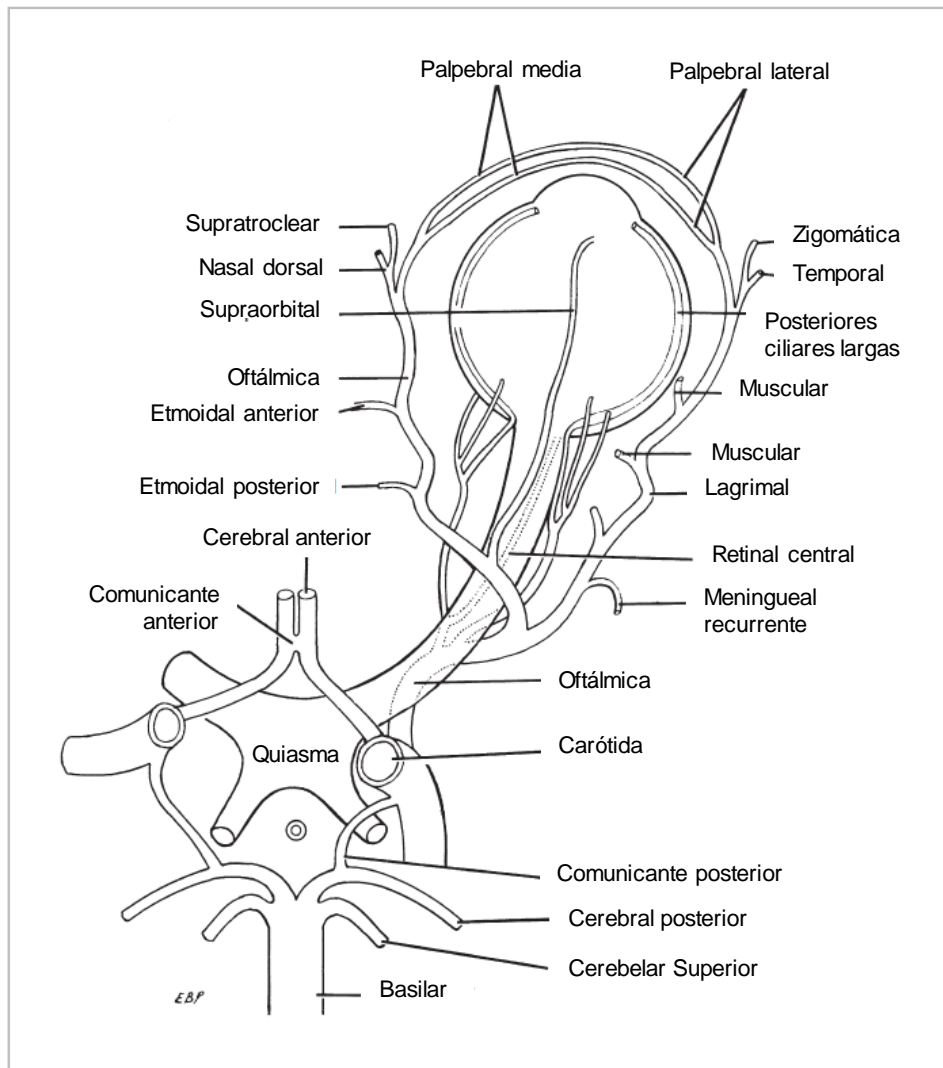


Figura 1.4. Irrigación arterial en el globo ocular.
(Imagen adaptada de Harris y cols.)

una vasculatura retiniana no fenestrada (Kiel, 2010). Los vasos retinianos proporcionan sangre oxigenada a las neuronas retinales internas hasta los dos tercios internos de la capa nuclear interna. Por el contrario, la capa de fotorreceptores es avascular y recibe oxígeno desde la capa coriocapilar por difusión.

En el ojo sano, el flujo sanguíneo de la retina permanece constante a pesar de las fluctuaciones de la presión sistémica o intraocular. Comparado con la circulación coroidea (un sistema de alto flujo y tasa variable), la circulación retiniana presenta un flujo más bajo y sistema de tasa constante, manteniendo el tejido metabólicamente activo (Harris *et al.*, 2006).

En el segmento anterior, la córnea y el cristalino son avasculares para permitir el paso de la luz. En ausencia de vasos sanguíneos, la córnea recibe el oxígeno que se ha disuelto en las lágrimas por difusión y, nutrientes, desde el humor acuoso, y neurotrofinas. De igual modo, el cristalino recibe nutrientes desde el humor acuoso a través de la difusión, mientras que, el iris y el cuerpo ciliar son irrigados por las arterias ciliares. Por un lado, las arterias ciliares posteriores largas penetran la parte posterior de la esclera irrigando al cuerpo ciliar y a la coroides mediante un círculo arterial alrededor de la circunferencia del iris. Por otro lado, las arterias ciliares anteriores viajan con los músculos extraoculares, uniéndose al círculo arterial del iris penetrando la esclerótica cerca del limbo (Liu *et al.*, 2017).

1.1.3-Farmacoterapia oftalmológica y Nanomedicina

El objetivo de la terapéutica ocular es lograr una respuesta farmacológica deseada manteniendo una concentración efectiva de fármaco en el sitio de acción durante un período de tiempo apropiado, sin alterar las funciones del ojo (Du Toit *et al.*, 2013). La administración de fármacos por vía ocular es uno de los mayores desafíos para la tecnología farmacéutica. La anatomía, fisiología y bioquímica del ojo proporcionan una estructura única que restringe el acceso de moléculas bioactivas al sitio de acción establecido (Araujo *et al.*, 2009). Las necesidades clínicas insatisfechas y los avances tecnológicos proporcionan una fuerza impulsora clave para la investigación y desarrollo de nuevos sistemas que mejoren la farmacoterapia convencional (Gan *et al.*, 2013). En este sentido, la meta principal de la tecnología farmacéutica apunta a la obtención de PLFs que superen las barreras protectoras oculares sin causar daños tisulares graves ni permanentes y que permitan mantener niveles terapéuticos adecuados con una frecuencia de aplicación razonable.

La biodisponibilidad de un compuesto instilado en el ojo es generalmente baja debido a barreras anatómicas y limitaciones fisiológicas y, por otro lado, los fármacos administrados sistémicamente tienen un acceso deficiente al humor acuoso y vítreo. Las rutas comunes de administración para que un fármaco alcance el segmento anterior, son la instilación tópica o la inyección subconjuntival;

mientras que, para la administración de fármacos al segmento posterior, las rutas más comunes incluyen la dosificación sistémica, inyecciones perioculares o intravítreas y, en menor medida, la instilación tópica diseñada para permeación transescleral.

La administración ocular tópica es la estrategia de mayor aceptación para la mayoría de los fármacos por su condición no invasiva, sin embargo, la presencia de barreras anatómicas, fisiológicas y bioquímicas dificultan el acceso de los mismos al sitio específico de acción. Esta vía tiene dos propósitos diferentes: el tratamiento superficial de enfermedades oculares, como las infecciones (conjuntivitis, blefaritis, queratitis) y, el tratamiento intraocular a través de la córnea u otros tejidos para enfermedades con foco intraocular, como el glaucoma o uveítis.

Dentro de las formulaciones oftálmicas, más del 90% son comercializadas en forma de soluciones, suspensiones o ungüentos. Esto se debe a su coste favorable, mayor simplicidad de desarrollo y producción de la formulación y la buena aceptabilidad por parte de los pacientes. Sin embargo, estos sistemas convencionales no pueden considerarse óptimos en el tratamiento de enfermedades intraoculares, ya que, comúnmente, los fármacos vehiculizados bajo esta forma presentan baja biodisponibilidad en el sitio blanco (Araujo *et al.*, 2009). Por un lado, las capas de la córnea resisten la difusión pasiva de iones y moléculas, y mantienen la presión intraocular, con las uniones estrechas alrededor de las células epiteliales que complican su cruce hacia el estroma, y por el otro, la cornea forma una barrera altamente eficiente principalmente para fármacos relativamente hidrofílicos o de gran tamaño molecular (Barret *et al.*, 2010).

La conjuntiva funciona como una barrera física pasiva, y su vasculatura puede absorber una parte sustancial del fármaco que ha pasado por el epitelio. La capa de moco secretada por las células caliciformes de la conjuntiva se comporta como una cobertura de la superficie corneal y conjuntival, y además, forma parte de la película lagrimal, la cual proporciona un obstáculo adicional a la penetración del fármaco (Stjernschantz J, 1993; Bourlais *et al.*, 1998; Schill *et al.*, 1998). Por su parte, la película lagrimal se extiende sobre la superficie del ojo durante el parpadeo, y al ser un fluido dinámico experimenta una renovación constante limitando el tiempo de residencia

de los fármacos en la superficie del ojo (De la Fuente *et al.*, 2010). En consecuencia, la producción de lágrimas, la absorción no productiva y la baja permeabilidad del epitelio corneal (Araujo *et al.*, 2009; Bao-ChengTian *et al.*, 2013) actúan como una barrera para la permeación y se relacionan con un tiempo de residencia transitorio en el epitelio y rápida eliminación de los sistemas de administración de fármacos. Como resultado, menos del 5% del fármaco administrado atraviesa la córnea y alcanza los tejidos intraoculares, mientras que la mayor parte de la dosis desemboca en el conducto nasolagrimal conduciendo a potenciales efectos sistémicos secundarios no deseados (Araujo *et al.*, 2009; Souto *et al.*, 2010; Bao-ChengTian *et al.*, 2013). Sumado a esto, las enzimas metabólicas presentes en el tejido ocular, como esterasas, aldehído y ceto-reductasas (Duvvuri, Majumdar y Mitra, 2004) pueden degradar y reducir la eficacia de los fármacos (De la Fuente *et al.*, 2010; Formica *et al.*, 2015).

En consecuencia, para superar las barreras fisiológicas, se han desarrollado diversas estrategias tendientes a optimizar y aumentar la eficacia de los tratamientos oculares (Liu *et al.*, 2008). Uno de los objetivos principales de la farmacoterapia oftalmológica consiste en lograr un mayor tiempo de residencia ocular del fármaco instilado en el ojo. En este sentido, los sistemas de administración ocular que actúan como reservorio son necesarios para prolongar también el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de administración y mejorar su liberación, optimizando así el esquema terapéutico de administración.

Una PLFs "ideal" debe ser biodegradable, biocompatible y liberar cantidades constantes de activos durante un período específico de tiempo. Del mismo modo, estos sistemas deben permanecer estables sobre la superficie ocular, no producir efectos secundarios, ni visión borrosa, y también, tener una larga vida útil y ser fáciles de producir y administrar (Achouri *et al.*, 2013; Gan *et al.*, 2013). Sin embargo, la obtención de formas de dosificación tópica efectivas capaces de promover la penetración del fármaco y mantener los niveles terapéuticos con una frecuencia razonable de aplicación (Araujo *et al.*, 2009), es un desafío difícil de lograr.

Por otro lado, más allá de las aplicaciones relativamente simples como la vehiculización de fármacos solubles que, por su naturaleza, no permean la córnea u

otras estructuras, la atención se ha centrado en desafíos más importantes y de mayor impacto, como lo es la administración de fármacos para patologías del segmento posterior del ojo. En particular, las patologías que afectan la zona ocular mencionada, se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión en un gran número de pacientes. Dada la gravedad de estas enfermedades, resulta primordial tanto la instauración rápida del tratamiento como el mantenimiento de concentraciones eficaces de fármaco en el lugar de acción, durante el mayor tiempo posible (Herrero Vanrell, 2007). Existe una creciente necesidad de lograr soluciones terapéuticas innovadoras, que se acentúa por el aumento del número de nuevas entidades terapéuticas y la necesidad de terapia crónica.

Como se mencionó anteriormente, las inyecciones intravítreas son ampliamente utilizadas para alcanzar concentraciones terapéuticas a nivel de retina. Sin embargo, la administración frecuente de formulaciones por ésta vía puede causar serios efectos adversos como hemorragia intravítrea, endoftalmitis, desprendimiento de retina y cataratas (Varshochian *et al.*, 2015). La eliminación de los fármacos luego de una inyección intravítrea, se lleva a cabo a través de dos rutas: la vía anterior y la vía posterior. En la primera se elimina a través del humor acuoso y el flujo uveal. En la segunda, la eliminación se realiza a través de la barrera ocular posterior, mediante permeabilidad pasiva como es el caso de moléculas lipofílicas o por transporte activo a través de las citadas barreras. Debe destacarse que las moléculas grandes, pesadas y solubles en agua tienden a tener una semivida mayor en el interior del vítreo (Fernández *et al.*, 2008). Diferentes sistemas tales como implantes biodegradables y no biodegradables, liposomas y nanopartículas, han sido desarrollados con cierto éxito para superar los efectos adversos asociados a la administración intravítrea (Duvvuri *et al.* 2003; Guinedi *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2005; Hsu, 2007). De la misma manera, para superar las desventajas de la farmacoterapia convencional, se han investigado varios sistemas de administración de fármacos oftálmicos que puedan controlar su liberación y mantener niveles terapéuticos durante un período prolongado de tiempo.

Un buen diseño de una PLFs oftálmica requiere un amplio conocimiento de las moléculas terapéuticas y las características particulares de las barreras oculares (De la Fuente *et al.*, 2010; Achouri *et al.*, 2013). En este sentido, la **nanotecnología**

es una de las estrategias disponibles para obtener un sistema portador de fármacos que permita el acceso a diferentes compartimentos oculares y llegar al sitio deseado.

Las PLFs basadas en nanotecnología, con tamaño de partícula adecuado y distribución homogénea, permiten el transporte y el paso efectivo a través de las barreras biológicas (Souto *et al.*, 2010), así como también minimizan la exposición sistémica y los efectos adversos. Estas características convierten a los sistemas nanoparticulados en potenciales herramientas para la optimización del tratamiento de patologías oculares, y esto puede verse reflejado en un impacto cada vez más importante en el diseño de nuevas alternativas farmacoterapéuticas (Paolicelli *et al.*, 2009; Gaudana *et al.*, 2010; Jayaraman *et al.*, 2012) basadas en diferentes estrategias que proporcionan opciones válidas para mejorar el acceso de fármacos oftálmicos a su sitio de acción (Du Toit *et al.*, 2013). Además, estos “nanosistemas” o “nanoplateformas” presentan un menor efecto inflamatorio que las formulaciones regulares y no producen efectos secundarios relacionados al tamaño de partículas debido a su naturaleza nanométrica (aproximadamente 100 nm) (Sahoo *et al.* 2008; Jayaraman *et al.*, 2012).

1.1.4-Patologías oculares abordadas, mecanismo fisiológico y tratamientos

Angiogénesis

El desarrollo del sistema vascular ocurre principalmente a través de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. Por un lado, la vasculogénesis es el proceso de formación de los vasos sanguíneos a partir de células endoteliales progenitoras (angioblastos), las cuales migran y se fusionan con otras células endoteliales progenitoras, diferenciándose en células endoteliales maduras, mientras forman nuevos vasos (Qazi *et al.*, 2009). Éste proceso es generalmente observado en la etapa de la embriogénesis. Por otro lado, la angiogénesis o neovascularización es el proceso en el cual células endoteliales de vasos existentes dan origen a nuevos vasos bajo la activación y regulación de numerosos estimuladores e inhibidores angiogénicos. Este proceso desempeña un papel

importante tanto en el desarrollo fisiológico como en la aparición de eventos patológicos (Liu *et al.*, 2017).

La angiogénesis está controlada por un equilibrio dinámico entre factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos. Varias circunstancias, como la isquemia, la hipoxia o la inflamación, pueden romper este equilibrio a favor de la neovascularización (Cabral *et al.*, 2017). De este modo, el suministro de oxígeno y nutrientes interrumpido provoca la desregulación de factores de crecimiento involucrados en el mecanismo de angiogénesis. En el mismo sentido, la desregulación de la angiogénesis, interrumpe recíprocamente el suministro de oxígeno y nutrientes, lo que produce un desequilibrio entre la demanda y el suministro metabólico. Ambos eventos promueven el desarrollo de la neovascularización patológica.

La cascada angiogénica se desarrolla en pasos secuenciales. Primero, se produce la liberación de factores de crecimiento angiogénicos por parte del tejido enfermo, los cuales se unen a las células endoteliales vasculares adyacentes ya existentes. A continuación, las células endoteliales vasculares se activan para producir moléculas, incluyendo enzimas que producen la disolución de la membrana basal circundante (proteinasas). Luego, se produce la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares, ayudadas por las moléculas de adhesión. Posteriormente, se produce una desintegración adicional de tejido y remodelación con metaloproteinasas de matriz (MMPs, por su nombre en inglés "Matrix Metalloproteinases"), la formación de tubos vasculares por las células endoteliales y, a partir de los mismos, la formación de ovillos. Finalmente, los nuevos vasos sanguíneos son estabilizados por células musculares lisas y pericitos (Blumenkranz y Moshfeghi, 2006).

En términos generales a nivel ocular, se pueden encontrar factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por su nombre en inglés "*Vascular Endothelial Growth Factor*"), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por su nombre en inglés "*basic Fibroblast Growth Factor*"), el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1, por su nombre en inglés "*Insulin-like Growth Factor-1*"), angiopoyetina-1 y -2, y factor de necrosis tumoral

(TNF, por su nombre en inglés "*Tumour Necrosis Factor*"), entre otros. Por otro lado, entre los factores antiangiogénicos, se pueden citar angiostatina, endostatina, el factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF, por su nombre en inglés "*Pigment epithelium-derived factor*"), inhibidores tisulares de MMPs, trombospondina y somatostatina (Qazi *et al.*, 2009).

Neovascularizaciones oculares

Las neovascularizaciones oculares patológicas pueden conducir a una alteración visual irreversible, ya sea por opacificación de la córnea o por cambios perniciosos permanentes en la arquitectura neuronal de la retina (Qazi *et al.*, 2009). Diferentes enfermedades oculares presentan neovascularización como la ***Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) húmeda***, la ***Retinopatía del Prematuro (ROP***, por su nombre en inglés "*Retinopathy of Prematurity*"), la ***Retinopatía Diabética (RD)*** y la ***Neovascularización Corneal*** secundaria a sustancias químicas, lesiones o procesos infecciosos o inflamatorios. Los neovasos formados se caracterizan por tener un crecimiento anormal y no proporcionar flujo sanguíneo adecuado, pudiendo ocasionar una discapacidad visual significativa. Debido a esto, la neovascularización ocular debe controlarse, principalmente, aquellas en las cuales está afectada la retina y la coroides (Cabral *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). En el caso de la DMAE, la ROP y la RD, la neovascularización es un sello característico de estas enfermedades, pudiendo causar hemorragias y desprendimientos de retina.

La DMAE es considerada como la principal causa de ceguera en países desarrollados y la tercera en el mundo. El daño se produce a nivel de la mácula, causando una pérdida profunda de la agudeza visual central. Clínicamente, la DMAE comienza con la aparición asintomática de drusas, un depósito focal de restos acelulares y polimorfos, entre el epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch. Estos depósitos separan cada vez más al epitelio pigmentario retinal del lecho vascular coroideo subyacente, interrumpiendo la función del primero y llevando a la degeneración de los fotorreceptores, una característica distintiva de la DMAE "seca". El exceso de drusas causa daño al epitelio pigmentario retinal y puede provocar una respuesta inflamatoria crónica conduciendo a grandes áreas de

atrofia retiniana, expresión de citocinas angiogénicas como el VEGF y, hasta alteración de la membrana de Bruch (Bressler *et al.*, 2006). En la DMAE "húmeda", los vasos sanguíneos crecen de un modo anormal desde la vasculatura coroidea a través de la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario retinal hacia el espacio subretinal, debajo de los fotorreceptores, causando una pérdida visual profunda. El desarrollo de neovascularización coroidea puede provocar una mayor permeabilidad y fragilidad vascular, extenderse hacia adelante a través de alteraciones en la membrana de Bruch y conducir a hemorragia subretiniana, exudación de líquidos, depósito de lípidos, desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina, cicatrices fibróticas o combinación de los mismos. Actualmente, la terapéutica se centra en detener su progresión ya que no existen tratamientos curativos. En el caso de la DMAE húmeda, diversos factores implicados en su patogénesis, estimulan el crecimiento de neovasos coroides, conduciendo al deterioro de la visión (Yanai *et al.*, 2012; Farnoodian *et al.*, 2017).

En cuanto a la ROP y la RD, la angiogénesis patológica se produce a nivel de los vasos retinianos. La ROP es una enfermedad proliferativa de la vasculatura retinal que puede ocasionar una pérdida visual severa en recién nacidos prematuros (Hunter y Mukai, 1992; Rivera *et al.*, 2017) y se considera la principal causa de ceguera infantil en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo (Gilbert, 2008). El avance de la Neonatología permitió aumentar la sobrevivencia de los recién nacidos a pre-término con edades gestacionales extremadamente bajas y peso de nacimiento menor a 1500 g, lo cual trajo aparejado un incremento de la morbilidad neonatal y sus secuelas. Una de estas secuelas es la ROP, debido que los bebés prematuros tienen una red vascular retiniana subdesarrollada. En la primera etapa de la ROP, la exposición a niveles de oxígeno que son más altos que en el útero da como resultado un ambiente retinal hiperóxico, causando la supresión del crecimiento de los capilares retinianos en desarrollo. En la segunda etapa, la neovascularización retiniana es estimulada por hipoxia, con inducción de factores de crecimiento pro-angiogénicos que están regulados por la misma y, alteraciones en vías que implican proteinasas, lípidos y factores angiogénicos (Smith, 2004; Yanai *et al.*, 2012). La incapacidad de superar esta respuesta impulsada por la hipoxia puede conducir a complicaciones tales como la muerte celular neuronal, sangrado,

desprendimiento de retina y pérdida de la agudeza visual o ceguera. En muchos casos, a pesar de la formación de neovasos, el daño inicial a la vasculatura retiniana se revierte y el desarrollo fisiológico normal de los vasos continúa dando como resultado la revascularización de esta área avascular permeable (Yanai *et al.*, 2012; Farnoodian *et al.*, 2017).

La RD, es una enfermedad progresiva y asintomática hasta los estadios avanzados, como resultado de un daño vascular que se caracteriza por aumento de permeabilidad y daño capilar. Es considerada la principal causa de ceguera en adultos en edad productiva (principalmente entre 40 a 60 años de edad) y, la complicación más frecuente de las personas con diabetes (Ciulla *et al.*, 2003; Semeraro *et al.*, 2015). La manifestación patológica asociada con RD aumenta con la duración de la diabetes. La historia natural de la enfermedad se ha dividido en una etapa temprana, no proliferativa, y una etapa proliferativa posterior. En la etapa temprana de la RD, se producen pérdidas de pericitos, adhesión de leucocitos y engrosamiento de la membrana basal conduciendo a una decadencia inicial y progresiva de la vasculatura retiniana y a la disfunción de las células endoteliales (Harris *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2017). A continuación, en la etapa avanzada, se produce una pérdida de capilares que se vuelven acelulares y no perfundidos, junto a la apoptosis neural y vascular. Esto conduce a la isquemia seguida de la activación de factores de crecimiento angiogénicos y alteraciones en múltiples vías que involucran proteinasas, lípidos y factores angiogénicos que desencadenan la neovascularización retiniana (Yanai *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2017).

Independientemente de su origen, las patologías mencionadas (DMAE, ROP, y RD) tienen como característica la muerte de neuronas, provocando discapacidad visual y hasta ceguera. En las mismas, se considera al VEGF como el regulador más crítico de la neovascularización (Aiello *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2017), el cual cumple un rol central en el progreso y pronóstico de estas enfermedades que no cuentan actualmente con un tratamiento efectivo.

El VEGF es una glicoproteína de 40 kDa relacionada con la inducción de la migración y la proliferación de células endoteliales después de la hipoxia (Cabral *et al.*, 2017). La subfamilia del VEGF incluye cinco miembros VEGF-A, -B, -C y -D, y

factor de crecimiento placentario (PIGF), los cuales son el principal objetivo investigado en la angiogénesis ocular (Qazi *et al.*, 2009). Las células endoteliales presentan receptores para VEGF (VEGFR), de los cuales VEGFR2 es el receptor tirosina quinasa que regula la mayor parte de la actividad angiogénica de VEGF (Missiaen *et al.*, 2017). Tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis el VEGF-A cumple un rol crítico. Además, la expresión de las MMPs y su ARN asociado, particularmente MMP-2 y MMP-9, está asociada con la neovascularización coroidea y retinal (Cabral *et al.*, 2017). Ambas MMPs, unidas a los receptores de integrinas en las células endoteliales, son activadas por VEGF y otras citocinas reguladoras. Estas enzimas actúan para digerir la matriz extracelular y, así, facilitar la proliferación de las células endoteliales que forman nuevos capilares. Las MMPs parecen estar reguladas negativamente por inhibidores tisulares naturales de las MMPs (Blumenkranz y Moshfeghi, 2006). Además, como se mencionó anteriormente otras citocinas participan del proceso de neovascularización como el FGF, el PEDF, integrinas y las angiopoyetinas.

Por último, la Neovascularización Corneal es causada por una interrupción del equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos, que preserva la transparencia corneal y, se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en la córnea provenientes desde el limbo. Los vasos anormales bloquean la luz y, pueden conducir a exudación de lípidos, inflamación y cicatrices en la córnea complicando la transparencia corneal y la agudeza visual. A su vez, en etapas posteriores, esta patología puede comprometer permanentemente la visión cuando los vasos sanguíneos alcanzan el eje visual (Qazi *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2012).

En la Neovascularización Corneal, el desequilibrio entre estímulos pro-angiogénicos y antiangiogénicos conduce a un exceso de factores pro-angiogénicos como el VEGF, el bFGF y las MMPs; y una deficiencia en factores antiangiogénicos (Chang *et al.*, 2012). La matriz extracelular y la degradación de la membrana basal por MMPs y otras enzimas proteolíticas, permiten a las células endoteliales vasculares entrar en los espacios subepiteliales y estromales dentro de la córnea. La Neovascularización Corneal puede ser secundaria a quemaduras químicas, isquemia, infección, uso prolongado de lentes de contacto, una respuesta

vascular al trasplante de córnea, traumatismos e inflamación, y es una causa importante de ceguera (Chang *et al.*, 2012). En el caso de la Neovascularización Corneal inflamatoria, puede ser provocada por una lesión traumática, una infección bacteriana o viral, quemaduras químicas, afecciones autoinmunes, trastornos degenerativos, entre otros. En condiciones inflamatorias, las células epiteliales corneales y endoteliales, los macrófagos y las células inflamatorias producen factores angiogénicos tales como el VEGF y los factores de crecimiento de fibroblastos. El VEGF promueve la producción de MMPs por las células endoteliales en el plexo vascular límbico y estimula la formación de vasos sanguíneos. Además, la inflamación puede inducir la migración de células de Langerhans a la córnea, lo que lleva a la producción adicional de citocinas angiogénicas y, al reclutamiento de células inmunitarias. La cascada angiogénica, amplificada por la inflamación, inclina el equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos a favor de la angiogénesis. En el caso de la Neovascularización Corneal hipóxica, su principal causa es el uso de lentes de contacto. En estas condiciones, el VEGF está regulado positivamente por las células epiteliales corneales para mejorar el suministro de oxígeno a la córnea (Chang *et al.*, 2012; Stevenson *et al.*, 2012; Chiang y Hemmati, 2013).

En todas las patológicas oculares mencionadas, el VEGF desempeña un papel principal en el desarrollo de la angiogénesis y en consecuencia, es la principal diana terapéutica (Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, teniendo en cuenta que la neovascularización es un proceso dinámico en el cual participan diversos mecanismos reguladores, sus tratamientos deben tender a controlar también las otras vías pro-angiogénicas y anti-angiogénicas participantes (Cabral *et al.*, 2017).

Tratamientos de las neovascularizaciones oculares

Las estrategias terapéuticas actuales en las neovascularizaciones oculares descritas anteriormente, se centran principalmente en la eliminación de neovasos patológicos, que son los principales responsables de la pérdida de la visión (Liu *et al.*, 2017). Las terapias involucran tratamientos con láser, fotodinámicos y farmacológicos. En este sentido, la fotocoagulación con láser produce la cauterización de los vasos anormales, desarrollados en el proceso patológico que

afectan a la capacidad visual (Hanout *et al.*, 2013). Por otro lado, la terapia fotodinámica consiste en la irradiación de luz de una sustancia fotosensibilizante (generalmente Verteporfin®) concentrada dentro de un tejido para causar estrés oxidativo e inducir la liberación local de radicales libres de oxígeno. En consecuencia, se produce un daño en las células endoteliales y, la formación de trombos y oclusiones vasculares que conducen a la remodelación tisular (Benayoun *et al.*, 2015). Por último, la terapia farmacológica, implica la administración de fármacos antiangiogénicos o angiostáticos que inhiben el crecimiento de nuevos vasos.

En los últimos años, se desarrollaron fármacos antiangiogénicos que apuntan al bloqueo del VEGF como la principal diana terapéutica debido a su rol central en la patogénesis de estas enfermedades. Los anti-VEGF disponibles incluyen pegaptanib sódico (Macugen®), ranibizumab (Lucentis®); bevacizumab (Avastin®), aflibercept (Eylea®) y conbercept. En el caso de las neovascularizaciones coroideas o retinales, estos fármacos se administran por vía intravítrea mediante inyecciones que deben realizarse de forma periódica, debido a que su vida media es corta. Además de la incomodidad para el paciente, las inyecciones intravítreas se encuentran asociadas a efectos adversos tales como endoftalmítis, uveítis, inflamación ocular, desprendimiento de retina, desgarro de retina, entre otras (Real *et al.*, 2011).

El pegaptanib, es un aptámero anti-VEGF que se une competitivamente a la isoforma VEGFA165 y se considera una terapia antigua para el tratamiento de la angiogénesis ocular. Actualmente, se utilizan bevacizumab (BVZ), ranibizumab (RNZ), aflibercept, ziv-aflibercept y conbercept como principales terapias (Cabral *et al.*, 2017). El BVZ es un anticuerpo (Ac) monoclonal recombinante humanizado completo de isotipo IgG1 (149 kDa), diseñado para perfusión intravenosa. Deriva del mismo precursor que RNZ y, al igual que éste, se une e inhibe la actividad biológica de todas las isoformas del VEGF-A humano, el cual se une a sus receptores en la superficie de células endoteliales vasculares. Por su parte, el aflibercept y el ziv-aflibercept son proteínas de fusión recombinantes que forman una trampa para el VEGF (se une a ambos lados del dímero VEGF-A y -B), y también se unen al PlGF. Por último, conbercept es una secuencia de ADN humano completo que se une al

VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C, y a PlGF. Este último, contiene el cuarto dominio de unión de VEGFR-2, mejorando la tasa de asociación de VEGF al receptor (Cabral *et al.*, 2017).

En la ROP, la ablación retiniana periférica mediante terapia láser convencional ha sido durante muchos años el estándar del tratamiento. A pesar de que ayuda sustancialmente a prevenir la ceguera, tiene efectos moderados en los ojos con ROP posterior y, en consecuencia, se han explorado terapias preventivas y menos destructivas como los anti-VEGF. En la Neovascularización corneal, los principales tratamientos utilizados son la administración de corticoides, inmunomoduladores y fármacos anti-VEGF como el BVZ. También, se ha explorado la administración de angiostatinas y tetraciclina.

En la DMAE y RD, las terapias anti-VEGF se han convertido en terapias cada vez más establecidas reemplazando la fotocoagulación láser y la terapia fotodinámica (Hanout *et al.*, 2013). El uso intraocular de agentes terapéuticos anti-VEGF ha demostrado mejoras en el tratamiento de las neovascularizaciones retinianas y coroideas. Sin embargo, algunos pacientes no responden al tratamiento con estos fármacos, por lo cual se tiende al desarrollo de terapias combinadas donde además de inhibir el VEGF se aborde la regulación de otros mediadores moleculares involucrados en la angiogénesis. Entre las potenciales dianas terapéuticas diferentes a VEGF, se pueden citar miembros de la familia factor de crecimiento derivado de plaquetas, la familia del FGF, angiopoyetinas, galectinas, integrinas, endotelinas, factores inducibles por hipoxia, IGF-1, citocinas, MMPs e inhibidores de MMPs (Cabral *et al.*, 2017).

Por otra parte, en la medida en que la inflamación tenga un efecto causal sobre el desarrollo de las neovascularizaciones oculares, la terapia dirigida a reducir la inflamación puede resultar como una estrategia farmacológica exitosa. La terapia antiinflamatoria puede ser enfocada a través de inmunomodulación o estabilización de organelas intracelulares tales como lisosomas y la proteólisis resultante (Blumenkranz y Moshfeghi, 2006). En este sentido, los corticoides son ampliamente utilizados para las neovascularizaciones oculares por su efecto antiinflamatorio. A su vez, presentan una capacidad antiangiogénica significativa. El

principal mecanismo de acción de los esteroides angiostáticos parece estar asociado a su participación en la desintegración y bloqueo de la formación de membranas basales del endotelio capilar. De los glucocorticosteroides sintéticos, se conoce que la triamcinolona y la betametasona presentan las propiedades antiangiogénicas más potentes. Se ha observado en estudios de cultivo celular que el acetónido de triamcinolona (TA, por su nombre en inglés "*Triamcinolone Acetonide*") tiende a modular la permeabilidad y la adhesión de las células endoteliales coroides humanas (Park y Jaffe, 2006).

En línea con lo anterior, las inyecciones intravítreas de TA se consideran como tratamiento de primera línea para el tratamiento de enfermedades neovasculares, edematosas o inflamatorias como edema macular diabético difuso, RD proliferativa, glaucoma neovascular, DMAE húmeda y uveítis. Además, se utiliza en la inyección intraoperatoria de retina para evitar el desprendimiento de retina traccional y mejorar la visualización de las membranas epidérmicas (Blumenkranz y Hartzler, 2006). No obstante, las inyecciones intravítreas con corticoides se asocian a efectos adversos tales como la formación de cataratas y aumento de la presión intraocular.

Uno de los principales inconvenientes de todos los tratamientos de las neovascularizaciones oculares mencionadas, es el escaso tiempo de permanencia de los fármacos en el ojo y, en consecuencia, su alta frecuencia de administración. En este Trabajo de Tesis, se propuso desarrollar una estrategia basada en nanotecnología para optimizar las terapias del TA y del BVZ. Estos fármacos se seleccionaron en base a su eficacia y bajo costo en comparación a los otros fármacos disponibles. Además, se propone explorar el efecto de doxiciclina (DX) como terapia alternativa al tratamiento de las neovascularizaciones oculares, basada en reportes sobre su capacidad de inhibir a las MPPs involucradas en el proceso de angiogénesis. En los siguientes Capítulos se profundizará sobre el tratamiento de los mismos y sus limitaciones.

1.1.5-Motivaciones de la presente Tesis Doctoral

La presente Tesis Doctoral, se enmarca en un proyecto de Investigación y Desarrollo (I+D) de mayor alcance, el cual comprende dos áreas de estudio paralelas y complementarias, como se puede observar en el esquema de la *Figura 1.5*. El área I implica el diseño, desarrollo y evaluación *in-vitro* y *ex-vivo* de PLFs y de nuevos materiales utilizados en tecnología farmacéutica. En el área II, se contempla la evaluación biomédica y biofarmacéutica de los sistemas desarrollados, a través de la determinación de fármacos en fluidos biológicos, la evaluación de su biocompatibilidad y eficacia en modelos animales, entre otros. Luego del procesamiento y análisis de los resultados obtenidos en ambas áreas, se evalúa la modificación en la composición en la PLFs competente al área I o, el avance hacia la publicación de los resultados, la protección de los mismos mediante patentes o la realización de ensayos clínicos. Siguiendo este esquema de trabajo se diseñó el Proyecto de Tesis Doctoral, basado en la premisa de avanzar en la farmacoterapia ocular obteniendo sistemas innovadores de mayor eficacia sin comprometer su seguridad.

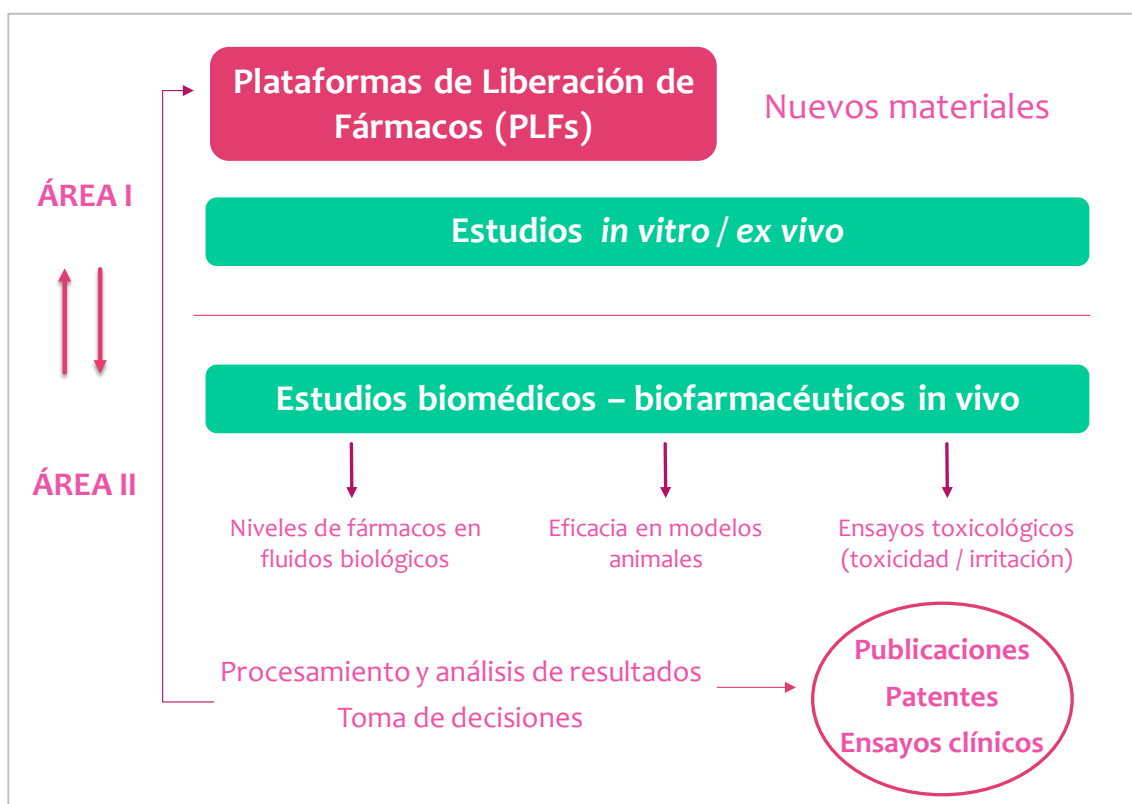


Figura 1.5. Esquema general de proyecto de Investigación y Desarrollo.

1.1.6-Hipótesis y esquema del presente manuscrito

Un tratamiento eficiente de la neovascularización debe abordar una terapia combinada que implique, además de la inhibición del VEGF, herramientas farmacológicas que participen en el bloqueo de la acción de otros mediadores pro-angiogénicos involucrados. Sumado a esto, es imperativo mejorar la terapia relacionada a la administración intravítrea de los fármacos utilizados actualmente con el objetivo de aumentar la adherencia de los pacientes a los tratamientos.

En ese marco, se planteó por un lado, la aplicación de herramientas nanotecnológicas para la vehiculización de fármacos convencionalmente utilizados para el tratamiento de neovascularizaciones oculares y, por otro lado, avanzar sobre el estudio de la aplicación de fármacos que inhiben mediadores pro-angiogénicos para el desarrollo de terapias alternativas. En la *Figura 1.6*, se puede observar el esquema de Tesis propuesto.

En base a lo antes expuesto, se propuso la vehiculización de un corticosteroide como coadyuvante del tratamiento de la neovascularización ocular mediante el diseño, desarrollo y evaluación de NCLs cargadas de acetónido de

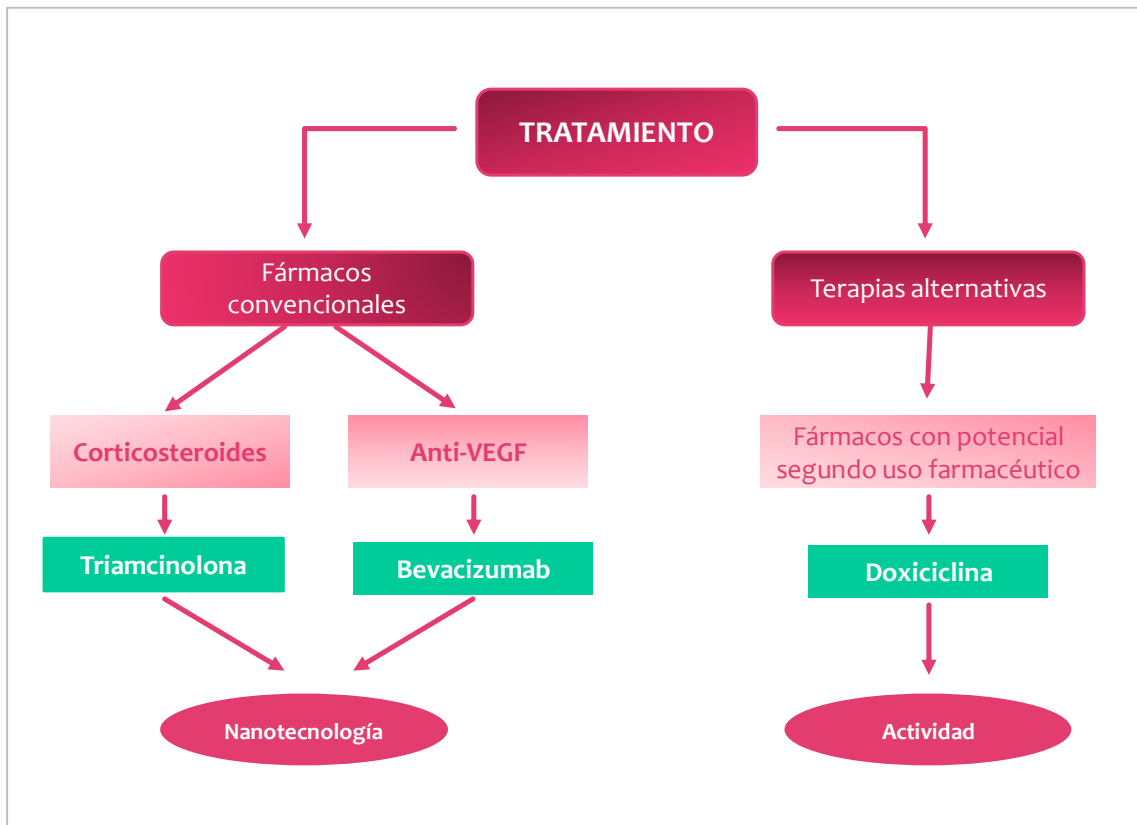


Figura 1.6. Esquema Inicial de Tesis Doctoral.

triamcinolona (NCLs-TA). Por otro lado, para mejorar los problemas asociados a las terapias anti-VEGF, se planteó la obtención NCLs funcionalizadas cargadas con BVZ (NCLs-BVZ). La selección de estos fármacos se fundamenta en la eficacia clínica demostrada de su terapia, ya que ambos son considerados fármacos de primera línea para el tratamiento de las patologías DMAE, RD, ROP y Neovascularización Corneal. Mediante la utilización de NCLs se espera disminuir la dosis de los fármacos administrados y prolongar su tiempo de residencia en el sitio de acción, con el objetivo de mejorar la farmacoterapia en términos globales.

Por último, en procura de lograr un tratamiento combinado para las neovascularizaciones oculares, se abordó el estudio de la aplicación de fármacos con potencial segundo uso farmacéutico para el bloqueo de factores pro-angiogénicos por una vía alternativa a la inhibición directa del VEGF mediante estudios preliminares de evaluación de la toxicidad y del efecto terapéutico de doxiciclina (DX).

En forma general entonces, nuestra hipótesis de trabajo se basa en la premisa que la nanotecnología puede constituirse en una herramienta poderosa para mejorar la terapia ocular mejorando aspectos relacionados a seguridad, eficacia y aceptación.

A continuación, en este capítulo, se presentan los OBJETIVOS del presente Trabajo de Tesis Doctoral y luego, los RESULTADOS obtenidos de acuerdo a cada objetivo específico, de la siguiente manera:

- Capítulo 2: DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA.
- Capítulo 3: DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS DE BEVACIZUMAB.
- Capítulo 4: ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE DOXICICLINA EN LA NEOVASCULARIZACIÓN INTRAOCULAR.

Dada la heterogeneidad del tema abordado, cada capítulo de resultados fue organizado con su correspondientes y específicos: marco de referencia, materiales, metodologías, resultados y discusión y, conclusiones parciales. Por último, se presenta un Capítulo de CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS DE TRABAJO.

1.2-OBJETIVOS

1.2.1-Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consistió en desarrollar nuevas plataformas de liberación de fármacos destinadas a mejorar el tratamiento de neovascularizaciones oculares.

1.2.2-Objetivos específicos

Los objetivos específicos consistieron en:

- Obtener, caracterizar y evaluar nanocápsulas lipídicas cargadas con acetónido de triamcinolona (NCLs-TA) para el tratamiento de la inflamación ocular asociada a las neovascularizaciones oculares.
- Obtener, caracterizar y evaluar nanocápsulas lipídicas cargadas con bevacizumab (NCLs-BVZ) como estrategia de tratamiento de neovascularizaciones oculares.
- Evaluar el efecto antiangiogénico ocular de doxiciclina clorhidrato (DX-CH) como prueba de concepto direccionada a la búsqueda de terapias alternativas para las neovascularizaciones oculares, a partir de la evaluación de la toxicidad ocular y el efecto inhibitor de MMPs.

CAPÍTULO 2

DISEÑO, DESARROLLO,
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN
DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE
ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA



Capítulo 2 : DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA

2.1-MARCO DE REFERENCIA

El acetónido de triamcinolona (TA) (9 α -fluoro-16 α -hidroxiprednisolona) es un glucocorticoide sintético que posee efecto antiinflamatorio e inmunomodulador (Wang *et al.*, 2002; Hirani *et al.*, 2016). Comúnmente, el TA se utiliza como tratamiento adyuvante de varias patologías oftálmicas que presentan trastornos intraoculares edematosos y neovasculares con el propósito de suprimir la angiogénesis ocular, entre las cuales se encuentran la neovascularización coroidea preexistente, la corneal y la asociada a retinopatías isquémicas proliferativas. Este fármaco puede utilizarse como alternativa terapéutica única de estas patologías o, en combinación con la terapia fotodinámica o con otros fármacos antiangiogénicos (Araújo *et al.*, 2010; Kang y Chung, 2010). El TA es considerado un agente seguro y efectivo para el tratamiento con corticoides en forma crónica a nivel intraocular (inyecciones o implantes) en patologías tales como Uveítis, Edema Macular, Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) y Vitreoretinopatía.

En la eficacia de TA participan múltiples mecanismos, entre los cuales se incluyen la inhibición de la fosfolipasa A2 por lipocortinas y el aumento de la integridad de las uniones estrechas (Araújo *et al.*, 2010). Para ejercer su acción, el TA se une a receptores de esteroides en las células y, posteriormente, induce o inhibe ciertos genes, conduciendo a la inhibición de los procesos inflamatorios, como el edema y la permeabilidad vascular. Además, el TA y glucocorticoides similares inhiben la secreción del Factor de Crecimiento Estimulante de Endotelio Vascular (VEGF), y la producción de citocinas. En este sentido, el TA inhibe la angiogénesis en

forma directa al afectar a las células endoteliales vasculares e indirectamente, al afectar a otras células que liberan diversas citocinas que estimulan la angiogénesis. A su vez, dentro de las citocinas secretadas en este proceso y en la vasopermeabilidad ocular, se encuentra la interleucina (IL-6) que estimula a otras células inflamatorias para secretar el VEGF (Kang y Chung, 2010). En consecuencia, la administración de TA contribuye a la disminución de los niveles de VEGF característicos de la neovascularización debido a que afecta la secreción de las citocinas y, además, a inhibir otros factores pro-angiogénicos como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF) (Hirani *et al.*, 2016).

El TA se administra mediante implantes o inyecciones intravítreas para las enfermedades del segmento posterior. La administración intravítrea de TA fue aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos) para el tratamiento del Edema Macular Diabético, el Edema Macular Asociado con la Oclusión de la Vena Central Retiniana, la Retinopatía Diabética (RD) proliferativa, la Uveítis, la Oftalmía Simpática y, para el uso fuera de indicación ("*off label*") para algunas formas de DMAE (Kambhampati *et al.*, 2015). Además, en el caso de la Neovascularización Corneal, se ha reportado que las inyecciones subconjuntivales de TA reducen la aparición de neovasos. No obstante, aunque el fármaco es efectivo, la forma de administración del medicamento no es ideal. Tanto las dosis elevadas de TA y esteroides similares como las inyecciones reiteradas, pueden provocar efectos secundarios que conducen al aumento de la presión intraocular, formación de cataratas, endoftalmitis infecciosa y no infecciosa post-cirugía y pseudo-endoftalmitis (Araújo *et al.*, 2010; Hirani *et al.*, 2016; Trinh *et al.*, 2017). A su vez, luego de la administración intravítrea de una suspensión de TA, las partículas de fármaco pueden distribuirse homogéneamente en el humor vítreo e interferir con la visión. Uno de los factores claves en el uso de este fármaco es el tamaño de partículas que presenta la suspensión utilizada debido, principalmente, a la escasa solubilidad acuosa del compuesto. Además, las diferencias encontradas en el tamaño de las partículas explican la variabilidad en los tiempos de residencia y de acción del corticoide, luego de inyecciones intravítreas (Francis, Chang y Haik, 1996).

En este sentido, la obtención de formas farmacéuticas de TA se encuentra limitada ya que, como los demás esteroides, presenta baja solubilidad en medio acuoso y en solventes orgánicos fisiológicamente aceptables, propiedades físico-químicas subóptimas y mala permeabilidad a través de la membrana ocular. Los corticoides son una clase de hormonas esteroideas que presentan una disposición estructural característica de cuatro anillos de cicloalcano: tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano (Ni *et al.*, 2013). En la *Figura 2.1*, se puede observar la estructura química de la molécula de TA.

El TA es escasamente ionizable debido a que presenta un pKa elevado ($pK_a=13$)¹ y sólo es soluble en metanol, etanol y cloroformo. Actualmente, este principio activo se encuentra disponible como una suspensión y, para el tratamiento de las patologías mencionadas, se administra frecuentemente una dosis de 4 mg, con una duración de acción de aproximadamente 3 meses (Goñi *et al.*, 2016; Trinh *et al.*, 2017).

Dado que existe una necesidad de mejorar la terapia intraocular de TA tendiente a reducir sus efectos secundarios, en el marco del presente proyecto se planteó como estrategia el desarrollo de nanocapsulas lipídicas (NCLs) como plataformas de liberación de TA. Las NCLs están compuestas por un núcleo de triglicéridos parciales rodeado por una membrana de surfactantes (*Figura 2.2*). La utilización de NCLs se fundamenta en la versatilidad de las mismas debido a que están diseñadas a partir de materiales lipídicos generalemente reconocidos como

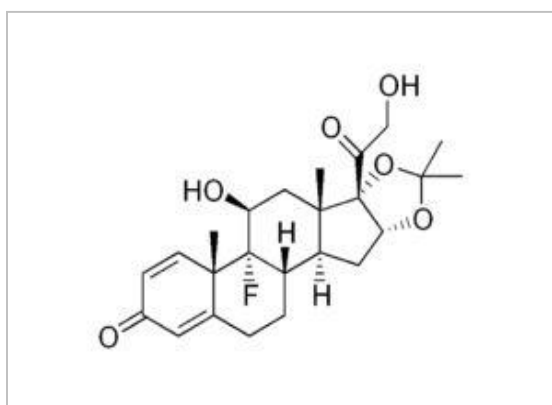


Figura 2.1. Estructura química del Acetónido de Triamcinolona (TA)

¹ Calculado mediante el programa de cálculos teóricos ADC Labs® en el marco de esta tesis.

seguros (GRAS) y que, en virtud de esto, permiten vehiculizar fármacos hidrofóbicos como la TA. No obstante, los surfactantes presentes en estos nanosistemas y otras estrategias tecnológicas permiten, además, la incorporación de moléculas hidrofílicas. Como plataformas de liberación de fármacos (PLFs), las NCLs han demostrado que pueden ser efectivas para el tratamiento de diversas patologías y pueden ser aplicadas por distintas vías de administración (Heurtault *et al.*, 2002; Heurtault *et al.*, 2003).

A partir de la problemática expuesta, se plantea como hipótesis que las NCLs pueden constituir una estrategia prometedora para la vehiculización de TA y la optimización de los tratamientos derivados con este fármaco, teniendo en cuenta la versatilidad de este tipo de sistemas y las potenciales ventajas asociadas a su uso. En consecuencia, el objetivo del presente capítulo consistió en obtener, caracterizar y evaluar NCLs cargadas con TA (**NCLs-TA o nanocápsulas lipídicas de acetónido de triamcinolona**).

Los experimentos de diseño y obtención de las NCLs se realizaron en estrecha colaboración con la Dra. Gabriela Ullio-Gamboa y el Dr. Jean-Pierre Benoit. El desarrollo experimental se llevó a cabo principalmente en el Laboratorio de nuestro grupo de investigación y, en parte, en el INSERM U1066 (Angers, Francia), en el marco de dos estadías de doctorado financiadas con el Programa Bec.AR de "Estadías Cortas de Doctorado en Ciencia y Tecnología para Profesionales Argentinos en la República Francesa" otorgada por Jefatura de Gabinete de Ministros y Campus France; y el Programa de becas "Saint Exupery" concedida por el Ministerio de Asuntos Exteriores y Desarrollo Internacional de la República Francesa.

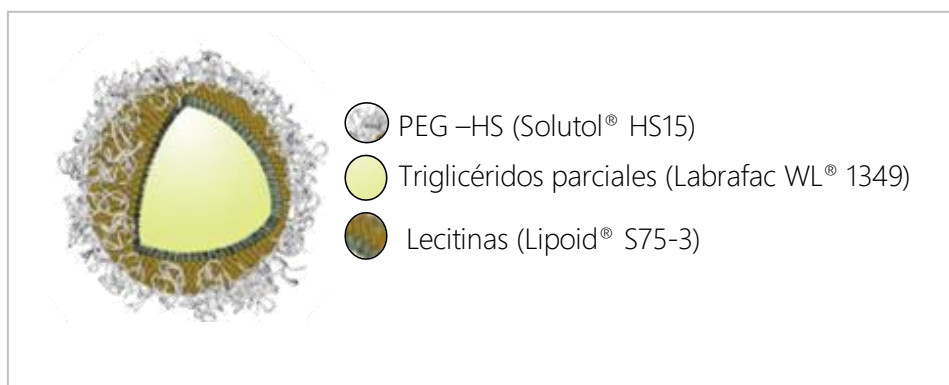


Figura 2.2. Esquema de la estructura de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs)

2.2-MATERIALES

2.2.1-Acetónido de triamcinolona y excipientes

El TA fue provisto por Desynth S.A. (Buenos Aires, Argentina). Las NCLs están compuestas por al menos tres componentes principales: una fase oleosa, una fase acuosa y un tensioactivo no iónico.

La fase oleosa está constituida esencialmente por un núcleo lipídico líquido a temperatura ambiente, formado por triglicéridos parciales (no todos los grupos hidroxilo están esterificados) de ácidos cáprico y caprílico conocidos con el nombre comercial de Labrafac[®] WL 1349. El mismo fue obsequio de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, Francia).

El núcleo lipídico está rodeado por una capa rígida de una mezcla de surfactantes: Lipoid[®] S75-3 y Solutol[®] HS-15. El tensioactivo hidrófilo, Solutol[®] HS-15, es un derivado de polietilenglicol (PEG), mezcla de hidroxiestearato de PEG 660 y PEG 660 libres, y en las NCLs se orienta hacia el medio acuoso (Heurtault *et al.*, 2002).

El Lipoid[®] S75-3, surfactante lipídico utilizado, está compuesto por lecitina de soja con 70% de fosfatidilcolina y 10% de fosfatidiletanolamina, que se asocia a la fase oleosa. Este surfactante se utiliza en pequeñas proporciones para aumentar significativamente la estabilidad de las NCLs, especialmente necesario en el caso de formulaciones de NCLs de 50-100 nm, y en las cuales se orienta hacia el núcleo lipídico de las mismas (Minkov *et al.*, 2005; Vonarbourg *et al.*, 2005; Huynh *et al.*, 2009). El Lipoid[®] S75-3 y el Solutol[®] HS 15 fueron provistos por Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) y BASF (Ludwigshafen, Alemania), respectivamente.

Captex[®] 8000 (tricaprilato de glicerilo), Captex[®] 500p (gliceril triacetato) y Captex[®] 200p (propilenglicol dicaprilocaprato) fueron obsequiados por Abitec Corp (Columbus, OH, USA). El ácido oleico, el aceite de castor y Miristato de Isopropilo (MIP, mezcla de ésteres de alcohol isopropílico con ácidos grasos saturados, principalmente el ácido mirístico) fueron adquiridos en Sigma Aldrich[®]. El Plurol[®] Stearique (poligliceril-6 distearato) fue obsequiado por Gattefossé S.A. (Saint-

Priest, Francia). Myritol[®] fue provisto por BASF (Ludwigshafen, Alemania). Miglyol[®] fue provisto por Acofarma (Coimbra, Portugal). Todos los componentes están aprobados por la FDA para administración oral, tópica y parenteral. En este Capítulo, los productos mencionados serán referidos por su marca comercial debido a su compleja composición.

La fase acuosa consiste en agua ultra pura y cloruro de sodio, provistos por Milli RO System (Millipore[®], Paris, Francia) y Prolabo (Fontenay-sous-Bois, Francia), respectivamente.

Para evaluar citotoxicidad, se utilizó el 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) el cual se adquirió en Sigma-Aldrich[®] mientras que el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, de acuerdo a su nombre en inglés "*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*") en Gen-Probe Incorporated (San Diego, CA, US). Los reactivos de cultivo celular fueron provistos por Lonza (Verviers, Bélgica) y Sigma-Aldrich[®] (Saint-Quentin Fallavier, Francia).

2.2.2-Línea de Células Epiteliales de Córnea Humana

En los estudios *in-vitro* de viabilidad celular y evaluación de eficacia terapéutica, se utilizó la línea de Células Epiteliales de Córnea Humana (HCE, de acuerdo a su nombre en inglés "*Human Corneal Epithelial Cells*") derivada de células epiteliales de córnea humana (inmortalizadas con el virus SV40) (Araki-Sasaki *et al.*, 1995). Las células fueron cultivadas en DMEM (Del inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*") con el agregado de una mezcla de nutrientes F-12 (DMEM / F-12): suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 5 mg/ml de insulina a 37 °C en una atmósfera humificada conteniendo 5% dióxido de carbono (CO₂). Diariamente, se renovó el medio de cultivo y, los cultivos se observaron por microscopía de contraste de fase.

2.3-METODOLOGÍA

2.3.1-Estudios de solubilidad

El primer paso en el diseño de NCLs para la vehiculización de TA, consistió en evaluar la solubilidad del fármaco a una concentración fija, en distintos excipientes lipídicos utilizados como lípidos formadores de matriz y en los respectivos co-surfactantes. Brevemente, se agregó el TA en una concentración 0,2% (p/p) a los diferentes excipientes (*Tabla 1*). Luego, las preparaciones obtenidas fueron calentadas con agitación, durante 1 hora a 90 °C y dispersadas con vortex cada 20 minutos. Por último, las mismas se filtraron con un filtro Minisart® de 0,22 µm y el filtrado se cuantificó por una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) desarrollada en el marco de esta tesis, para la separación del fármaco de los surfactantes. Se utilizó un HPLC (Waters 1525 pump) con un inyector automático (Waters 717 plus autosampler) y detector UV, y una columna C18 de fase reversa Phenomenex® Luna 5 µm, 250 x 4,60 mm, 100 Å. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato (70/30) (pH=3) a un flujo de 1 ml/min. La detección del fármaco se realizó a longitud de onda 240 nm.

2.3.2-Método de Inversión de Fases

Las NCLs se obtuvieron por el método de inversión de fases (Beatrice Heurtault *et al.*, 2002) (PIT, por su nombre en inglés "*Phase Inversion Temperature*"). Brevemente, todos los componentes de la formulación fueron mezclados bajo agitación y expuestos a tres ciclos de calentamiento a 90 °C, seguido de enfriamiento a 60° C para asegurar el paso a través de la temperatura de inversión de fases. Por último, el sistema mantenido a temperatura de inversión de fases fue sometido a un choque irreversible final inducido por el agregado con agua fría, dando origen a nanopartículas estables. La formulación obtenida fue sometida a agitación suave durante 5 minutos. En la *Figura 2.3*, se esquematiza la obtención de NCLs mediante el PIT. Como punto de partida, la composición de la formulación se seleccionó a partir de un estudio de diagrama ternario de fases, realizado por grupo del Dr. Benoit anteriormente (Heurtault *et al.*, 2003).

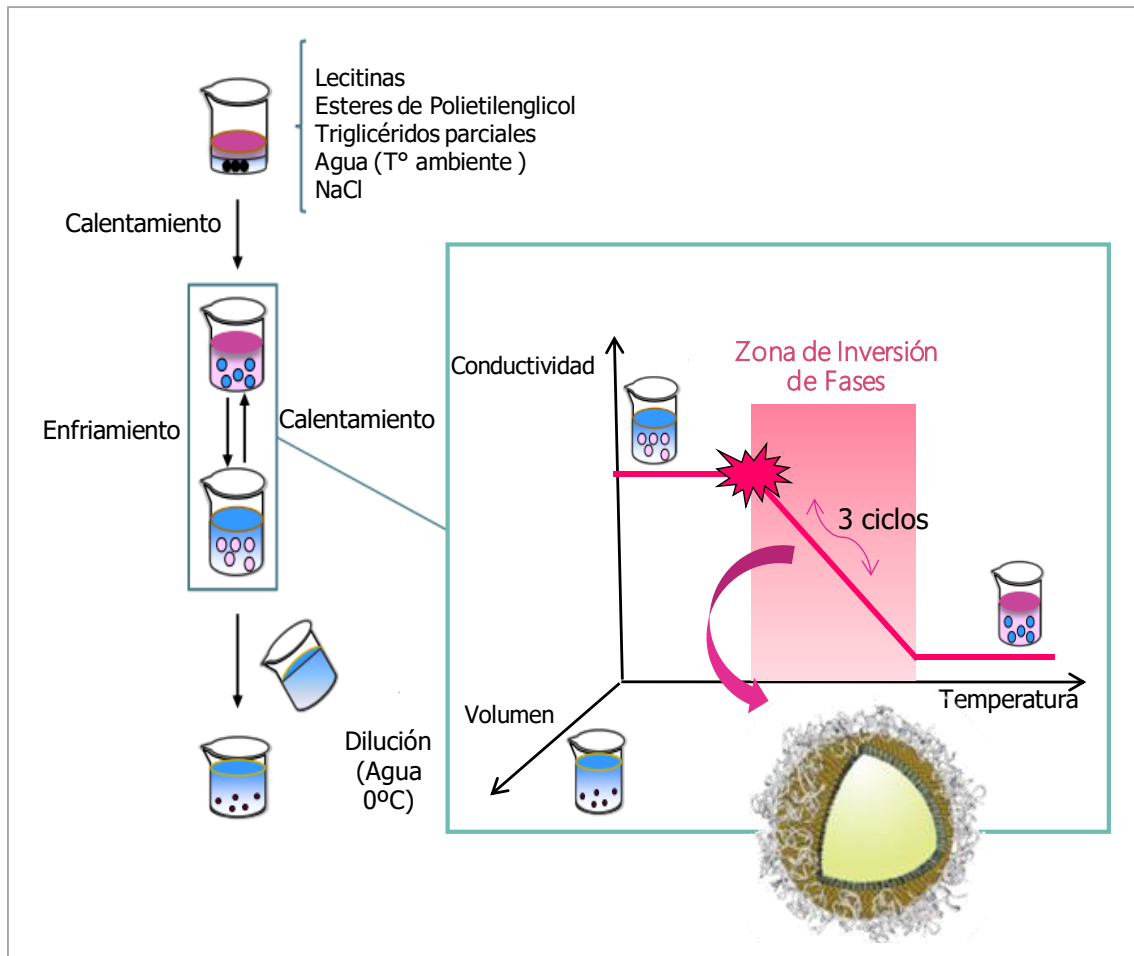


Figura 2.3. Esquema de obtención de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs) mediante el Método de Inversión de Fases (PIT). (Adaptado de Heurtault et.al., 2002.)

El método PIT fue introducido por primera vez por Shinoda y Saito (Shinoda y Saito, 1969), quienes estudiaron las propiedades de emulsiones en función de la temperatura, la composición y el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB, por su nombre en inglés *"Hydrophilic-Lipophilic Balance"*) de los emulsionantes utilizados. Los autores demostraron que el tamaño de las gotas de la emulsión cambia notablemente con la temperatura y el HLB de los emulsionantes, y que, cerca de la PIT el diámetro de las gotas es muy pequeño, pero menos estable hacia la coalescencia y que la inestabilidad de una emulsión es muy sensible a la PIT del sistema.

La temperatura de inversión de fases es la temperatura a la cual el emulsionante cambia su solubilidad preferencial en agua hacia aceite, hecho que ocurre cuando la temperatura aumenta. Es considerado como el rango de

temperatura o temperatura a la cual hay un equilibrio de las propiedades hidrófilas y lipofílicas de un tensioactivo no iónico. El método de PIT se basa en los cambios de los tensioactivos no iónicos de tipo polioxietileno producidos en la solubilidad en función de la temperatura. De hecho, las cadenas PEG del Solutol[®] HS-15, se deshidratan luego de un aumento de la temperatura (Saliou *et al.*, 2013). Este tipo de tensioactivos se vuelven lipofílicos al aumentar la temperatura como consecuencia de la deshidratación de las cadenas de polioxietileno debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua conduciendo a la reducción del balance de HLB induciendo la inversión de fases. A bajas temperaturas, la monocapa de tensioactivo tiene una curvatura espontánea, grande y positiva que forma emulsiones aceite en agua caracterizada por altos valores de conductividad (35 mS/cm). Al aumentar la temperatura, la curvatura espontánea se vuelve negativa, lo que lleva a la formación de emulsión agua en aceite, y observándose una disminución rápida de la conductividad hasta llegar casi a 0 mS/cm a 84 °C (Friberg *et al.*, 1976; Huynh *et al.*, 2009; Saliou *et al.*, 2013).

2.3.2.1-Obtención de NCLs blanco optimizadas para el cargado de TA

Debido a la baja solubilidad del TA en la fase oleosa, se hizo imperativo utilizar un co-surfactante para favorecer la incorporación del fármaco en la formulación. En consecuencia, la composición de las NCLs blanco obtenidas por el PIT, es decir aquellas NCLs vacías (sin fármaco), debió ser optimizada. Para ello, se estudió la influencia de dos co-surfactantes (Captex[®] 500p y ácido oleico) en tres proporciones (20, 30 y 50 %) en relación a la fase oleosa de la formulación original.

2.3.2.2-Obtención de NCLs-TA

Luego de encontrar los excipientes en los cuales el TA es soluble, y obtener las NCLs blanco optimizadas con esos materiales, se avanzó en la obtención de las NCLs-TA mediante el PIT. En éste sentido, se estudió la incorporación de TA en NCLs con 20% de co-surfactante en su matriz lipídica (NCLs con ácido oleico y NCLs con Captex[®] 500p) mediante dos métodos: el Método Directo (MD) y el Método de Fármaco en Exceso (ME).

En el MD, el TA se dispersó en la mezcla de matriz lipídica y co-surfactante bajo calentamiento (85 °C) y agitación, y luego se incorporó al resto de los excipientes para dar comienzo a los ciclos de calentamiento/enfriamiento correspondientes al PIT.

En el ME, se agregó un exceso de TA a la mezcla de co-surfactante y matriz lipídica, se dispersó bajo agitación durante 4 horas (en un caso a temperatura ambiente y en otro caso a 85 °C), y luego la dispersión se centrifugó (10 minutos, 25 °C, 10000 RCF). A continuación, las NCLs se formularon con el sobrenadante mediante el PIT. En la *Tabla 2.1*, se muestra la composición de las NCLs obtenidas por ambas metodologías. Todas las formulaciones se estudiaron por triplicado.

| Componente | MD (g) | ME (g) |
|------------------------------------|-----------|-----------|
| Labrafac® WL 1349. | 0,822 | - |
| Co-surfactante* | 0,2056 | - |
| Lipoid® S75-3 | 0,075 | 0,075 |
| Solutol® HS 15 | 0,846 | 0,846 |
| NaCl | 0,089 | 0,089 |
| Agua (T° ambiente) | 2,960 | 2,960 |
| Agua 0°C | 12,5 | 12,5 |
| TA | 0,004 | - |
| Sobrenadante de: Labrafac® WL 1349 | - | 1,028 |
| + *co-surfactante (20%) +TA | | |

Tabla 2.1. Composición de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA) obtenidas por el Método Directo (MD) y el Método de Fármaco en Exceso (ME).

**Co-surfactante: Ácido oleico o Captex® 500p*

2.3.3-Caracterización de las NCLs

2.3.3.1-Tamaño medio de partícula y potencial zeta

Las partículas obtenidas, tanto las NCLs blanco con ambos co-surfactantes como las NCLs-TA, se caracterizaron en términos de tamaño medio de partícula (TMP), índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta (PZ). Los valores de coeficiente de difusión (CD), diámetro hidrodinámico o TMP e IP fueron determinados mediante espectroscopia de correlación fotónica (ECF), también llamada dispersión dinámica de la luz. El potencial electrocinético o potencial zeta (PZ) de las nanopartículas se determinó por la técnica de electroforesis dinámica de la luz, a partir de la media de los valores de movilidad electroforética.

Las formulaciones fueron diluídas (1:60) en agua desionizada (Milli Q[®]) y todos los análisis se realizaron por triplicado. Previamente, se comprobó que las mediciones no presentaran modificaciones significativas en función de las diluciones.

En el desarrollo de las NCLs blanco se utilizó un equipo Delsa-Nano-C[®] (Beckman Coulter, Osaka, Japon), a una temperatura 25 °C y un ángulo de detección de 165°. En el desarrollo de las NCLs-TA se utilizó un equipo Zetasizer[®] Nanoserie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, United Kingdom) con un láser que opera a 632,8 nm a una temperatura de 25 °C y un ángulo fijo de 173°.

El diámetro de las nanopartículas e IP se obtuvieron de la función de auto correlación provista por el software del equipo (Delsa-Nano 2.2 software, Beckman-Couter, Osaka, Japón) utilizando el método de "Cumulants", que infiere el diámetro a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (*ecuación 2.1*), considerando los valores de viscosidad del solvente informados en la bibliografía.

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta CD}$$

Ec. (2.1)

Donde R_H es el radio hidrodinámico, K es la constante de Boltzmann, T es la Temperatura, CD es el coeficiente de difusión y η es la viscosidad del líquido a 25°C.

Los potenciales zeta (PZ) se obtuvieron a partir del análisis de software del equipo que utiliza la ecuación de Smoluchowski.

La estabilidad coloidal de las diferentes NCLs obtenidas y conservadas a 4 °C, fue evaluada por ECF mediante la determinación de TMP, IP e PZ durante un período de 45 días.

2.3.3.2-Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de las diferentes NCLs blanco fueron obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de los sistemas. Las imágenes y contrastes se construyen a partir de la emisión de electrones de una muestra cuando sobre ella incide un delgado haz de electrones enfocados de alta energía (superior a 40 keV, generalmente).

Para que una muestra pueda analizarse por MEB, por un lado, debe estar completamente seca, ya que las moléculas de agua que permanezcan en la muestra ocasionarían daños en el microscopio y, por otro lado, debe ser conductora de electrones, motivo por el cual suelen ser metalizadas con una delgada lamina de paladio-platino.

Para el estudio, se depositó una gota de cada formulación sobre un pocillo de aluminio, se secó a 30 °C en vacío y se roció con cromo antes del análisis morfológico. Las fotografías de MEB se obtuvieron mediante la utilización de un microscopio digital (ZEISS, Oberkochen, Alemania). La magnificación seleccionada permitió observar en detalle la morfología de las muestras.

2.3.3.3-Osmolaridad y pH

Los valores de pH de las formulaciones se midieron utilizando un pHmetro Mettler Toledo® (Ohio, USA) y las mediciones de la osmolaridad con un osmómetro de presión de vapor (Vapro Model 5600, ELITechGroup WESCOR®, USA), utilizando

soluciones estándares de 100, 290 y 1000 mosmol/kg. Ambos valores se midieron por triplicado en todas las formulaciones.

2.3.3.4-Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Para la cuantificación del TA en las NCLs, se desarrolló una técnica HPLC que permitiera la resolución de la elución del fármaco y de los componentes de las NCLs blanco. Se utilizó un HPLC (Waters® 1525 pump) con un inyector automático (Waters® 717 plus autosampler) y un detector UV y una columna C18 de fase reversa Phenomenex® Luna 5 µm, 250 x 4,60 mm, 100 Å. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de metanol y buffer fosfato (pH=3). Se estudió la resolución de los componentes de las NCLs blanco y una solución de TA en metanol, en función de la composición de la fase móvil, determinándose como proporción óptima metanol:buffer fosfato con pH=3, 70:30; utilizando un flujo de 1 ml/min y una longitud de onda de 240 nm para la detección del fármaco.

Para cada tipo de NCLs blanco (NCLs con ácido oleico y NCLs con Captex® 500p) se construyeron curvas de calibrado incluyendo en la matriz (metanol) una proporción de las NCLs blanco correspondientes. Las curvas de calibrado se realizaron por triplicado y se construyeron en un rango de concentraciones de TA de 0,25 a 5,00 µg/ml, a partir de tres soluciones madres de TA en metanol en una concentración de 0,50 mg/ml.

Por un lado, para determinar la capacidad de carga (CC) del TA en las NCLs, las formulaciones se filtraron (membrana de 0,22 µm) con el objetivo de eliminar los componentes sólidos residuales y, luego, una fracción de las NCLs filtradas se solubilizó en metanol (en relación 1:80) para desintegrar las nanopartículas y, se cuantificó por HPLC. Por otro lado, para determinar la eficiencia de encapsulación porcentual (%EE) del TA en las NCLs, se utilizó una técnica de cromatografía de exclusión de tamaño molecular (SEC, por su nombre en inglés "*Size Exclusion Chromatography*") en la cual las formulaciones se filtraron en columnas PD-10 (Sephadex™ G-25 M). Brevemente, 200 µl de cada formulación fue filtrada en una columna previamente estabilizada con agua ultrapura (Milli-Q®). A continuación, se recolectaron secuencialmente 10 fracciones de 1 ml, y 2 fracciones de 15 ml. En cada

fracción, se determinó la presencia de NCLs y la cantidad de TA mediante ECF y HPLC, respectivamente.

La CC y la %EE de TA en las NCLs se calcularon a partir de los resultados de la cuantificación del TA por HPLC, luego del correspondiente procedimiento antes detallado. En los cálculos de %EE, para las NCLs obtenidas por el MD, se tuvo en cuenta la cantidad inicial de fármaco agregado a la formulación. En el caso de las NCLs obtenidas por el ME, para calcular este parámetro, se determinó la concentración de TA en el sobrenadante de núcleo lipídico con co-surfactante obtenido luego del procedimiento de centrifugación. Los experimentos se realizaron en triplicado.

2.3.3.5-Control de solubilización micelar y control de solubilidad en el surfactante hidrofílico

En paralelo, se realizaron controles para determinar la presencia de TA en las micelas de matriz lipídica/agua, y en los surfactantes hidrofílicos presentes en las NCLs. En el control de solubilización micelar, el TA se dispersó en una mezcla de Labrafac[®] WL 1349 y co-surfactante con calentamiento (85°C) y agitación. A continuación, la dispersión de fármaco se agregó a una masa de agua equivalente a la suma de la masa de los excipientes restantes para dar comienzo a los ciclos de calentamiento/enfriamiento, correspondientes al PIT. Para el control de solubilización micelar correspondiente a las NCLs obtenidas por el MD, el TA fue exactamente pesado. En el caso del control de las NCLs obtenidas por ME, el TA fue dispersado en exceso en la mezcla de Labrafac[®] WL 1349 y co-surfactante, luego la dispersión se centrifugó y el sobrenadante se agregó a la masa de agua equivalente a la suma de la masa de los excipientes.

En ambos casos, la dispersión se filtró con un filtro de 0,22 µm (Minisart[®]) para eliminar el TA sólido y, el filtrado se cuantificó por HPLC para conocer la cantidad de TA en micelas de matriz lipídica/agua que potencialmente podrían formarse durante la preparación de las NCLs mediante el PIT.

Además, con el objetivo de conocer si el TA puede estar solubilizado en la interfaz de las NCLs, se estudió la solubilidad del fármaco en Solutol® HS-15. Para esto, el TA (0,2% p/p) se dispersó en el surfactante (sólido a temperatura ambiente) previamente fundido en un baño de agua. Posteriormente, se utilizó el mismo procedimiento que en la sección "2.3.1-Estudios de solubilidad" de este Capítulo.

2.3.4-Evaluación de la viabilidad celular

La citotoxicidad de las NCLs-TA sobre las células HCE fue evaluada por el ensayo de MTT, realizado en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (Valladolid, España), para determinar cualquier posible daño relacionado con su uso. El ensayo MTT es una prueba colorimétrica que se desarrolló para determinar la supervivencia y el crecimiento de las células eucariotas en la proliferación o para evaluar la citotoxicidad (Mosmann, 1983). Para este estudio, se sembraron 3 placas de 96 pocillos con 10000 células por pocillo dispersas en 100 µl de medio DMEM F-12+Glutamax suplementado con 10% de SFB, 0,1 µg/ml de EGF, 5 µg/ml de insulina

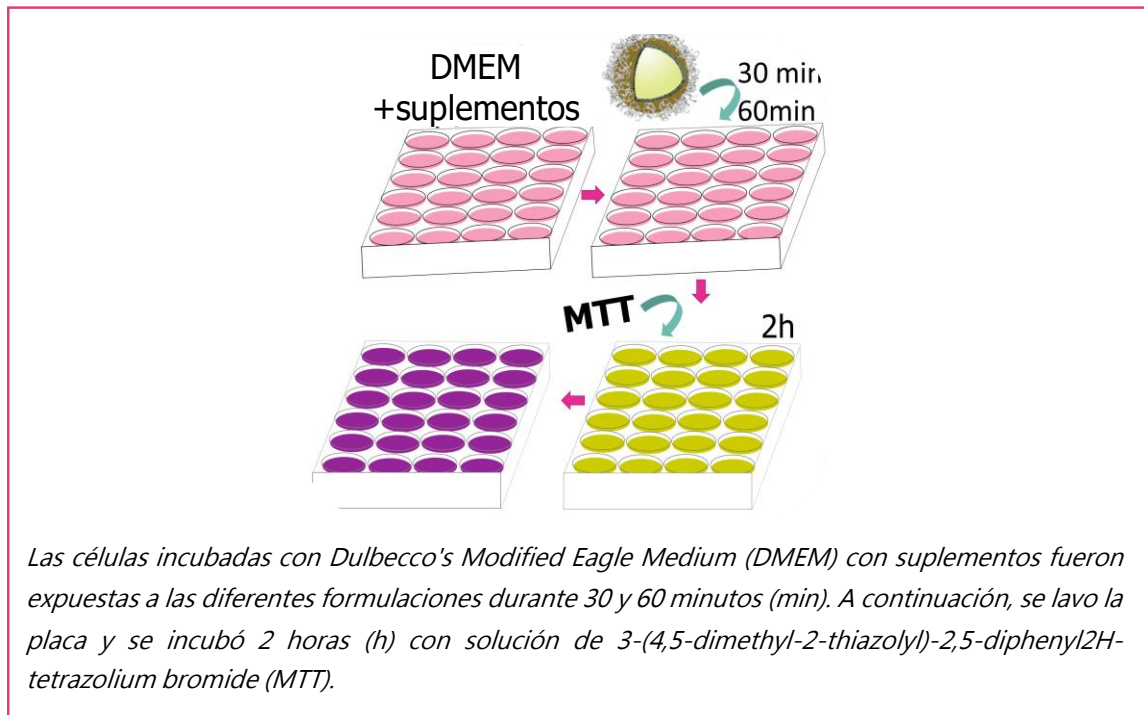


Figura 2.4. Esquema del estudio de viabilidad de células epiteliales de córnea humana luego de la administración de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA) por MTT.

y 62 U/ml de antibióticos. Las células en confluencia se incubaron (30 y 60 minutos) con NCLs-TA obtenidas por MD (Nao-TA1 y Nc-TA1), NCLs blanco (NbA y NbC) y una formulación comercial de TA (Fortcinolona 40[®], Forberton). Todas las formulaciones se esterilizaron previamente mediante filtración. Los tiempos de exposición fueron elegidos en base a los tiempos determinados para el ensayo de evaluación de efecto terapéutico *in-vitro*. En la *Figura 2.4*, se puede observar el esquema experimental del ensayo. Se exploraron dosis de TA de 0,1 y 1 µg de acuerdo a reportes bibliográficos (Ebrahim *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2009).

A partir de una solución de 5 mg/ml de MTT en medio de cultivo sin rojo fenol, y antibiótico/antimicótico, se preparó la solución de trabajo de MTT al 10%. Luego del lavado de la placa se adicionó la solución de trabajo de MTT (45 µl de medio sin rojo fenol + 5 µl de MTT) y se incubó 2 horas a 37 °C en oscuridad. Por último, se agregó ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N en isopropanol anhídrido en cada pocillo. Los valores de absorbancia se midieron a 570 nm (referencia 650 nm) usando un lector SpectraMax M5.

2.3.5-Eficacia terapéutica *in-vitro* de las NCLs-TA

La eficacia terapéutica de las NCLs-TA fue estudiada por la determinación de su capacidad anti-inflamatoria en un modelo de inflamación *in-vitro*. La secreción de la citocina inflamatoria IL-6 por las células HCE en respuesta a la exposición de factor de necrosis tumoral (TNF)-α (células inflamadas) fue medida luego del tratamiento con las NCLs-TA.

Para éste ensayo, se sembraron 3 placas de 24 pocillos con 40000 células por pocillo dispersas en 500 µl de medio DMEM F-12 y Glutamax suplementado con 10% de SFB, 0,1 µg/ml de EGF, 5 µg/ml de insulina y 62 U/ml de antibióticos. En la *Figura 2.5*, se puede observar el esquema experimental de este ensayo.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se retiró el medio de cultivo, se añadió 500 µl de medio de cultivo sin suplementos y se incubó durante

4 horas. A continuación, las células se incubaron durante 48 horas en 500 μ l de medio sin suplementos con 20 ng/ml de TNF- α . Tras éste período, las células se trataron en 500 μ l de medio sin suplementos con las diferentes formulaciones durante 1 hora. Todas las formulaciones se esterilizaron previamente mediante filtración. Como control negativo (Control (-), células no inflamadas y no tratadas) se utilizaron HCE a las cuales no se les agregó TNF- α para inflamarlas ni tampoco recibieron tratamiento. Como control positivo (Control (+), células inflamadas y no tratadas) se utilizaron HCE a las cuales se les agregó TNF- α y no recibieron tratamiento.

Luego de la correspondiente incubación, las formulaciones se retiraron y se añadió 500 μ l de medio de cultivo sin suplementos durante 48 horas. Por último, se recolectó el sobrenadante de las células y la IL-6 secretada se cuantificó por ELISA. Para esta cuantificación, brevemente, en la placa del kit ELISA se añadieron 100 μ l de cada muestra y de las soluciones testigos (correspondientes a la curva de calibración) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El medio se retiró, la placa se lavó tres veces, se añadió 100 μ l de estreptavidina-HRP a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se

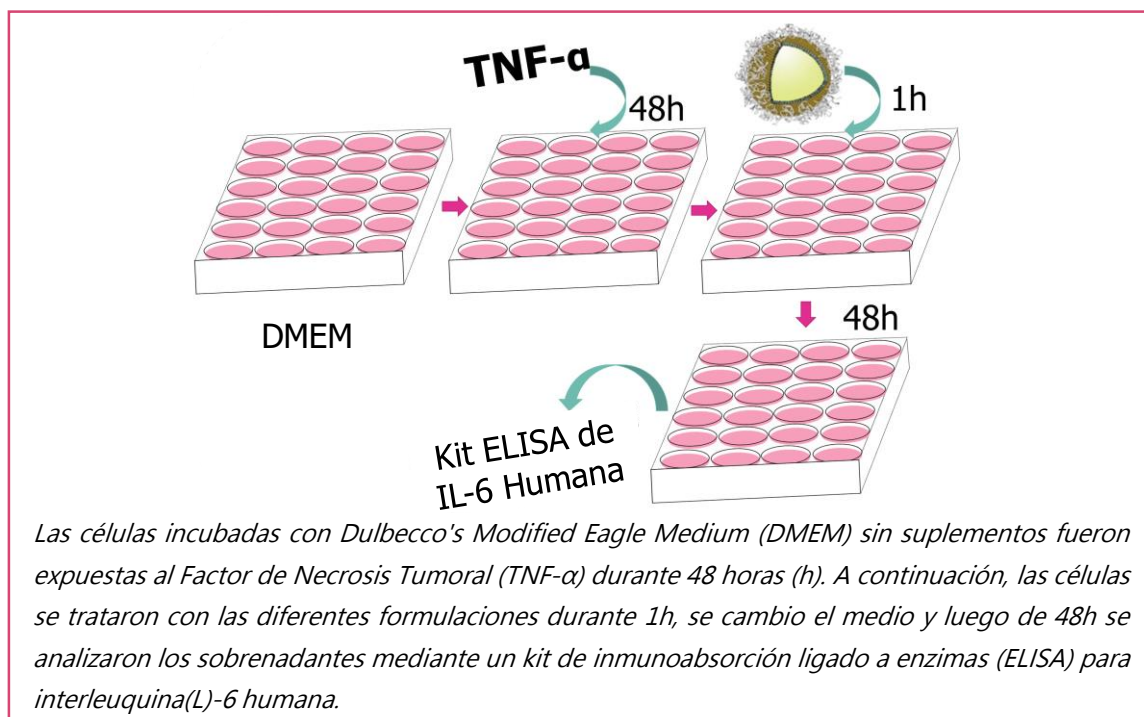


Figura 2.5. Esquema experimental del estudio de eficacia in-vitro de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA).

retiró el medio y la placa se lavó tres veces. Luego, se añadió 100 µl del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, por su nombre en inglés "3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine") a cada pocillo hasta obtener un color azul y, por último, se añadió 100 µl de la solución de ácido sulfúrico a cada pocillo para frenar la reacción. La absorbancia de los pocillos se determinó a 450 nm. Los datos fueron normalizados respecto al control de células inflamadas y expresados como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA, del inglés "Analysis of variance") y, se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 7.

2.4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1-Estudios de solubilidad

Los estudios de solubilidad se realizaron con el objetivo de seleccionar los excipientes lipídicos que permitieran la incorporación de TA en las NCLs. Los resultados mostraron que el TA no es soluble en lípidos formadores de matriz en una concentración de 0,2%, mientras que es soluble en los co-surfactantes Captex[®] 500p y ácido oleico (Tabla 2.2).

| Lípidos formadores de matriz lipídica | Solubilidad a 0,2% (p/p) |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Labrafac [®] WL 1349 | NS |
| Captex [®] 8000 | NS |
| Miglyol [®] | NS |
| Co-surfactantes | |
| MIP | NS |
| Plurol [®] Stearique | NS |
| Mirytol [®] 318 | NS |
| Aceite de castor | NS |
| Captex [®] 200p | NS |
| Captex [®] 500p | S |
| Ácido oleico | S |

Tabla 2.2: Solubilidad de Acetónido de Triamcinolona (TA) en diferentes lípidos formadores de matriz lipídica y surfactantes. Abreviaturas: NS (no soluble), S (soluble), p/p (peso en peso).

2.4.2-Obtención de NCLs-blanco optimizadas para el cargado de TA

La composición de las NCLs blanco fue optimizada para la incorporación del TA, reemplazando un porcentaje de la matriz lipídica (Labrafac® WL 1349) por ácido oleico o Captex® 500p. Como se puede observar en la *Tabla 2.3*, el TMP e IP de las NCLs blanco tiende a aumentar a medida que incrementa la cantidad de co-surfactante en la formulación. Las NCLs blanco con 20% de ambos co-surfactantes mostraron resultados aceptables en términos de TMP, IP y PZ, de acuerdo a las NCLs blanco originales (**Nb**) con 100% de Labrafac® WL 1349 en su matriz lipídica (Heurtault *et al.*, 2002; Heurtault *et al.*, 2003). Tanto las NCLs blanco con 20% de ácido oleico (**Nb-A20**) como con 20% de Captex® 500p (**Nb-C20**) en su matriz lipídica, mostraron un TMP cercano a 40 nm, un IP menor a 0,2 y un PZ levemente negativo. En tanto las NCLs blanco con 30% de co-surfactante en su matriz lipídica mostraron un TMP cercano a 40 nm, pero el IP es mayor a 0,2 en el caso de las nanopartículas que contienen Captex® 500p (**Nb-C30**). De la misma manera, el TMP e IP fue mayor para las NCLs en las cuales la mitad de matriz lipídica es reemplazada por co-surfactante (**Nb-A50** y **Nb-C50**).

| Denominación | Composición de la matriz lipídica | | TMP (nm) | IP | PZ (mV) |
|---|-----------------------------------|----|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Nb | % Labrafac® WL1349 | | 51,0 ±0,6 | 0,057 | -0,69±0,2 |
| | 100 | | | | |
| Nb-A20 Nb-A30 Nb-A30 | %Ácido oleico | | 37,1±0,8 38,9±0,6 187±93 | 0,066 0,102 0,109 | -5,6± 0,8 -3,9±0,7 -6,6±0,2 |
| | 80 | 20 | | | |
| | 70 | 30 | | | |
| | 50 | 50 | | | |
| Nb-C20 Nb-C30 Nb-C50 | % Captex® 500p | | 41±3 39,4±0,6 73,0±0,7 | 0,122 0,229 0,320 | -3±1 -2±1 1,6±0,5 |
| | 80 | 20 | | | |
| | 70 | 30 | | | |
| | 50 | 50 | | | |

Tabla 2.3: Tamaño Medio de Partícula (TMP), Índice de Polidispersidad (IP) y Potencial Zeta (PZ) de Nanocápsulas Lipídicas blanco con composición diferente núcleo lipídico.

Las NCLs con ácido oleico mostraron un PZ negativo a distintas concentraciones de co-surfactante, mientras que, el PZ de las NCLs con Captex® 500p se hace más electropositivo a medida que aumenta la concentración de este excipiente.

Además, se realizó un estudio de estabilidad coloidal con el objetivo de determinar si las características de las distintas NCLs blanco se modifican en las condiciones de almacenamiento (4 °C, protegidas de la luz). Como se puede observar en las *Figuras 2.6 y 2.7*, los resultados mostraron que tanto el TMP e IP de Nb-A20 como de Nb-C20 no presentaron variaciones durante el período de estudio, al igual que la formulación original de Nb (Heurtault *et al.*, 2002; Heurtault *et al.*, 2003) para la cual, anteriormente, se demostró su estabilidad durante 18 meses a 4 °C. Por el contrario, en las NCLs blanco con mayores proporciones de co-surfactante, el TMP e IP aumenta en este período e incluso en algunas formulaciones se observó la separación de las fases que las componen a los 45 días de estudio.

En este sentido, la formación de nanopartículas depende de las proporciones de excipientes (Labrafac® WL 1349, Lipoid® S75-3, Agua, NaCl y Solutol® HS-15). La presencia de Labrafac® WL 1349 es importante para solubilizar el Lipoid® S75-3, y se ha demostrado que al aumentar la proporción de fase oleosa (Labrafac® WL 1349) tiende a aumentar el tamaño de partícula (Heurtault *et al.*, 2003). Este fenómeno puede observarse en las formulaciones estudiadas, ya que al disminuir la proporción de Labrafac® WL 1349 como en el caso de las NCLs con 20 y 30% de ácido oleico o Captex® 500p, TMP tiende a ser menor que el observado en las Nb tradicionales.

El ácido oleico y el Captex® 500p son co-surfactantes y, por lo tanto, pueden reemplazar en parte al Labrafac® WL 1349 utilizado como la fase oleosa de las NCLs y no completamente (Roger *et al.*, 2011). Probablemente, en el caso de las NCLs con 50% de co-surfactante en la matriz lipídica se forman estructuras diferentes a las NCLs o, la naturaleza y cantidad de Solutol® HS-15 no son suficientes para estabilizar al sistema de manera efectiva.

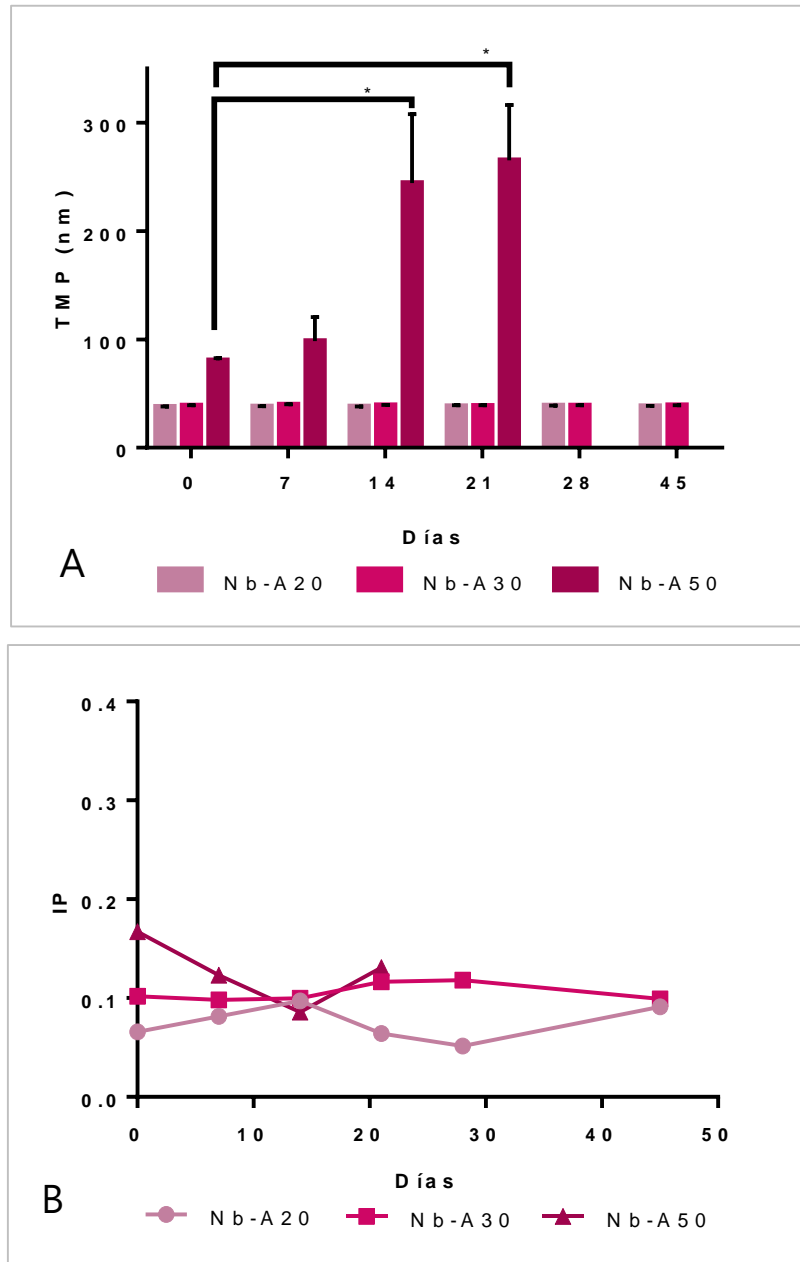


Figura 2.6. Estabilidad coloidal de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs) blanco con ácido oleico.

El gráfico de barras (A) muestra los valores del tamaño medio de partícula (TMP) de las NCLs con un núcleo lipídico reemplazado en un 20, 30 y 50% por Ácido oleico (Nb-A20, Nb-A30 y Nb-A50, respectivamente). Los valores se expresan en nanómetros (nm) como la media \pm S.E.M de las formulaciones en triplicado, en cada día de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se representan respecto al valor de la formulación respectiva en el día inicial de estudio (Día 0); (* $p < 0,05$). El gráfico de líneas (B) representa los valores correspondientes al índice de polidispersidad (IP) de Nb-A20, Nb-A30 y Nb-A50.

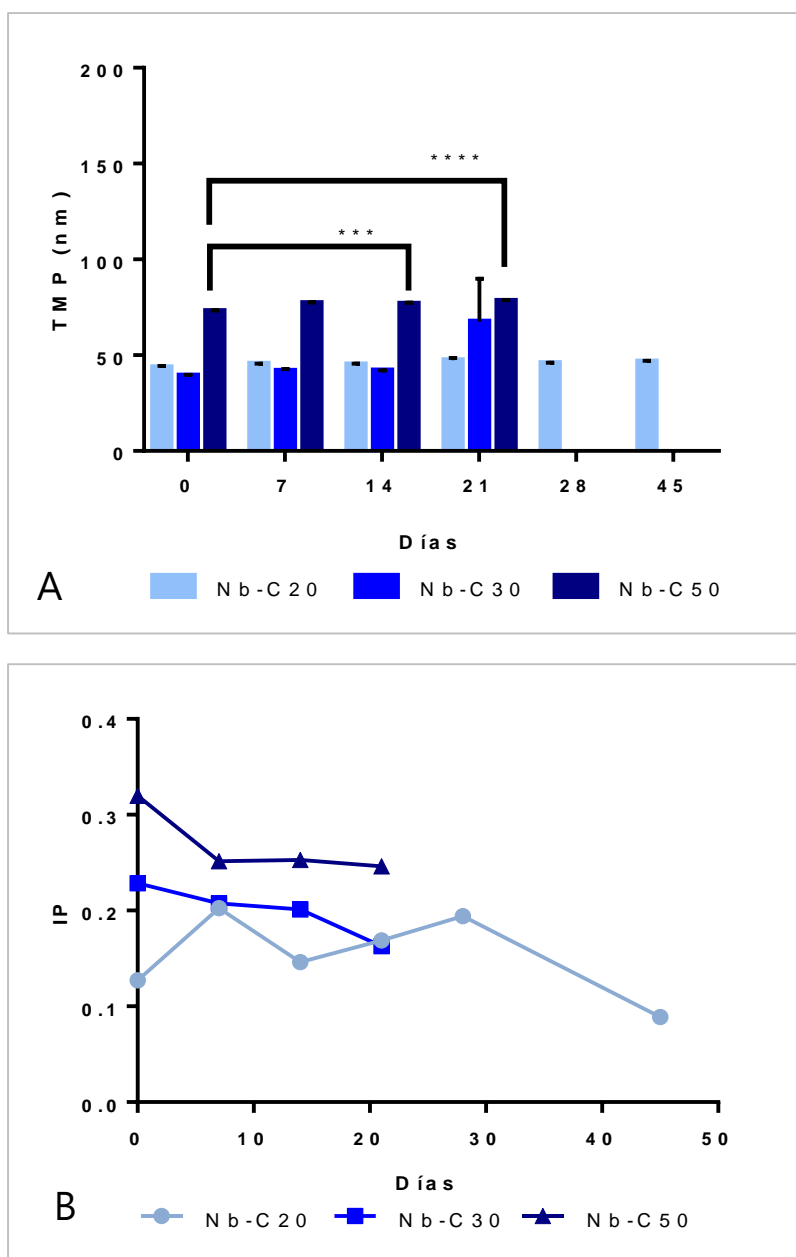


Figura 2.7. Estabilidad coloidal de las Nanocápsulas Lipídicas (NCLs) blanco con Captex® 500p.

El gráfico de barras (A) muestra los valores del tamaño medio de partícula (TMP) de las NCLs con un núcleo lipídico reemplazado en un 20, 30 y 50% por Captex® 500p (Nb-C20, Nb-C30 y Nb-C50, respectivamente). Los valores se expresan en nanómetros (nm) como la media \pm S.E.M de las formulaciones en triplicado, en cada día de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se representan respecto al valor de la formulación respectiva en el día inicial de estudio (Día 0); (*** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$). El gráfico de líneas (B) representa los valores correspondientes al índice de polidispersidad (IP) de Nb-C20, Nb-C30 y Nb-C50.

El PZ representa el potencial eléctrico en el plano de corte de las NCLs, y se considera un indicador importante y útil para predecir y controlar la estabilidad de las mismas. En general, las NCLs tienen una carga superficial negativa debido a la contribución de las moléculas de fosfolípidos y la presencia de dipolos de PEG en su capa (Heurtault *et al.*, 2003; Huynh *et al.*, 2009). Las cadenas de PEG en la superficie crean una carga cercana a la neutralidad, mientras que estabilizan a las partículas por repulsión estérica. Los potenciales ligeramente negativos podrían explicarse por la presencia de una pequeña proporción de tensioactivos hidrolizados, que aportan pocos grupos polares cargados negativamente (Hirsjarvi *et al.*, 2013).

De acuerdo a éstos resultados, las Nb-A20 y las Nb-C20 fueron elegidas para cargar el sistema con el TA.

2.4.3-Microscopía electrónica de barrido

Con el objetivo de estudiar su morfología, las NCLs blanco se evaluaron por MEB. En la *Figura 2.8*, se pueden observar las imágenes obtenidas para Nb, Nb-A20 y Nb-C20. Las mismas muestran que las NCLs blanco presentan forma esférica como se puede visualizar en la imagen correspondiente a Nb y, además, que las formulaciones son homogéneas. No obstante, pueden observarse la presencia de partículas de mayor tamaño y que existe una diferencia entre el diámetro obtenido por ésta técnica respecto del obtenido por el método de ECF.

Cabe destacar que, durante el ensayo, al acercarse el microscopio a la muestra, las partículas aumentaban su tamaño lo que podría ocurrir a causa del choque de electrones. De la misma manera, las nanopartículas podrían sufrir un aplanado en el proceso de secado durante la preparación de las muestras para microscopía (Lamprecht *et al.*, 2004). A su vez, los bordes de las mismas no están bien definidos en la imagen debido a que la sensibilidad de la técnica, dificulta el enfoque de objetos con tamaños tan pequeños. La morfología observada es coincidente con otros sistemas similares basados en NCLs (Heurtault *et al.*, 2003; Vonarbourg *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2014).

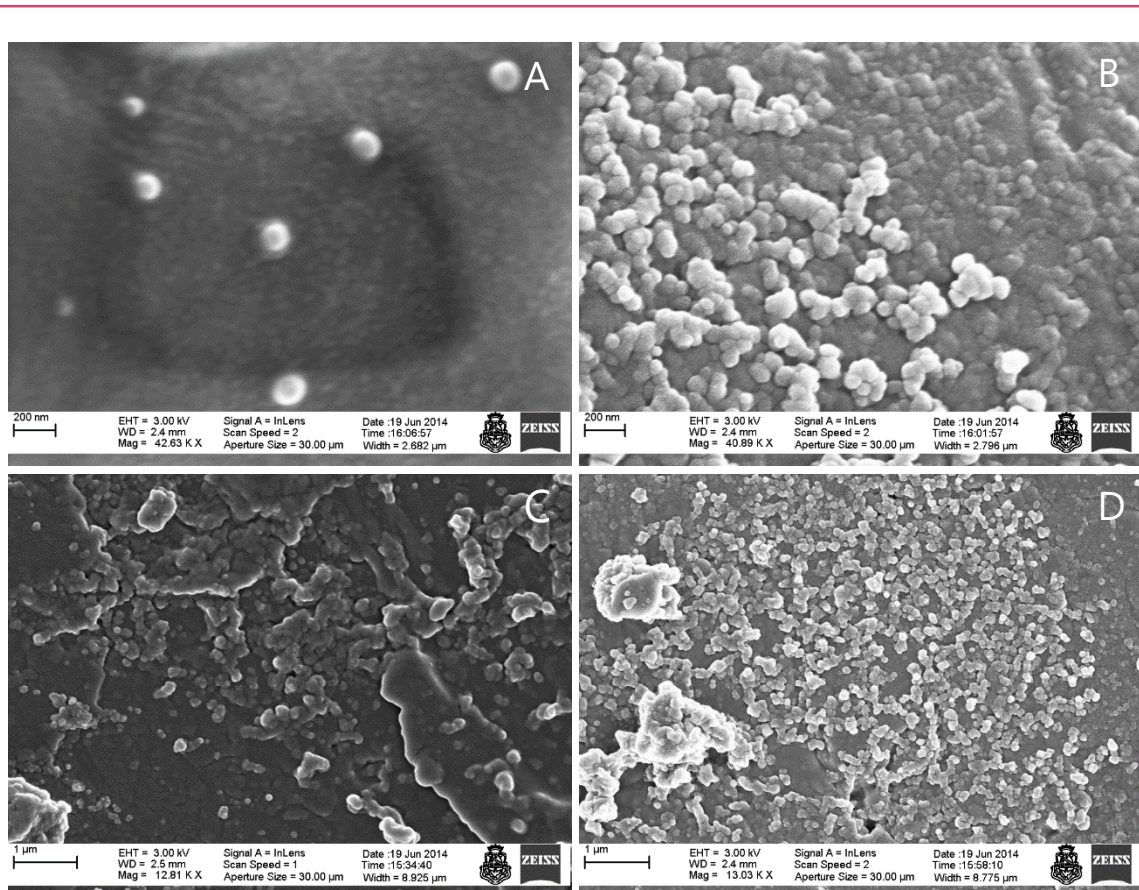


Figura 2.8. Imágenes de Nanocápsulas Lipídicas blanco con Labrafac[®] WL 1349, ácido oleico y Captex[®] 500p obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.

Las imágenes muestran a las NCLs blanco con un núcleo lipídico compuesto por: (A) 100% de Labrafac[®] WL 1349 (Nb), y aquellas en las cuales se reemplazó este lípido con (B y D) 20% de ácido oleico (Nb-A20), y (D) 20% de Captex[®] 500p. En cada imagen se detalla la escala de medición.

2.4.4-Estudios de obtención y caracterización de NCLs-TA

Además de la determinación de las propiedades coloidales y morfológicas de las NCLs, la cantidad y la ubicación del fármaco en las mismas son otros aspectos importantes en la caracterización de las nanopartículas como PLFs. De acuerdo a su patente de preparación (Saulnier *et al.*, 2015), el cargado de un agente activo en las NCLs involucra la encapsulación o la incorporación del mismo en su núcleo lipídico líquido o la adsorción en su capa lipídica rígida (surfactantes).

En este trabajo, para la determinación de la CC de TA en las diferentes NCLs, las formulaciones se filtraron con una membrana con 220 nm de poro con el fin de separar las NCLs-TA de los sólidos residuales de la TA no solubilizada y, en

consecuencia, no incorporada en ellas. Considerando la baja solubilidad de TA, la técnica se seleccionó teniendo en cuenta que las partículas sólidas de fármaco quedan retenidas en la membrana de filtración mientras que, las NCLs pasan a través de la misma ya que presentan un TMP menor a 50 nm. Como se puede observar en la *Tabla 2.4*, las NCLs obtenidas por MD que están compuestas con un 20% de co-surfactante en su matriz lipídica tanto con Captex[®] 500p (**Nc-TA1**) como con ácido oleico (**Nao-TA1**), alcanzaron un TMP similar al de sus NCLs blanco correspondientes, una estrecha distribución de tamaño (IP menor a 0,2) y un PZ negativo. La CC obtenida fue levemente superior para Nc-TA1 (238 µg/ml) que la obtenida para Nao-TA1 (225 µg/ml). En cuanto a las NCLs con 20% de ácido oleico en su núcleo lipídico, obtenidas por el ME con la solubilización del TA a temperatura ambiente (**Nao-TA2**) y a 85 °C (**Nao-TA3**), presentaron un TMP levemente superior a las obtenidas por MD y un PZ negativo mayor. De la misma manera, las NCLs con 20% de Captex[®] 500p en su núcleo lipídico obtenidas por el ME y, en las cuales el TA se solubilizó a temperatura ambiente (**Nc-TA2**) y a 85 °C (**Nc-TA3**), presentaron TMP levemente superior al obtenido por MD y PZ levemente más electronegativo que las NCLs obtenidas por MD (**Nc-TA1**).

| Método de solubilización TA | Formulación | pH | TMP (nm) | IP | PZ (mV) | CC (µg/g) | EE (%) | |
|---|-------------|---------|----------|----------|---------|-----------|----------|----|
| Directo | Nao-TA1 | 5,03 | 34,2±0,7 | 0,088 | -9±2 | 225±8 | 43 | |
| | Nc-TA1 | 4,97 | 37±2 | 0,074 | -1±2 | 238±8 | 41 | |
| Fármaco en Exceso Temperatura ambiente | Nao-TA2 | 4,97 | 47,2±0,5 | 0,071 | -23,5±1 | 24,4±0,8 | - | |
| | Nc-TA2 | 5,27 | 44,8±0,5 | 0,055 | -7±1 | 40±4 | - | |
| | 85 °C | Nao-TA3 | 4,91 | 47,6±0,5 | 0,067 | -17±1 | 77,8±0,6 | 43 |
| | | Nc-TA3 | 5,21 | 44,3±0,6 | 0,038 | -6,3±0,3 | 121±5 | 42 |

Tabla 2.4. Propiedades de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA).

En el estudio de estabilidad coloidal de éstas nanopartículas, como se puede observar en las *Figuras 2.9 y 2.10*, el TMP, el IP y la CC de las NCLs-TA presentaron variaciones mínimas en el período de estudio, de igual manera, las variaciones en IP, CC y el PZ fueron mínimas para todas las formulaciones, salvo los PZ de Nao-TA2 y Nao-TA3 que resultaron menos electronegativos luego de días.

La diferencia en valor neto entre el PZ de las NCLs con ácido oleico obtenidas por MD, en relación con aquellas con ácido oleico obtenidas por ME, podría deberse a una ubicación diferente del ácido oleico o del fármaco en las nanopartículas. En cuanto a la incorporación del TA en las partículas, las NCLs obtenidas por el MD mostraron mayor CC en comparación con las NCLs obtenidas por el ME.

Como se mencionó anteriormente, la CC de las NCLs involucra a todo el TA incorporado en las NCLs, tanto el encapsulado en el núcleo lipídico como el adsorbido en la capa de surfactantes. No obstante, se debe tener en cuenta que, durante el proceso de preparación de las NCLs, se podrían formar micelas entre la matriz lipídica (Labrafac® WL 1349/ácido oleico, o Labrafac® WL 1349/Captex® 500p) y el agua, que podrían incorporar TA. A su vez, la cantidad de fármaco en estas micelas podría ser considerado dentro de la CC debido que las mismas podrían tener un tamaño menor al poro de la membrana utilizada para determinar la CC. En base a esto, para conocer la ubicación del TA en las NCLs, las formulaciones se filtraron por SEC y, se realizaron los controles de formación de micelas según el método de preparación (MD o ME) y un control de solubilización en el surfactante hidrofílico.

La SEC es una técnica que permite separar partículas en solución según su tamaño, eluyendo primero las partículas más grandes y, luego, las de menor tamaño. En este trabajo, la columna de SEC utilizada permitió separar las NCLs con TA encapsulado en su interior, de aquel adsorbido en las nanopartículas o presente en micelas de matriz lipídica/agua de pequeño tamaño. Los resultados de la determinación de TA en las fracciones de NCLs y fracciones posteriores (correspondientes a fármaco libre o en micelas), mostraron que la %EE de TA es cercana al 40% tanto para las NCLs obtenidas por el MD como para aquellas

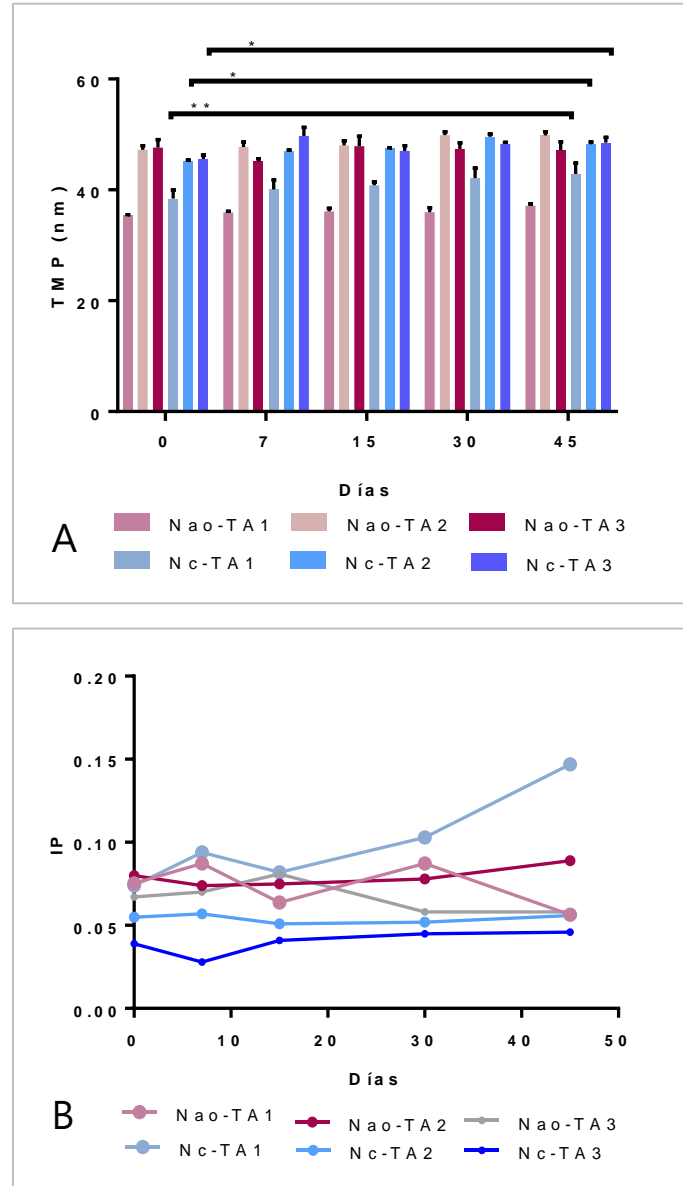


Figura 2.9. Estabilidad coloidal de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA) I

El gráfico de barras muestra los valores de las NCLs-TA en un período de 45 días, correspondientes al (A) Tamaño Medio de Partícula (TMP) en nanómetros (nm), mientras que el gráfico de líneas muestra los correspondientes al (B) Índice de Polidispersidad (IP). Las formulaciones estudiadas corresponden a: NCLs-TA con núcleo lipídico reemplazado con 20% de ácido oleico obtenidas por el Método Directo de incorporación de TA (Nao-TA1) y por el Método de Fármaco en Exceso a temperatura ambiente (Nao-TA2) y a 85 °C (Nao-TA3); y aquellas con núcleo lipídico reemplazado con 20% de Captex® 500p obtenidas por el Método Directo de incorporación de TA (Nc-TA1) y por el Método de Fármaco en Exceso a temperatura ambiente (Nc-TA2) y a 85 °C (Nc-TA3). Los datos se muestran como la media \pm S.E.M de las formulaciones en triplicado, en cada día de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se representan respecto al valor de la formulación correspondiente, en el día inicial de estudio (Día 0); (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

obtenidas por el ME a 85 °C; en relación a la cantidad de fármaco cargado en cada una.

En relación al control de formación de micelas, por un lado, se observó que el TA podría encontrarse en micelas de matriz lipídica/agua en 4,7% para NCLs con ácido oleico y en 7,2% en NCLs con Captex® 500p, cuando se utiliza el MD para la incorporación del fármaco. Por otro lado, el fármaco podría estar presente en micelas en 32,1% para NCLs con ácido oleico y en 14,9% para NCLs con Captex® 500p, cuando el TA es incorporado por ME. Por último, el control de solubilidad del TA en el surfactante hidrofílico (Solutol® HS 15), demostró que el fármaco es soluble en el mismo a la concentración estudiada (0,2% p/p).

A partir de los resultados que presentaron las NCLs-TA estudiadas en relación a la CC, EE% y controles, se podría inferir que el TA se encuentra en las NCLs en parte en la matriz lipídica y, en parte adsorbido en la capa de surfactantes. A su vez, la CC de las formulaciones superior a la %EE y la solubilidad elevada del TA en Solutol® HS-15 (mayor a 0,2% p/p), podrían indicar que el fármaco no encapsulado en las NCLs se encuentra en la interfaz de las mismas, interaccionando con los surfactantes. A su vez, la CC mayor de las NCLs obtenidas por el MD respecto a las obtenidas por el ME, podría deberse a que en el primero el TA interacciona con los surfactantes desde el inicio del proceso de obtención.

Cabe señalar que los resultados de la ECF de las fracciones obtenidas por SEC, mostraron una sola población de partículas en la fracción correspondiente a las NCLs. A su vez, no se observaron poblaciones de nano-objetos en las fracciones posteriores a las NCLs, por lo cual, se puede inferir que la concentración de micelas es baja y que el fármaco cuantificado en ellas corresponde principalmente al adsorbido en las NCLs. Probablemente, el TA adsorbido en la capa de surfactantes NCLs podría interaccionar con las moléculas de dextrano de la columna Sephadex® durante el procedimiento y, en consecuencia, eluir en las fracciones posteriores a las nanopartículas. Teniendo en cuenta que las NCLs obtenidas por el MD permiten una mayor incorporación de TA, Nao-T1 y Nc-T1 fueron seleccionados para los ensayos posteriores; correspondientes a estudios de viabilidad celular y eficacia terapéutica.

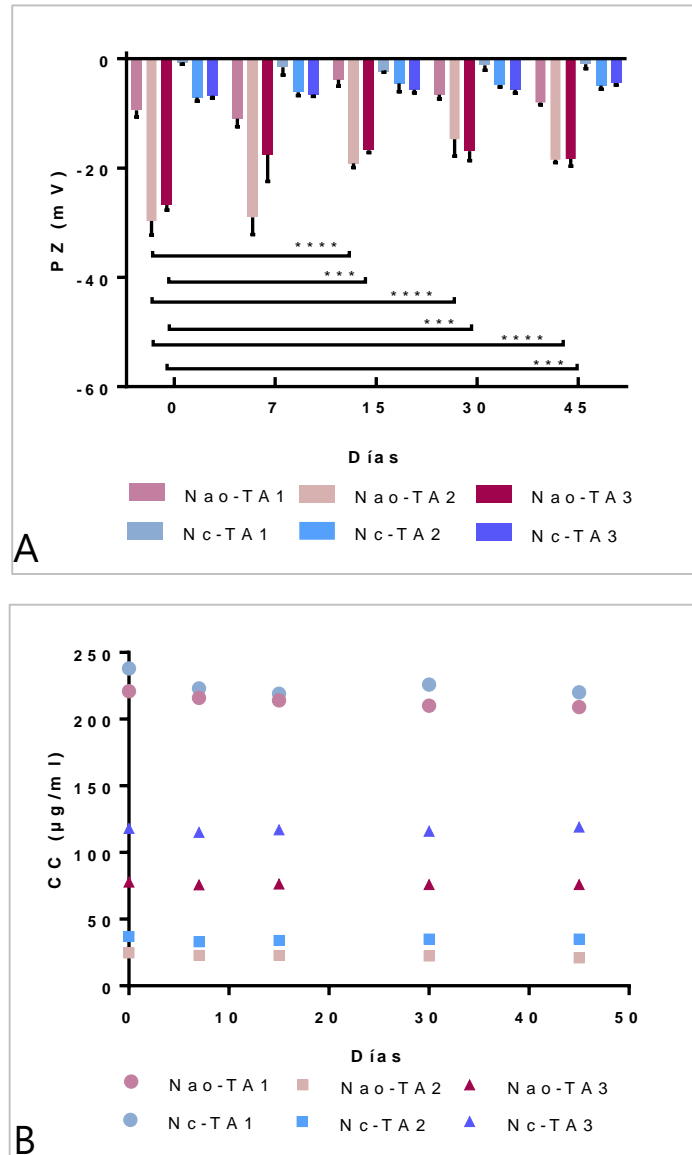


Figura 2.10. Estabilidad coloidal de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA) II

El gráfico de barras muestra los valores de las NCLs-TA en un período de 45 días, correspondientes a (A) Potencial Zeta (PZ) en milivoltios (mV); mientras que el gráfico de puntos (B) muestra los correspondientes a la Capacidad de Carga (CC) de TA en la formulación en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Las formulaciones estudiadas corresponden a: NCLs-TA con núcleo lipídico reemplazado con 20% de ácido oleico obtenidas por el Método Directo de incorporación de TA (Nao-TA1) y por el Método de Fármaco en Exceso a temperatura ambiente (Nao-TA2) y a 85 °C (Nao-TA3), y aquellas con núcleo lipídico reemplazado con 20% de Captex[®] 500p obtenidas por el Método Directo de incorporación de TA (Nc-TA1) y por el Método de Fármaco en Exceso a temperatura ambiente (Nc-TA2) y a 85 °C (Nc-TA3). Los datos se muestran como la media \pm S.E.M de las formulaciones en triplicado, en cada día de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se representan respecto al valor de la formulación correspondiente, en el día inicial de estudio (Día 0); (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

2.4.5-Evaluación de la viabilidad celular

La evaluación de la biocompatibilidad de los sistemas obtenidos es muy importante para su potencial administración ocular, teniendo en cuenta que la toxicidad de TA es un aspecto cuestionado durante el uso de formulaciones comerciales de este fármaco. Diferentes autores, han demostrado que la toxicidad celular provocada por TA se desencadena por una reducción en la actividad mitocondrial y una activación del mecanismo de muerte celular independiente de caspasas. A su vez, en estudios *in-vivo*, la toxicidad se puede evidenciar por la desorganización de las capas de la retina, la pérdida de la densidad de la red coroidea y la vasoconstricción de los vasos sanguíneos de la retina (Yeung *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2006b; Valamanesh *et al.*, 2009; El Zaoui, et al. 2015).

Luego de la obtención y caracterización de las NCLs-TA, el trabajo avanzó hacia el estudio *in-vitro* de viabilidad celular luego de la administración de las formulaciones seleccionadas con el objetivo de evaluar si las mismas pueden ser administradas a nivel ocular. Para ello, se determinó el porcentaje de células viables en las células HCE mediante la técnica de MTT, luego de su incubación con las NCLs-TA seleccionadas (Nao-T1 y Nc-T1), sus correspondientes NCLs blanco y, la suspensión comercial de TA (Fortcinolona[®]). Se evaluó la administración de las formulaciones mencionadas en dos concentraciones de TA (1 µg/ml y 0,1 µg/ml) con el objetivo de establecer la ventana terapéutica en el cual el fármaco no es citotóxico para las células; a dos tiempos de exposición (30 y 60 minutos).

El reactivo MTT es reducido a formazan en las mitocondrias de células viables, mediante enzimas oxido reductasas celulares dependientes de NAD(P)H (del inglés "*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*"). La reacción puede ser visualizada mediante el cambio de color de la solución, y este puede ser directamente relacionado al número de células viables debido a que la reducción ocurre, solamente, cuando las enzimas oxido reductasas mitocondriales son activas. La cantidad de MTT precipitado es proporcional a la tasa de actividad metabólica y, en consecuencia, al número de células viables presente. Al comparar la cantidad de formazan producido por células tratadas con las formulaciones de TA respecto al

producido por células no tratadas se puede inferir indicios sobre biocompatibilidad de las mismas.

En los gráficos de barras de la *Figura 2.11*, se representa el porcentaje (%) de viabilidad celular de las células HCE expuestas a las distintas formulaciones respecto a las células HCE no tratadas (células control). Los resultados mostraron que existe una disminución significativa de la viabilidad celular respecto a las células control luego de 60 minutos de incubación con Nao-T1 ($p < 0,0005$), Nc-T1 ($p < 0,00001$) y Fortcinolona[®] ($p < 0,05$). Sin embargo, según establece la *Organización Mundial de Estandarización* (International Organization for Standardization (ISO), 2009), se considera que las formulaciones no son citotóxicas en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, debido a que el porcentaje de viabilidad es superior al 70% en todos los casos.

Teniendo en cuenta las concentraciones de TA estudiadas, estos resultados son comparables con los hallazgos obtenidos por otros autores en estudios de toxicidad de TA libre y en otras formas farmacéuticas, en líneas celulares oculares. En este sentido, en estudios de toxicidad en cultivos primarios de células retinales se demostró que el TA en una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ resultó tóxica debido a la precipitación del fármaco y la formación de cristales (Chung *et al.*, 2007). En cuanto a líneas celulares establecidas, se han reportado estudios de la toxicidad del TA en células del epitelio pigmentario de la retina, las células gliales y las células endoteliales de la retina, en los cuales se demostró que existe una relación entre la toxicidad del fármaco y su concentración y, además, el tiempo de exposición al mismo.

En un estudio en las células ARPE-19 (línea celular del epitelio pigmentario retinal con propiedades diferenciadas) realizado por Narayanan y cols., se observó una reducción significativa de la viabilidad celular luego de la exposición a TA dispersado en alcohol bencílico y en medio de cultivo en concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Narayanan *et al.*, 2006b). En otro estudio de toxicidad en esta línea celular, se determinó una disminución de la viabilidad de las células luego de su incubación con TA dispersada en alcohol bencílico mediante ensayo MTT pero, no se determinó una disminución significativa de la actividad

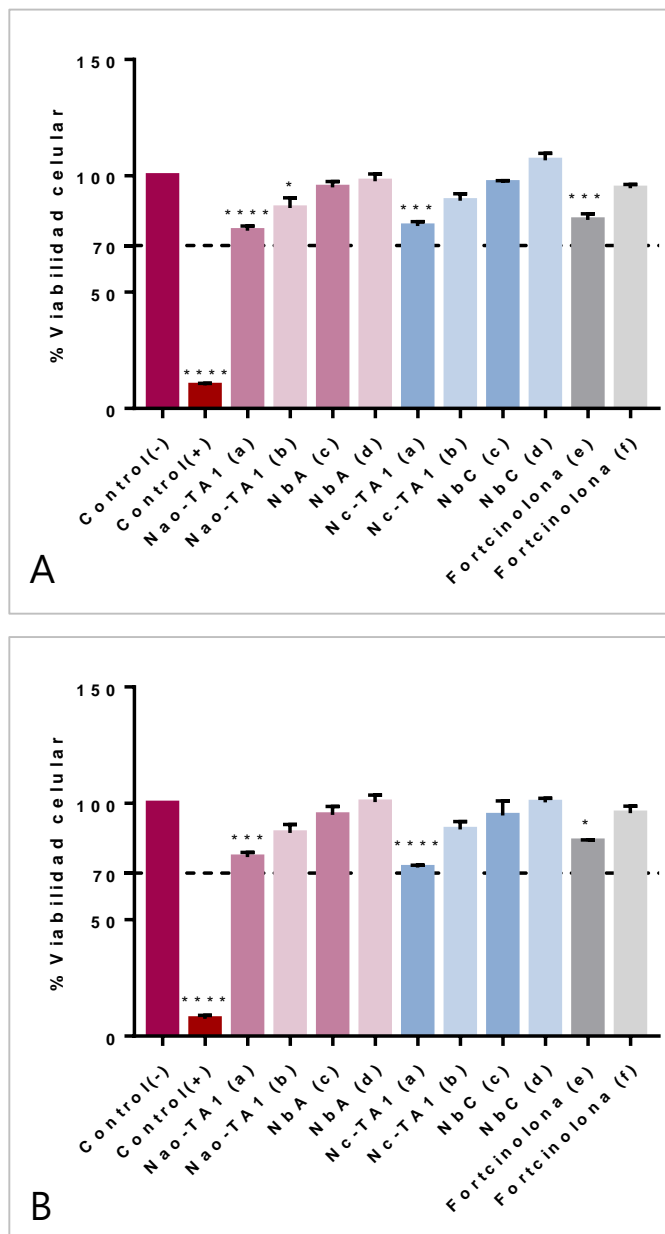


Figura 2.11. Viabilidad celular de células Epiteliales de Córnea Humana (HCE) luego de la incubación con Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetonido de Triamcinolona (NCLs-TA).

Los gráficos de barras muestran el porcentaje de viabilidad celular de HCE luego de la incubación durante (A) 30 y (B) 0 minutos, con Fenol (control positivo (+)), Nc-TA1, NbC, Nao-TA1, NbA y Fortcinolona® en concentraciones: (a)1µg/ml de TA/565µg/ml de NCLs, (b)0,1µg/ml de TA/56,5µg/ml de NCLs, (c)565 µg/ml de NCLs, (d)56,5 µg/ml de NCLs, (e)1 µg/ml de TA y (f)0,1 µg/ml de TA. Los valores fueron normalizados respecto a la viabilidad de células HCE sin tratar (control negativo (-)) en cada tiempo de estudio. Los datos se muestran como la media \pm S.E.M de tres experimentos diferentes, en cada tiempo de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA, se representan respecto al valor del control (-) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,00001$). Abreviaturas: TA (Acetonido de Triamcinolona), Nao TA1 y Nc-TA1 (NCLs-TA obtenidas por MD con un núcleo lipídico con 20% de ácido oleico o Captex® 500p, respectivamente), NbA y NbC (NCLs blanco con un núcleo lipídico con 20% de ácido oleico o Captex® 500p, respectivamente).

deshidrogenasa de estas células tratadas con 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de TA sin vehículo como se observó para células gliales humanas (Yeung *et al.*, 2004). Por el contrario, en otro estudio en células ARPE-19 realizado por Hirani y cols., no observó evidencia de toxicidad luego la incubación de las células con TA en una concentración cuatro veces superior a la determinada como tóxica por Yeung y cols (Hirani *et al.*, 2016).

Cabe destacar que, en todos los casos, las concentraciones estudiadas en los ensayos de toxicidad detallados anteriormente, están por encima de las concentraciones exploradas en el estudio de exposición de las NCLs-TA en células HCE de este Trabajo de Tesis. Además, las NCLs presentan como ventaja que durante su obtención, almacenamiento y posterior administración no es necesario el uso de co-solventes como el alcohol bencílico, presente en las formulaciones comerciales actualmente disponibles. Como se ha detallado en los hallazgos de Narayanan y cols., y Yeung y cols., la viabilidad celular de células ARPE-19 disminuye luego de la incubación del TA disperso en este vehículo.

En relación a estudios de toxicidad *in-vitro* de nanosistemas como PLFs de TA, se encontraron reportes en los cuales se evaluaron dendrímeros, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas y nanoemulsiones, entre otras. En uno de ellos se observó que dendrímeros cargados con TA presentaron un perfil de toxicidad menor respecto de TA libre en células ARPE-19 (Kambhampati *et al.*, 2015) y que, en concentraciones inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$, no mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular después de 24 horas de incubación tanto con TA libre como dendrímeros cargados con TA. Sin embargo, se observó que la TA libre precipitó en una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ y, los cristales formados se depositaron sobre las células. Los autores de este estudio, atribuyeron que la citotoxicidad de TA en esta concentración podría deberse a que el contacto directo de los cristales con la membrana celular, podría alterar la morfología de la célula y, en consecuencia, inducir su apoptosis. En el mismo sentido, en otro estudio de toxicidad de TA en células ARPE-19 (Suen y Chau, 2013) se observó una disminución de la viabilidad celular luego de su incubación con TA libre en una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, mientras que, no se observó citotoxicidad cuando las células se incubaron con nanopartículas poliméricas (conjugado de PEG y cocaprolactona) cargadas con TA (en la misma concentración). Además, se demostró que estas nanopartículas tienen

efecto en una concentración de 395 µg/ml de TA, sin afectar la viabilidad celular en otra línea celular de células de epitelio pigmentario retinal humano ("*D407 human retinal pigment epithelial cells*") (Zhou *et al.*, 2012). Por último, cabe señalar que en la misma línea celular y en células de epitelio de cornea humana, no se observó disminución de la proliferación de estas células tratadas con nanoemulsiones de TA (900 µg/ml; compuestas por una mezcla de tensioactivos no iónicos hidrogenados) ni toxicidad mediante análisis de lactato deshidrogenasa (Trinh *et al.*, 2017).

Aunque no es posible comparar directamente los hallazgos *in-vitro* de esta Tesis con los ensayos en distintas líneas celulares reportados por los autores antes mencionados, es importante considerarlos en la selección de la concentración de NCLs-TA para los ensayos de eficacia terapéutica. En este sentido, los resultados obtenidos en el estudio de MTT permiten asegurar que las dosis seleccionadas no presentan citotoxicidad en las células HCE y a su vez, están comprendidas entre un rango considerado seguro según los estudios antes mencionados (Yeung *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2006a; Suen y Chau, 2013; Kambhampati *et al.*, 2015; Trinh *et al.*, 2017).

2.4.6-Eficacia terapéutica *in-vitro* de las NCLs-TA

La evaluación de la eficacia terapéutica es uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de nuevas PLFs ya que conforma el eje central de la obtención de las mismas. En este sentido, además de determinar que las NCLs-TA presentan propiedades coloidales estables, y presentaron un alto porcentaje de viabilidad celular en estudios *in-vitro*, resultó de particular interés evaluar si las mismas tienen propiedades antiinflamatorias.

Para evaluar la eficacia terapéutica de NCLs-TA, se utilizó un modelo de inflamación *in-vitro* desarrollado por Enríquez de Salamanca y cols. en una línea de células epiteliales de la conjuntiva humana (Enríquez-de-Salamanca *et al.*, 2008) y luego adaptado en células HCE. Este modelo se basa en la secreción diferencial de citocinas en respuesta a citocinas pro-inflamatorias que contribuyen en el proceso de inflamación de la superficie ocular. En el mismo, se induce la secreción de citocinas luego de ser estimuladas ante la exposición de TNF- α , y se mide la

secreción de la citocina inflamatoria IL-6 en el sobrenadante de las células dado que es una de las principales interleuquinas involucradas en las condiciones experimentales definidas en el modelo.

En este trabajo, se evaluó la capacidad antiinflamatoria de Nao-TA1, Nc-TA1, sus correspondientes NCLs blanco (NbA y NbC, respectivamente) y Fortcinolona[®] en células HCE a través de la medida de la secreción de la IL-6 en respuesta a TNF- α . En la *Figura 2.12*, se puede observar un gráfico de barras en el cual se representan los valores normalizados de IL-6 del sobrenadante correspondiente a células HCE previamente estimuladas con TNF- α luego de los tratamientos mencionados y; en relación a los correspondientes al sobrenadante de células HCE previamente inducidas con TNF- α y no tratadas (control positivo). Como control negativo o células control, se utilizaron células HCE no inducidas con TNF- α y no tratadas.

Los resultados mostraron que en todos los casos de tratamiento con NCLs blanco, se observa un aumento significativo de la secreción de IL-6 tanto frente a las células control como al control positivo. Probablemente, al agregar una sustancia extraña a una célula previamente estimulada con una citocina pro-inflamatoria, podría exacerbar la respuesta relacionada a la liberación de citocinas. El aumento de secreción de mediadores pro-inflamatorios luego de la administración de nanopartículas ha sido ya observado con otras nanopartículas lipídicas (Beloqui *et al.*, 2016) resaltando la importancia de evaluar el comportamiento de las mismas cuando interactúan con el sistema inmune. Además, se ha examinado el impacto de los surfactantes sobre la viabilidad y la producción de citocinas en líneas celulares de macrófagos, ya que son importantes componentes que definen la superficie las nanopartículas (Scholer *et al.*, 2001). A su vez, las propiedades inmunomoduladoras de los nanosistemas basados en lípidos ha sido discutido por otros autores, y al igual que el uso de transportadores de esta naturaleza como inmunosupresores o inmunomoduladores (Landesman-Milo y Peer, 2012; Beloqui *et al.*, 2016).

La formulación comercial Fortcinolona[®] disminuye significativamente ($p < 0,0005$) la inflamación frente a ambos controles en una concentración de TA de 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que no tiene ningún efecto a concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. En cuanto a las NCLs-TA, tanto las Nao-TA1 en ambas concentraciones de TA

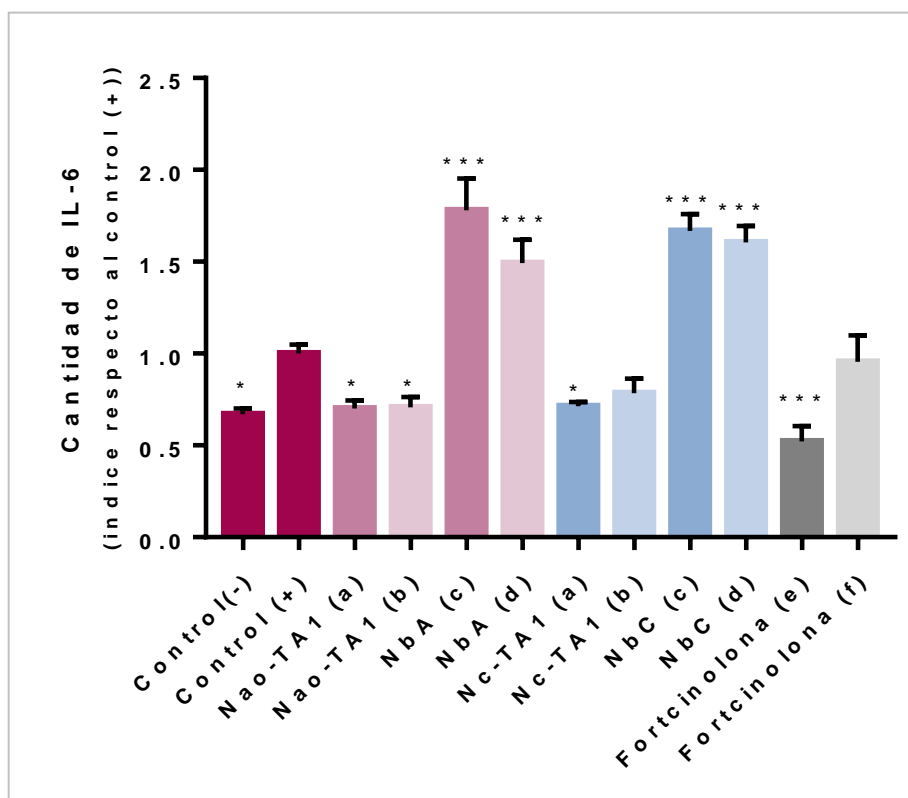


Figura 2.12. Efecto de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Acetónido de Triamcinolona (NCLs-TA) sobre la secreción de interleuquina 6 (IL-6)

El gráfico de barras muestra los valores normalizados de la cantidad de IL-6 secretada por las células HCE estimuladas con TNF- α en relación a células HCE estimuladas y no tratadas (Control positivo, (+)), luego de la incubación durante 60 minutos con Nc-TA1, NbC, Nao-TA1, NbA y Fortcinolona® en concentraciones: (a)1 μ g/ml de TA/565 μ g/ml de NCLs, (b)0,1 μ g/ml de TA/56,5 μ g/ml de NCLs, (c)565 μ g/ml de NCLs, (d)56,5 μ g/ml de NCLs, (e)1 μ g/ml de TA y (f)0,1 μ g/ml de TA. Como control negativo (-) se utilizaron HCE no estimuladas ni tratadas. Los datos se muestran como la media \pm S.E.M de tres experimentos (n=3) independientes. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se representan respecto al valor del control (+) (* p <0,05; *** p <0,0005, **** p <0,00005).

Abreviaturas: TA (Acetónido de Triamcinolona), Nao TA1 y Nc-TA1 (NCLs-TA obtenidas por MD con un núcleo lipídico con 20% de ácido oleico o Captex® 500p, respectivamente), NbA y NbC (NCLs blanco con con un núcleo lipídico con 20% de ácido oleico o Captex® 500p, respectivamente).

estudiadas como las Nc-TA1 a concentración 1 μ g/ml reducen significativamente (p <0,05) la secreción de IL-6 a en comparación al control positivo. Sin embargo, no se observó efecto sobre la secreción de Nc-TA1 a concentración de TA de 0,1 μ g/ml. En el caso de las NCLs-TA, no se observa una exacerbación de la respuesta luego de

la administración de partículas extrañas a células previamente estimuladas con citocinas pro-inflamatorias como la observada para las NCLs blanco, debido a la acción de TA.

Estudios realizados por otros autores mostraron resultados comparables con los obtenidos en este trabajo. En este sentido, en un estudio realizado por Hirani y cols., se observó una reducción significativa de la secreción de VEGF en células ARPE-19 luego del tratamiento con nanopartículas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) cargadas con TA y con TA libre (100 μ M) luego de 72 y 12 horas de tratamiento, respectivamente (Hirani *et al.*, 2016). La diferencia entre los tiempos a los cuales se observó el efecto, podría deberse a las propiedades de liberación prolongada de estas nanopartículas cargadas con TA.

La eficacia antiinflamatoria de diferentes plataformas nanométricas cargadas con TA han sido evaluadas en modelos de inflamación *in-vitro* e *in-vivo*. En uno de ellos, dendrímeros cargados con TA mostraron actividad antiinflamatoria superior (100 veces) a TA libre medida en un modelo con células de microglia, y en la supresión de la producción de VEGF en células de epitelio pigmentario hipóxicas (Kambhampati *et al.*, 2015). En otro modelo de inflamación celular, se utilizaron células microgliales murinas pro-inflamatorias inducidas con lipopolisacárido y se trataron con TA libre o nanopartículas de quitosano modificado con ácido desoxicólico cargado con TA durante un período de 12 horas. La TA libre inhibió la producción de TNF- α de manera dependiente de la dosis, alcanzando una diferencia significativa con el tratamiento de la dosis más alta de TA (100 μ g/ml) a las 24 horas posteriores. Por otra parte, se observó una reducción significativa de la producción de TNF- α luego del tratamiento con las nanopartículas y, además, propiedades antiinflamatorias superiores, y un grado de supresión del TNF- α mayor a concentraciones bajas de nanopartículas de TA en comparación con TA libre (Zhou *et al.*, 2012).

En un modelo *in-vivo* de uveítis inducida por endotoxinas, se observó una tendencia de reducción similar para cuatro marcadores inflamatorios en animales tratados con nanopartículas poliméricas cargadas con TA, el cual fue significativamente diferente al tratamiento con micropartículas de TA y acetato de prednisolona (Sabzevari, *et al.*, 2013). Además, en otro trabajo de los mismos

autores, observaron un mayor efecto antiinflamatorio para las nanopartículas poliméricas de TA en comparación con las micropartículas de acetato de prednisona y TA, y un efecto igual comparado con la inyección subconjuntival de TA en términos de inhibición de la inflamación y los mediadores inflamatorios (Sabzevari *et al.*, 2013).

En todos los casos hasta aquí reportados, se muestra que los diferentes sistemas son capaces de inhibir alguna molécula mediadora implicada en el proceso de inflamación o disminuir la secreción de VEGF. Los resultados de estos estudios demuestran que las nanopartículas pueden utilizarse para mejorar el perfil de administración del TA libre o mantener el efecto antiinflamatorio por más tiempo, respaldando la hipótesis que las mismas pueden considerarse como PLFs promisorias para el tratamiento de enfermedades del segmento posterior que presentan angiogénesis. Al mantener el efecto por más tiempo permitiría optimizar el esquema terapéutico, disminuyendo la frecuencia de administración del fármaco y aumentando la adherencia del paciente al tratamiento.

Cabe señalar que, si bien se podrían haber seleccionado otras líneas celulares que presenten mayor capacidad inflamatoria, se utilizó el modelo de inflamación en células HCE debido a que el mismo ha sido ampliamente caracterizado y, además, permite la evaluación en células oculares. En este sentido, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo y los reportes bibliográficos, se puede inferir que las NCLs-TA presentan capacidad de reducir la secreción de mediadores inflamatorios en células oculares e inferir que serían potencialmente eficaces en el tratamiento de inflamaciones oculares.

2.5-CONCLUSIONES PARCIALES

Teniendo en cuenta las limitaciones que TA presenta en relación a la obtención de formas farmacéuticas y los inconvenientes asociados a su administración intravítrea, los objetivos de este Capítulo fueron satisfactoriamente alcanzados.

En ese sentido, luego del análisis y discusión de los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones parciales:

- *La optimización de la formulación original de NCLs con el reemplazo de su núcleo lipídico con un 20% de ácido oleico o 20% de Captex 500p permitió la obtención de PLFs nanométricas con propiedades fisicoquímicas adecuadas que permitieron el cargado de TA. Las formulaciones resultaron estables en el tiempo.*
- *El MD resulto ser el método de incorporación del TA que permitió lograr una mayor capacidad de carga de fármaco en las NCLs.*
- *En las NCLs-TA, el fármaco esta ubicado en parte en el núcleo lipídico y, en parte en la capa rígida de surfactantes.*
- *Las NCLs-TA se consideran no citotóxicas en células HCE a las concentraciones estudiadas en este Trabajo de Tesis.*
- *Las NCLs-TA mostraron reducción de la secreción de IL-6 en el modelo de inflamación en células HCE, a partir del cual se puede inferir que presentan propiedades antiinflamatorias.*

En base a esto, las NCLs pueden constituir una estrategia prometedora para la vehiculización de TA y la optimización de los tratamientos derivados con este fármaco, respaldando la hipótesis planteada.

A fin de corroborar los hallazgos obtenidos en los ensayos, como perspectiva de este Trabajo de Tesis, se propone avanzar en ensayos de toxicidad y eficacia terapéutica en modelos animales.

CAPÍTULO 3

DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE BEVACIZUMAB

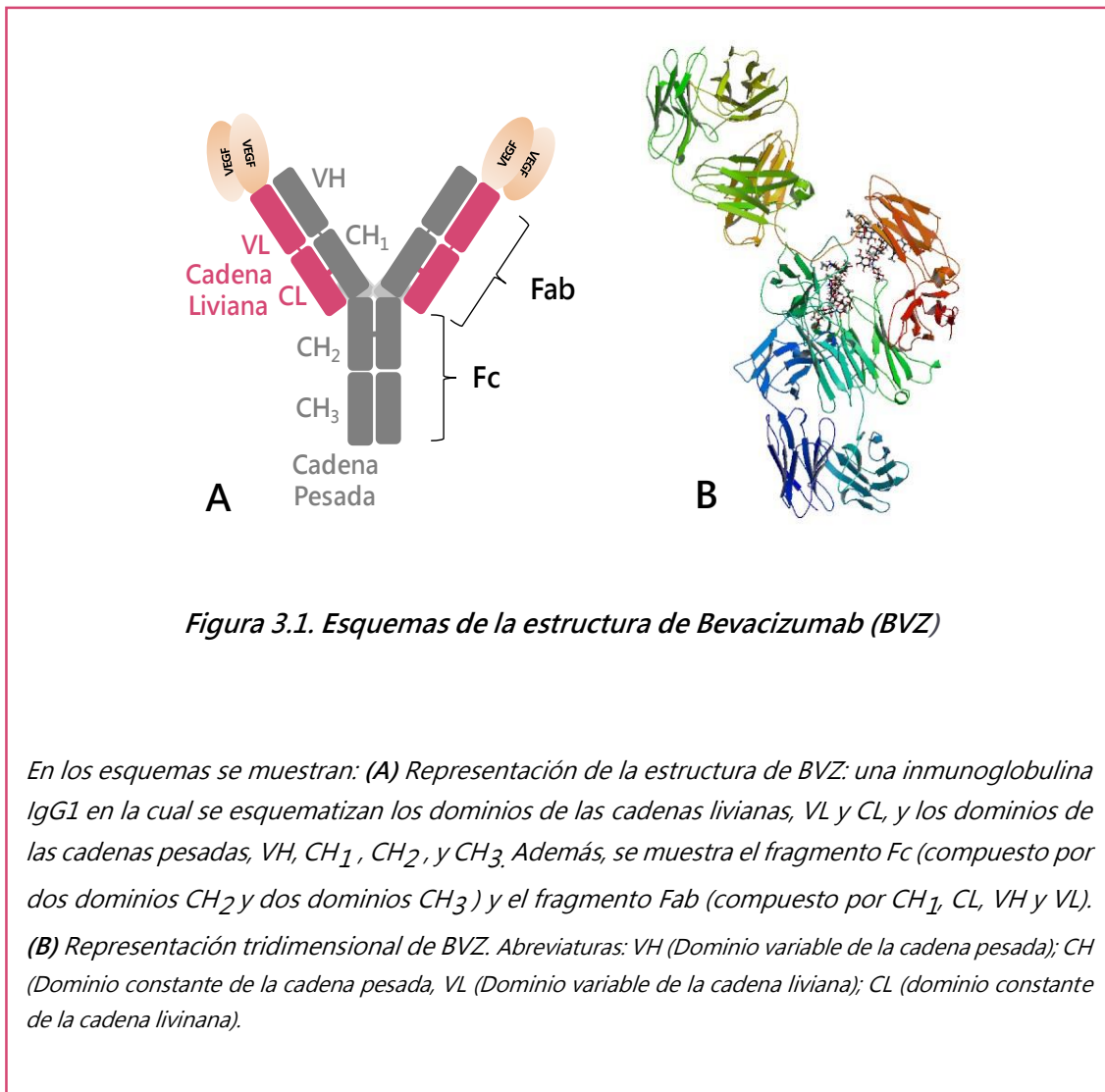


Capítulo 3 : DISEÑO, DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCAPSULAS LIPÍDICAS DE BEVACIZUMAB

3.1-MARCO DE REFERENCIA

El Bevacizumab (BVZ) es un anticuerpo (Ac) monoclonal humanizado completo de isotipo IgG1, producido por un sistema de expresión de células de ovario de hámster chino (glicosilada) que posee un peso molecular (PM) de 149 kDa (*Figura 3.1*). La molécula de IgG1 está formada por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Aproximadamente, cada cadena pesada tiene 450 residuos mientras que cada cadena liviana tiene 220 residuos (Ionescu *et al.*, 2008). El BVZ deriva del mismo precursor que Ranibizumab (RNZ), y, contiene regiones estructurales humanas y las regiones determinantes de la complementariedad de un Ac murino con dos sitios de unión al Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) humano para inhibir su actividad (Steinbrook, 2006; Kovach *et al.*, 2012).

El BVZ es comercializado por laboratorios Roche® con el nombre de Avastin® y fabricado por Genentech, Inc. y, fue diseñado para ser administrado mediante perfusión intravenosa para el tratamiento del cáncer metastásico de colon o recto. Antes de que la FDA aprobara el RNZ (Lucentis®, Genetech), el BVZ se comenzó a utilizar para tratar pacientes con Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) húmeda u otras enfermedades coriorretinianas en las cuales el VEGF es una de las principales moléculas involucradas en el proceso de angiogénesis (Rosenfeld, 2006; Steinbrook, 2006). Hasta el momento, la administración ocular de BVZ es considerada completamente “fuera de indicación” o de modo “*off-label*” (Kovach *et al.*, 2012) ya que su uso en patologías oculares no está oficialmente autorizado. Además, este Ac tiene un costo considerablemente menor que RNZ cuando se administra como inyección intraocular (Steinbrook, 2006; Real, 2016).



En este sentido, existe un extenso debate sobre la superioridad de RNZ o BVZ en el tratamiento de la DMAE. Por un lado, se considera que el RNZ sería más efectivo a corto plazo, basándose en que este fragmento de Ac es una molécula más pequeña (48,39 kDa) y, por lo tanto, tiene mayor posibilidad de permear las capas de la retina e inhibir la angiogénesis. Por el contrario, el BVZ sería superior en efectividad a largo plazo debido a que por su tamaño más grande tendría un menor grado de eliminación desde la cavidad ocular, y una elevada acumulación en las células del epitelio pigmentario de la retina (Chang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

Aunque el BVZ no está aprobado para su administración intraocular, los resultados de diferentes ensayos demuestran que cuando este Ac se administra por

vía intravítrea, se logran beneficios más próximos al efecto de RNZ que, aquellos obtenidos con la terapia fotodinámica y el pegaptanib que presentan menor efecto. La principal desventaja de la administración intravítrea de BVZ esta relacionada a la necesidad de dosis repetidas (mensuales), que condicionan el tratamiento de enfermedades oculares neovasculares (Steinbrook, 2006). En consecuencia, prolongar el tiempo de residencia de este Ac en el interior del ojo tendería a optimizar su tratamiento debido a que la frecuencia de inyecciones oculares disminuiría, impactando en una mayor adherencia al tratamiento por parte de los pacientes. Debido a esto y a su bajo costo respecto a RNZ, resulta de particular interés desarrollar formas farmacéuticas de BVZ que permitan un mayor tiempo de residencia de la molécula en la cavidad ocular.

Las terapias basadas en Acs tienen efectos terapéuticos a través de una serie de mecanismos que incluyen la alteración de la función del antígeno o del receptor y la señalización correspondiente, induciendo la citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad dependiente de Acs. Más allá de que existen más de 20 Acs monoclonales aprobados para uso terapéutico, se requiere un mayor desarrollo para aumentar su eficacia y reducir su toxicidad (Parslow *et al.*, 2016). Distintas formulaciones mixtas de Acs y fármacos, combinan la capacidad de “enlazar” una carga útil de fármaco con un Ac monoclonal que reconoce específicamente un antígeno de superficie celular y, de esta manera, permite suministrar esa carga de fármaco directamente a la célula diana. Esta estrategia se conoce como “vectorización activa” . De la misma manera, formulaciones de nanopartículas y Acs, combinan los beneficios de la nanotecnología para acceder al sitio de acción y aquellos relacionados al reconocimiento del antígeno específico por parte del Ac. Resultados promisorios involucran nanopartículas y BVZ en el tratamiento de cáncer (Srinivasan, 2013; Battaglia *et al.*, 2015) y en el tratamiento de neovascularizaciones (Duvvuri, 2003).

En este sentido, las Nanocapsulas Lipídicas (NCLs) son considerados sistemas capaces de transportar moléculas hidrofílicas como Ac, fragmentos de Acs o péptidos. El direccionamiento específico de estos sistemas hacia su órgano blanco y la vehiculización de moléculas hidrofílicas puede ser mejorado implementando

modificaciones en su superficie. La funcionalización de NCLs ha sido explorada como tecnología novedosa, para mejorar la especificidad y biodistribución de estos sistemas en terapias contra el cáncer mostrando resultados prometedores (Béduneau *et al.*, 2007; Bourseau-Guilmain *et al.*, 2012).

En base a los antecedentes, en este proyecto se propuso utilizar las herramientas tecnológicas mencionadas para la vehiculización de BVZ en NCLs, en procura de modular su liberación y mejorar su eficacia terapéutica en neovascularizaciones oculares. Sumado a esto, en un futuro cercano, se presume interesante disponer de una formulación de NCLs que pueda cargar en forma mixta acetónido de triamcinolona (TA) y BVZ en una misma nanopartícula. Por un lado, a nivel farmacotécnico se optimizaría la obtención de las NCLs a través de un mismo proceso, la utilización de menos recursos, y se administraría menor concentración de lípidos. Por otro lado, podría esperarse la liberación del TA en un sitio específico ya que la NCLs direccionada por BVZ tenderían a alcanzar el sitio en el cual el VEGF está presente.

Atendiendo a estas premisas, se propuso trabajar en la funcionalización de la superficie de las NCLs, mediante la inserción de un polímero bifuncional en la superficie de éstos sistemas, el cual fuese capaz de conjugarse al Ac.

En este contexto, se plantea como hipótesis que las NCLs pueden vehiculizar BVZ en su superficie mediante una funcionalización específica, lográndo una Plataforma de Liberación de Fármacos (PLFs) que permita aumentar el tiempo de residencia del Ac en su sitio de inyección. En consecuencia, el objetivo del presente Capítulo consistió en obtener, caracterizar y evaluar NCLs cargadas con BVZ (NCLs-BVZ o nanocápsulas lipídicas de bevacizumab).

Como se mencionó en el Capítulo 2, los experimentos de obtención de las NCLs se realizaron en estrecha colaboración con el Dr. Jean-Pierre Benoit en el INSERM U1066 (Angers, Francia) y su grupo de investigación, en el marco de dos estadías de doctorado financiadas con el Programa Bec.AR de "Estadías Cortas de Doctorado en Ciencia y Tecnología para Profesionales Argentinos en la República Francesa" otorgada por Jefatura de Gabinete de Ministros y Campus France; y el

Programa de becas "Saint Exupery" concedida por el Ministerio de Asuntos Exteriores y Desarrollo Internacional de la República Francesa. Los estudios experimentales funcionalización de NCLs se realizaron en colaboración con el Téc. Jérôme Bejaud mientras que la evaluación en cultivos celulares con el Dr. Samuel Legeay.

3.2-MATERIALES

3.2.1-Bevacizumab, excipientes y reactivos

El BVZ (Avastin[®]), laboratorios Roche[®], fue proporcionado por un proveedor autorizado de la Ciudad de Córdoba, Argentina.

El polímero 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000] (**DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida**) fue comprado en Avanti[®] Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA) y el 2-iminotiolano (reactivo de Traut) fue provisto por Fisher[®] (Illkirch, France). El Cloruro de Sodio (NaCl) y sales de la solución amortiguadora (*buffer*) *HEPES*, fueron proporcionadas por Prolabo[®] (Fontenay-sous-Bois, Francia) mientras que el agua ultra pura por Milli RO System (Millipore[®], Paris, Francia). La composición y obtención de Labrafac WL[®] 1349, Lipoid[®] S75-3, Solutol[®] HS 15 fue descrito en el *Capítulo 2*.

Las columnas de Sepharose[®] CL4-B y Sephadex[®] G25 fueron provistas por GE Healthcare[®] Life Sciences. Los dispositivos de ultrafiltración, Microcon[®] (30000 MWCO) y Amicon[®] (100000 MWCO), fueron suministrados por Merk Millipore[®]. Los reactivos de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por su nombre en inglés "*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*") y de *Western-blot* fueron proporcionados por Sigma-Aldrich[®].

Los reactivos de cultivo celular fueron proporcionados por Lonza[®] (Verviers, Bélgica) y Sigma-Aldrich[®] (Saint-Quentin Fallavier, Francia). El suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, fue provisto por Gibco[®]. Los demás reactivos químicos fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific[®] (Elancourt, France).

De igual modo que en el Capítulo 2, los productos mencionados serán referidos por su marca comercial en el siguiente texto.

3.2.2-Cultivo celular

Se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por su nombre en inglés "*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*") obtenidas de recién nacidos, las cuales fueron compradas en Lonza® y amplificadas en medio basal de crecimiento endotelial 2 (EBM-2, por su nombre en inglés "*Endothelial Growth Basal Medium*") conteniendo 8% de SFB a 37 °C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de dióxido de carbono. En los estudios correspondientes, las HUVEC fueron usadas entre el segundo y quinto pasaje.

3.3-MÉTODOS

3.3.1-Síntesis de NCLs-BVZ

3.3.1.1-Purificación y funcionalización del anticuerpo

El BVZ fue filtrado utilizando una columna de gel Sephadex® G25 con el objetivo de separarlo de los excipientes y sales presentes en la formulación comercial Avastin®. La columna fue equilibrada con una solución amortiguadora fosfato salina (PBS, del inglés "*Phosphate Buffered Saline*") (pH=7,4) que luego fue utilizado como eluyente. Se recolectaron 10 fracciones secuenciales de 1 ml cada una. Las fracciones que presentaron absorbancia superior a 0,5 a una longitud de onda de 280 nm, se reconcentraron utilizando tubos con filtros Microcon® (30000 MWCO) mediante centrifugación (10000 RCF, 20°C, 10 minutos).

La funcionalización del BVZ purificado con un grupo tiol, se realizó por incubación del Ac con reactivo de Traut a una concentración de 1 mg/ml en oscuridad durante una hora. Luego, el producto de reacción fue purificado en una columna de gel Sephadex® G25 para la separación del Ac tiolado del reactivo de Traut libre. El Ac se reconcentró siguiendo el procedimiento descripto anteriormente.

3.3.1.2-Síntesis de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida

Las NCLs blanco fueron obtenidas por el método de inversión de fases (PIT) descrito en el *capítulo 2* (Beatrice Heurtault *et al.*, 2002) utilizando solución *buffer HEPES* (pH=7,4) como medio acuoso de la formulación para favorecer la estabilidad del Ac relacionada al pH (*Tabla 3.1*).

Posteriormente, para vehiculizar el BVZ en las NCLs, se utilizó un método de post-inserción desarrollado por Béduneau y cols. (Béduneau *et al.*, 2007; Bourseau-Guilmain *et al.*, 2012); en el cual el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida se agregó en polvo a una suspensión de NCLs blanco para obtener una concentración final de 11 mM. A continuación, las micelas de polímero y las NCLs fueron incubadas a 60 °C durante 2 horas y luego purificadas por Cromatografía de Exclusión de Tamaño Molecular (SEC) utilizando una columna de Sepharose[®] CL4-B (estabilizada con *buffer HEPES*, pH=7,4) para separar las NCLs funcionalizadas con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (**NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida**) de las micelas compuestas por polímero libre (volumen de carga: 1-1,5 ml). Se recolectaron secuencialmente 72 fracciones de 1 ml. Las fracciones visualmente blanquecinas correspondientes a las NCLs fueron reconcentradas en tubos Amicon[®] Ultra 100K a través de ultracentrifugación (4000 rpm, 1 hora).

| Componente | (g) |
|-----------------------------------|-------|
| Labrafac [®] WL 1349. | 0,822 |
| Lipoid [®] S75-3 | 0,075 |
| Solutol [®] HS 15 | 0,846 |
| NaCl | 0,089 |
| <i>Buffer HEPES</i> (T° ambiente) | 2,960 |
| <i>Buffer HEPES</i> 0°C | 12,5 |

Tabla 3.1. Composición de las Nanocápsulas lipídicas (NCLs) blanco con buffer HEPES.

3.3.1.3-Acoplamiento de BVZ a NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida

Por último, para obtener NCLs-BVZ, se llevó a cabo una reacción de acoplamiento entre los grupos sulfidrilos del Ac tiolado y los grupos maleimida del polímero, con agitación magnética a 4 °C, durante toda la noche. Los Acs no unidos fueron separados de las NCLs-BVZ utilizando una segunda columna de Sepharose® CL4-B (equilibrada con *buffer* HEPES, pH=7,4) recolectando nuevamente 72 fracciones de 1 ml.

Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas por distintos métodos para identificar aquellas que presentaron nanopartículas, aquellas que presentaron solamente el Ac libre y aquellas que presentaron Ac libre y NCLs. Con este propósito, por un lado, se identificó la presencia de nanopartículas en las fracciones mediante mediciones turbidimétricas a 580 nm en un lector de microplaca (Multiskan Acent® , Labsystems SA, Cergy-Pontoise, Francia). Además, se hicieron medidas de Tamaño Medio de Partícula (TMP) y, se determinó la concentración de NCLs a partir de la construcción de una curva de calibrado de concentración de NCLs (0,1-66,0 mg/ml) en función de la tasa de recuento derivada (DCR, por su nombre en inglés "*Derived Count Rate*") utilizando un Malvern® AutoSizer.

Por otro lado, se determinó la presencia de proteínas en las diferentes fracciones a la misma longitud de onda luego de la incubación de alícuotas de las mismas con los reactivos de un kit Micro BCA™ en estufa (37 °C; 1,30 horas). Las fracciones en las cuales se determinaron nanopartículas y proteínas, se infirió la presencia de NCLs-BVZ y, en consecuencia, se reconcentraron utilizando tubos Amicon® Ultra (100000 MWCO) en un volumen final entre 1,0 y 1,5 ml mediante ultracentrifugación (4000 rpm, 1 hora). El proceso completo de obtención y purificación de NCLs-BVZ se esquematiza en la *Figura 3.2*.

Luego de la obtención, se evaluó la influencia de la purificación previa del BVZ en la separación de las fracciones correspondientes a NCLs-BVZ y las correspondientes a BVZ libre de la SEC. Para ello, se obtuvieron NCLs-BVZ de Avastin® y, BVZ purificado (columna gel Sephadex® G25) por comparación de la resolución de los picos cromatográficos correspondientes a NCLs-BVZ y a Ac libre.

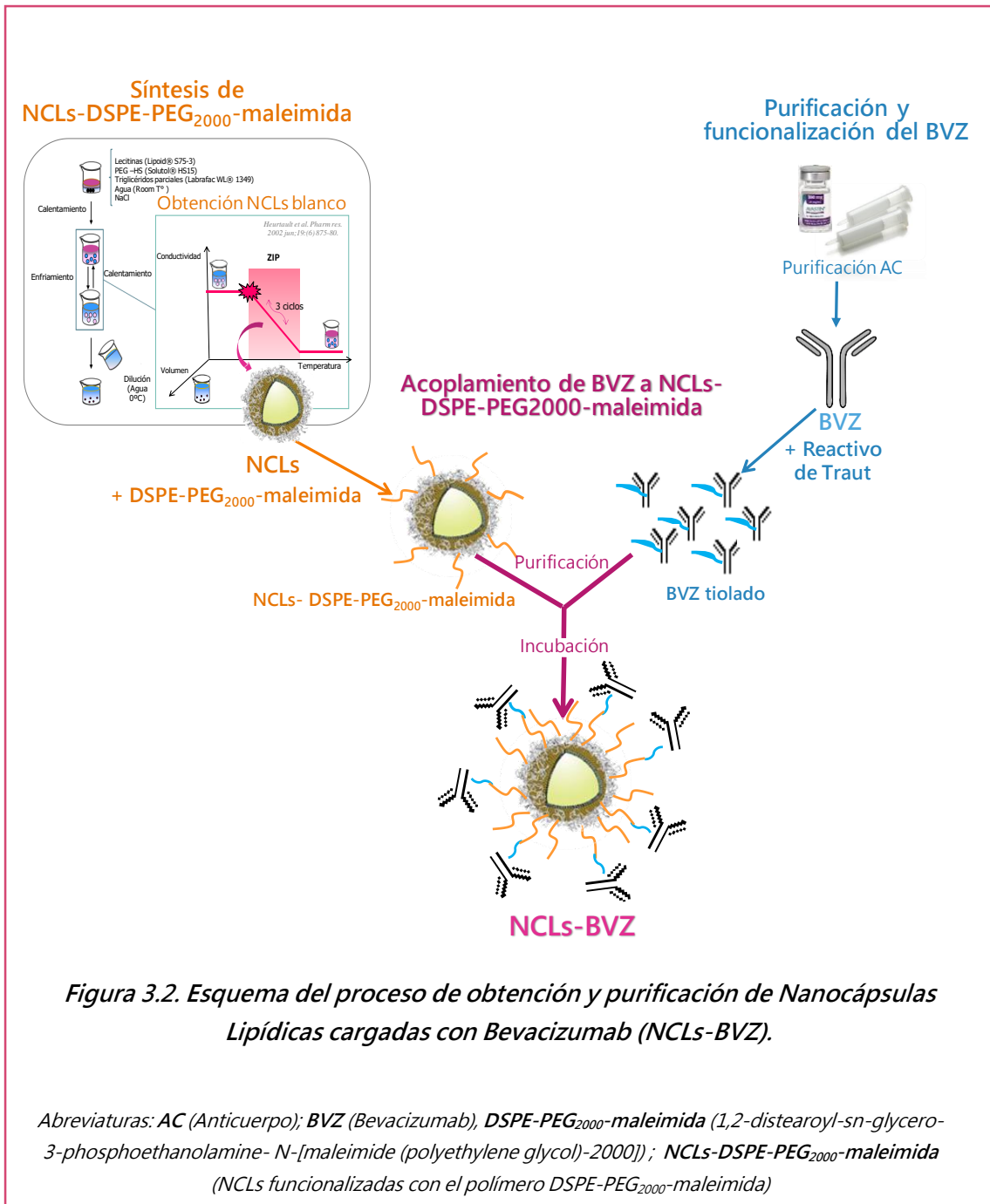


Figura 3.2. Esquema del proceso de obtención y purificación de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Bevacizumab (NCLs-BVZ).

Abreviaturas: AC (Anticuerpo); BVZ (Bevacizumab), DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[maleimide (polyethylene glycol)-2000]); NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (NCLs funcionalizadas con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida)

Ambas formulaciones de NCLs-BVZ, se prepararon a partir de 2,5 mg iniciales de Ac.

Adicionalmente, se realizaron controles para corroborar la identidad de las fracciones obtenidas en la purificación de NCLs-BVZ. Por un lado, se realizó un control para identificar las fracciones a las cuales eluye el Ac libre (Control Ac libre), realizando la elución del mismo en la columna de Sepharose® CL4-B. Por otro, se

realizó un control para corroborar la separación de NCLs y Ac libre, y estudiar si existe una interacción entre ellos distinta a la de la conjugación entre el polímero y el grupo tiol del Ac. Para ello, se preparó una mezcla física entre el Ac purificado sin tiolar y las NCLs funcionalizadas con DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y se eluyó en la columna de Sepharose[®] CL4-B (Control MF).

3.3.2-Estudios de caracterización de NCLs-BVZ

3.3.2.1-Electroforesis SDS-PAGE y *Western-blot*

La formación del enlace covalente entre el polímero insertado en las NCLs y el BVZ funcionalizado con un grupo tiol se verificó por SDS-PAGE al 7,5%. Para ello, se analizaron las NCLs-BVZ en comparación al BVZ libre, las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y a una mezcla física de los últimos dos (Control MF), en condiciones reductoras (mediante el agregado de DL-Ditiotreitol) y no-reductoras. Las muestras se prepararon tomando una cantidad equivalente a 30 µg de BVZ en un primer estudio y a 1 µg de Ac en un segundo estudio. El gel sembrado con la muestra, se expuso a electroforesis por 2 horas a 100 mÅ. Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas en una membrana nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia. La unión no específica se bloqueó con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) en *buffer* Tris con 0,01% de Tween-20. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario "*anti-mouse*" conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Finalmente, las bandas específicas se revelaron usando un kit de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific)

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de la Dra. María Cecilia Sánchez en el Departamento de Bioquímica Clínica – CIBICI (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba), con la colaboración de la Dra. María Constanza Paz.

3.3.2.2-Microcalorimetría Diferencial de Barrido

Los análisis térmicos de las NCLs-BVZ, las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y el BVZ, fueron realizados por microcalorimetría diferencial de barrido (MicroCal[®], Northampton, MA). El ensayo se realizó con una concentración de 100 µg/ml de Ac, en *buffer HEPES* a pH=7,4. El estudio fue llevado a cabo con una celda de referencia conteniendo *buffer HEPES* y una celda conteniendo la muestra a estudiar, a una presión de 2 atmósferas. Las muestras previamente fueron dializadas (30 KDa) en *buffer HEPES*. Para todos los experimentos se utilizó una velocidad de barrido de 30 °C / hora, en un rango de temperatura entre 40 °C a 120 °C.

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio del Dr. Guillermo Montich en el Departamento de Química Biológica - CIQUIBIC (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).

3.3.2.3-Propiedades fisicoquímicas

Las NCLs blanco, NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, NCLs-BVZ y las fracciones obtenidas de la elución de las nanopartículas por SEC en columna de Sepharose[®] CL4-B se caracterizaron mediante espectroscopia de correlación fotónica (ECF) en TMP, Índice de Polidispersidad (IP) y distribución de cargas utilizando un Zetasizer[®] Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). Para realizar las medidas de las NCLs blanco, NCLs funcionalizadas con DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y NCLs-BVZ, las muestras se diluyeron 1:60 (v/v) con agua desionizada (Millipore[®]).

3.3.2.4-Capacidad de acoplamiento

El cargado de NCLs se estudió a partir del cálculo del porcentaje de acoplamiento de NCLs-BVZ a partir de diferentes cantidades iniciales de BVZ (1,5 mg; 2,5 mg; 3 mg; 4 mg y 5 mg), y utilizando concentraciones constantes de polímero (11 mM) y nanopartículas (131 mg/ml). Los ensayos se realizaron por triplicado.

El cálculo del porcentaje de acoplamiento de BVZ a las NCLs, se realizó por diferencia entre la cantidad inicial de BVZ y la cantidad de Ac libre cuantificado por Micro BCA™, presente en las fracciones obtenidas en la SEC en las cuales no hay presencia de NCLs.

3.3.2.5-Capacidad de unión de NCLs-BVZ a VEGF.

La capacidad del BVZ para unirse al VEGF luego del cargado en las NCLs, se evaluó utilizando un Kit ELISA específico (SHIKARI Q-BEVA® , Matriks Biotechnology Co. Ltd., Turkey). Se evaluaron por triplicado las NCLs-BVZ obtenidas a partir de 1,5 mg; 2,5 mg y 3mg iniciales de BVZ.

El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las soluciones estándar de BVZ y las muestras de NCLs-BVZ fueron diluidas con el buffer proporcionado por el kit (relación 1:100 y 1:5000, respectivamente) e incubados en una placa de microtitulación previamente cubierta con VEGF humano, a temperatura ambiente (18-25 °C), durante 1 hora. Después de 3 lavados con *buffer* de lavado suministrado por el kit, se agregó una biotina unida a VEGF humano y la placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos fueron lavados con buffer de lavado y luego, incubados con streptavidina conjugado con la enzima *Horsedish peroxidasa*, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, los pocillos se lavaron con *buffer* 3 veces y la actividad enzimática se detectó mediante la incubación con una solución sustrato TMB (3,3' ,5,5' –tetrametilbenzidina), a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de una solución *TMB stop* y los componentes fueron mezclados rápidamente por agitación de la placa. Por último, se midió la absorbancia del producto de reacción a 450 nm en un lector de microplaca (Multiskan® Ancent).

3.3.3-Estudio del efecto antiangiogénico *in-vitro* de NCLs

Las HUVEC se sembraron en una densidad de 10000 células por pocillo, los cuales fueron previamente recubiertos con matriz celular de gel (ECM, por su nombre en inglés "extracellular matrix") reducida en factor de crecimiento (Sigma–Aldrich®) conocida como Matrigel®. Brevemente, 10 µl de ECM se adicionó a una placa para angiogénesis de 15 pocillos (Ibidi®, Biovalley®), y se dejó solidificar aproximadamente 30 minutos a 37 °C. Luego, las células se incubaron en EBM-2, sin factores de crecimiento conteniendo un 8% de SFB y el tratamiento correspondiente.

Por un lado, se estudio el efecto de NCLs-BVZ obtenidas a partir de 1,5mg; 2,5 mg y 3 mg iniciales de BVZ; en la formación de túbulos de células HUVEC. A continuación, se estudio este efecto luego del tratamiento con Avastin® y NCL-BVZ obtenidas a partir de 2,5 mg iniciales de Ac y Avastin®, en concentraciones de 0,5 y 2 µM. Células HUVEC no tratadas se utilizaron como control (Control negativo, células control).

Por otro lado, se estudió el efecto de Avastin® y NCL-BVZ obtenidas a partir de 2,5 mg iniciales de Ac y Avastin®, en concentraciones de 0,5 y 2 µM; sobre la formación de vasos sanguíneos en presencia de VEGF (20 ng/ml).

Para todos los experimentos, la formación de vasos sanguíneos fue examinada por microscopía (EVOS® Microscope) luego de 24 horas de incubación. Cada ensayo se realizó por duplicado, utilizando un N=3. La formación de túbulos se examinó mediante microscopía de contraste de fase y se cuantificó el número total de puntos de ramificación utilizando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Los datos fueron expresados como la media ± error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y, se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 7.

3.3.4-Estudios de obtención de NCLs cargadas con TA y BVZ

Se realizaron estudios preliminares para la obtención de una formulación de NCLs combinada, conteniendo TA en el interior y BVZ acoplado en su superficie, explorando dos metodologías diferentes de preparación.

Por un lado, mediante la primera metodología, se estudió la post-inserción del polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida en las NCLs cargadas con TA con un núcleo lipídico con 20% de ácido oleico obtenidas por el método directo (MD) de incorporación del TA (Nao-TA1). Para ello, primero se obtuvo la formulación Nao-TA1, según la metodología detallada en apartado *"2.3.2.2-Obtención de NCLs-TA"* del Capítulo 2, y luego, se realizó la post-inserción del polímero en esta formulación mediante el método descrito en el apartado *"3.3.1.2-Síntesis de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida"*, del presente Capítulo.

Por otro lado, mediante la segunda metodología, se exploró la obtención de la formulación combinada por un nuevo método, el "método de inversión de fases e inserción en un solo paso". Brevemente, la fórmula de Nao-TA1 se modificó adicionando el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida en una concentración de 5%, y a continuación se iniciaron los ciclos de calentamiento/enfriamiento correspondientes al método al PIT (Beatrice Heurtault *et al.*, 2002). A continuación, se llevó a cabo el acoplamiento de BVZ (2,5 mg) previamente purificado de la formulación comercial y tiolado de acuerdo al procedimiento experimental del apartado *"3.3.1.1-Purificación y funcionalización del anticuerpo"* del presente Capítulo.

Las formulaciones obtenidas por ambas metodologías se purificaron por SEC utilizando una columna de Sepharose[®] CL4-B (detallada en el apartado *3.3.1.3-Acoplamiento de BVZ a NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida* del presente Capítulo), y el contenido de TA se cuantificó por HPLC de acuerdo a la técnica descrita en el Capítulo 2 en el apartado *"2.3.3.4-Capacidad de Carga y Eficiencia de Encapsulación"*.

3.3.5-Estudio de activación del sistema del complemento

El consumo de complemento en suero normal humano (SNH) (Kabat y Mayer, 1991) se evaluó midiendo la capacidad hemolítica residual del sistema del complemento después del contacto con diferentes NCLs (Vonarbourg *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2012). La técnica consiste en determinar la cantidad de suero capaz de lisar el 50% de un número fijo de eritrocitos de oveja sensibilizados con Acs de eritrocitos de conejo anti-oveja (CH50) (Passirani *et al.*, 1998), según el procedimiento descrito por Vonarbourg y cols. (Vonarbourg *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2012).

El ensayo fue llevado a cabo utilizando VBS (tampón salino Veronal por su nombre en inglés “*Veronal buffered saline*”) y VBS²⁺ (VBS conteniendo 0,15 mM Ca²⁺ y 0,5mM Mg²⁺), preparados según un protocolo descrito por Kazatchkine y cols. (Kazatchkine MD, Hauptmann G, 1986). El SNH se obtuvo a partir de 40 dadores de sangre proporcionando por el Establecimiento Francés de sangre del Centro Hospitalario Universitario (Angers, Francia) y, fue fraccionado y conservado a -80°C hasta su uso. Los eritrocitos de oveja (Biomérieux, Marcy-l’ Etoile, Francia) fueron sensibilizados con Acs anti-eritrocitos de oveja obtenidos a partir de conejos (hemolytic serum, Biomérieux) para activar el sistema del complemento por la vía clásica, y luego, llevados a una dilución final de 1:800 (v/v) en VBS²⁺. Los eritrocitos de oveja activados fueron preparados a una concentración final de 1x10⁸ células/ml en VBS²⁺ (Ullio-Gamboa, 2014).

Se evaluaron las siguientes formulaciones:

- NCLs blanco originales de 50 nm (**Nb**) (Heurtault *et al.*, 2002);
- NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica (**NbA-20**) obtenidas de acuerdo a la metodología del apartado *2.3.2.1-Obtención de NCLs blanco optimizadas para el cargado de TA del capítulo 2;*
- NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica cargadas con TA (**Nao-TA1**), según la metodología detallada en apartado *“2.3.2.2-Obtención de NCLs-TA” del Capítulo 2;*

- *NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida* insertado en su superficie (**Nbao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida**), las cuales se obtuvieron mediante la inserción de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (de acuerdo a la metodología descrita en *3.3.1.2-Síntesis de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida*”, del presente Capítulo) sobre las Nb-A20.
- La formulación combinada, obtenida por la metodología de un solo paso: NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida cargadas con TA y con BVZ acoplado en su superficie (**Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ**).

Para evaluar el consumo de las unidades de CH50 en presencia de las nanopartículas, se agregaron cantidades crecientes de suspensiones de las diferentes NCLs al SNH y se diluyeron en VBS²⁺ de manera de obtener una dilución final de SNH en la mezcla de reacción en una relación 1:4 v/v, en un volumen final de 1 ml. Las suspensiones se incubaron a 37 °C, con agitación suave durante un período de tiempo preestablecido (60 minutos) para permitir la interacción entre los componentes del suero y los componentes de las NCLs. A continuación, la reacción se detuvo por la adición de una solución de NaCl fría (0,15 M) y la suspensión se centrifugó (10 minutos, 55 G), para obtener un depósito de los eritrocitos sin lisar. La densidad óptica (DO) del sobrenadante (200 µl), relativa a la capacidad lítica del suero, se midió a 415 nm mediante un lector de placa (Multiskan Acent[®]). La cantidad de unidades de CH50 remanentes en el suero fueron determinadas y comparadas con los resultados obtenidos con el suero control. Los controles positivos y negativos fueron usados en cada serie de experimentos para corregir cualquier diferencia en la respuesta de hemoglobina a partir de un dado preparado de eritrocitos. Tanto la dispersión de luz ocasionada por las partículas como la hemólisis espontánea de los eritrocitos fue corregida usando sólo partículas y eritrocitos como blancos. Finalmente, se comprobó que la presencia de una solución de PEG o la presencia de partículas sin suero, no conduzcan a la hemólisis

de los eritrocitos de oveja sensibilizados dentro del rango de concentraciones utilizadas en el ensayo.

Los resultados se expresaron en términos de unidades CH50, es decir, las diluciones de suero a las que ocurre el 50% de la hemolisis, y son calculadas por un ajuste lineal de una versión log-log de la ecuación de Von Krogh (Kazatchkine MD, Hauptmann G, 1986). Una alternativa es expresar el porcentaje de unidades de consumo de CH50 relativas a un control negativo, según la *Ecuación 3.1*:

$$\text{Consumo (\%)} = \frac{(CH50_{muestra} - CH50_{control})}{CH50_{control}} \times 100$$

Ec. (3.1)

Para comparar partículas de diferente tamaño, el consumo del complemento se graficó como una función del área superficial. Las superficies de las nanopartículas se calcularon, como fue descrito anteriormente por Passirani y cols. (Passirani *et al.*, 1998; Vonarbourg *et al.*, 2006), utilizando la *Ecuación 3.2 a*:

$$S = n4\pi r^2$$

Ec. (3.2a)

y la *Ecuación 3.2 b*.

$$V = \frac{4}{3}r^3$$

Ec. (3.2b)

El ordenamiento de las *ecuaciones 3.2a* y *3.2b*, conducen a la *Ecuación 3.3*.

$$S = 3 \frac{V}{r} = 3m/r\rho$$

Ec. (3.3)

donde S es el área de la superficie (cm²) y V el volumen (cm³) de una esfera de radio r (cm), masa m (μg) y de densidad ρ (μg/cm³).

Además, se llevó a cabo un ensayo empleando una solución de 1,5 Mm de etilenglicol bis (2-aminoetil éter)-N,N,N,N- ácido tetra acético/Mg²⁺ (EGTA/Mg²⁺)

que actúa como inhibidor de la vía clásica quelando los iones Ca^{2+} (Liu, Song y Liu, 1995; Vonarbourg *et al.*, 2006).

3.4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1-Obtención y purificación de NCLs-BVZ

La obtención de NCLs-BVZ se basó en la conjugación entre el grupo maleimida del polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, insertado en la capa de surfactantes de las NCLs, con el grupo tiol del BVZ funcionalizado.

En este sentido, se conoce que la mayoría de los métodos de conjugación implican residuos nucleofílicos, mientras que otros utilizan técnicas especiales de ingeniería genética para introducir especies electrofílicas como aldehídos o cetonas (McCombs y Owen, 2015). La reacción entre una maleimida con un grupo tiol, se encuentra entre las estrategias más aplicadas para la conjugación de cisteínas, aunque también, la formación de un puente de disulfuro por oxidación con un enlazador que posea un grupo sulfidriolo es frecuentemente utilizada.

Además, cabe destacar que, la mayoría de los complejos de Acs unidos a polímeros, fármacos o nanopartículas, se basan en estructuras IgG1 que contienen múltiples sitios nativos para la conjugación, y que por lo tanto, son modificados para incluir sitios reactivos adicionales (Chari, 2008; McCombs y Owen, 2015). Esta estrategia fue utilizada con el objetivo de funcionalizar el BVZ y, luego, conjugarlo al grupo maleimida del polímero insertado en las NCLs.

A continuación, se presentan los resultados correspondientes al proceso de obtención de las NCLs-BVZ y aquellos relacionados al proceso de purificación de las mismas.

3.4.1.1-Obtención de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y NCLs-BVZ

El proceso de obtención de NCLs-BVZ implicó varias etapas. Entre las primeras se encuentran, por un lado, la obtención de NCLs blanco y la post-

inserción del polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida sobre la superficie de las mismas y, por otro, la purificación del BVZ desde su formulación comercial de Avastin[®] y, su posterior funcionalización.

En cuanto a los resultados de la inserción del polímero, las NCLs blanco con buffer HEPES obtenidas por método PIT, mostraron un TMP de (54±1) nm, un IP de 0,037 y un PZ de (-6 ± 1) mV mientras que, las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida obtenidas por el método de la post-inserción, mostraron un TMP de (64±1) nm, un IP de 0,052 y un PZ (-37±1) mV. La inserción satisfactoria del polímero en la superficie de las NCLs, se puede evidenciar a partir del mayor TMP de las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida respecto a las NCLs blanco convencionales y, del cambio producido en el PZ.

A continuación de la obtención de las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, se acopló el Ac funcionalizado y, se obtuvieron NCLs-BVZ. Las propiedades de estas nanopartículas serán detalladas en secciones posteriores.

3.4.1.2-Purificación de NCLs-BVZ

En relación, al proceso de purificación de las NCLs-BVZ, se estudió como influencia la purificación previa del BVZ en la separación de las fracciones correspondientes a NCLs-BVZ y las correspondientes a BVZ libre de la SEC. Para ello, se obtuvieron NCLs-BVZ a partir de Avastin[®] y, BVZ purificado (columna gel Sephadex[®] G25) y se compararon los cromatogramas obtenidos. Los mismos se pueden observar en la *Figura 3.3*. Se contruyeron a partir de las medidas de la densidad óptica a 580 nm (DO580) de las fracciones para identificar NCLs (representadas en el gráfico como NCLs), y las medidas a la misma longitud de onda luego del ensayo de Micro BCA[™] para identificar la presencia de proteínas (representadas como "proteínas").

Los resultados mostraron una mejor resolución entre el pico cromatográfico correspondiente a las fracciones en las cuales las NCLs-BVZ están presentes, del pico correspondiente a las fracciones en las cuales está presente solo el Ac libre,

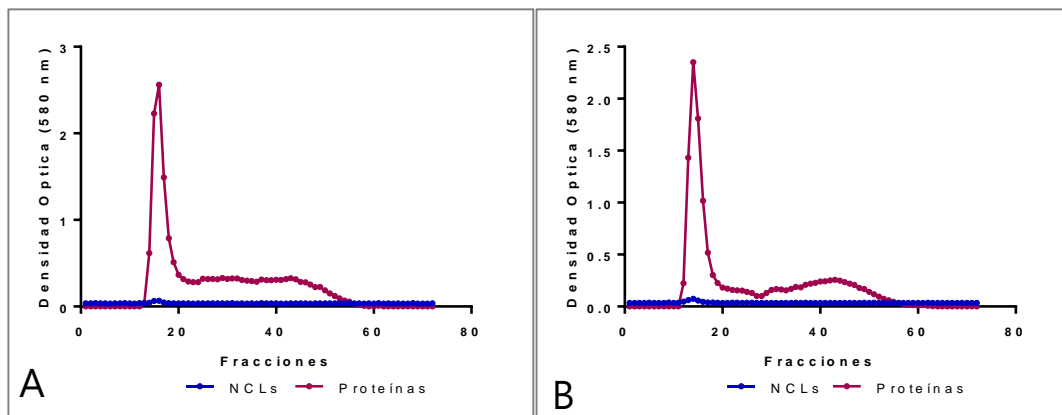


Figura 3.3. Cromatogramas de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Bevacizumab (NCLs –BVZ) obtenidas por cromatografía de exclusión de tamaño molecular (SEC), formuladas a partir de Avastin® y bevacizumab (BVZ) purificado.

Los gráficos de líneas muestran la densidad óptica a 580 nm de las fracciones obtenidas luego de la purificación de NCLs-BVZ formuladas a partir de (A) Avastin® y (B) BVZ previamente purificado. Las líneas de la serie “NCLs” y, de la serie “Proteínas” corresponden a los resultados obtenidos antes y después del ensayo de Micro BCA™, respectivamente.

cuando las NCLs son obtenidas a partir de BVZ purificado previamente con una columna de Sephadex®. Las medidas de la DO580 de las fracciones mostraron presencia de nanopartículas entre las fracciones (10±2) y (20±2) mientras que las medidas realizadas luego del ensayo de Micro BCA™, mostraron presencia de proteínas entre las fracciones (11±2) y (56±2). Si bien los valores de DO580 antes del ensayo de Micro BCA™ son bajos, las fracciones con NCLs pueden ser identificadas.

A su vez, se determinaron el TMP de las diferentes fracciones provenientes de la purificación de NCLs-BVZ a partir de BVZ purificado y se estimó la concentración de nanopartículas utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibrado correspondiente a la DCR en función de la concentración de NCLs. La DCR puede calcularse a partir de las tasas de conteo medidas de la luz dispersa en el detector y el factor de atenuación (vinculado al valor del atenuador), ambos otorgados por el equipo, según la relación (Bastiat *et al.*, 2013) de la *Ecuación 3.4:*

$$DCR = \frac{\text{Medida de tasa de conteo}}{\text{Factor de atenuación}}$$

Ec. (3.4)

En la *Tabla 3.2*, se pueden observar que las fracciones 13 a 17 presentan TMP entre 87 y 113 nm, que corresponde con un tamaño mayor a las NLCs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y acorde a NLCs con Acs acoplados. A su vez, una mayor concentración de partículas fue observada entre las fracciones 13 y 17 obtenidas con el acoplamiento de BVZ no purificado, y entre las fracciones 13 y 18 obtenidas con el BVZ purificado. En fracciones posteriores, se obtuvieron valores de DCR menores y, por lo tanto, concentraciones bajas de nanopartículas por debajo del límite de cuantificación del método.

En el caso de las fracciones de 13 a 17 de la purificación de las NLCs-BVZ obtenidas a partir de Avastin[®], los TMP varían desde 90,27 a 75,9 nm y el IP es menor a 1. De acuerdo a la DCR, se determinó la presencia de partículas en las fracciones 13 a 17 mientras que, en las fracciones 24 y 30, los valores de DCR están por debajo

| NLCs-BVZ a partir de BVZ purificado | | | | |
|-------------------------------------|-----------|-------|-------|--------------|
| Fracción | TMP (nm) | IP | mV | NLCs (mg/ml) |
| 13 | 113,6 | 0,117 | -6,08 | 7,24 |
| 14 | 101,6 | 0,118 | -5,58 | 12,74 |
| 15 | 99,75 | 0,108 | -6,39 | 8,74 |
| 16 | 87,67 | 0,107 | - | 3,96 |
| 17 | 86,96 | 0,082 | - | 1,06 |
| 24 | 79,95 | 0,145 | -3 | 0 |
| 30 | 78,36 | 0,214 | - | 0 |
| 39 | 147 (95%) | 0,321 | - | 0 |
| | 23.8 (5%) | | | |
| 43 | 69,03 | 0,210 | -1,16 | 0 |

Tabla 3.2. Tamaño medio de partícula (TMP), Índice de Polidispersidad (IP), Potencial Zeta (PZ) y concentración de Nanocápsulas Lipídicas (NLCs) de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión de tamaño molecular de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Bevacizumab (NLCs-BVZ) a partir de bevacizumab (BVZ) purificado.

del límite de cuantificación del método. En paralelo, se determinó que el producto comercial Avastin® presenta dos poblaciones de partículas, correspondiendo el 89,1% de la intensidad a un TMP de 158,4 nm y el 10,9% a un TMP de 0,65 nm, posiblemente producto de micelas con el estabilizante de la formulación.

De acuerdo a los resultados los cromatogramas, DCR y TMP, se puede inferir la presencia de NCLs-BVZ entre las fracciones (10±2) y (20±2) y de Ac libre entre las fracciones (24±2) y (56±2).

3.4.1.3-Controles de Elución

En cuanto a los controles de elución, los resultados se presentan en la *Figura 3.4*. El cromatograma del Control Ac libre (BVZ purificado) muestra que el mismo eluye entre las fracciones 25 y 57. En el control MF, por un lado, se observa presencia de partículas entre las fracciones 9 y 13 y, por otro, se determinaron proteínas en baja concentración entre las fracciones 9 y 13, y en mayor concentración entre las fracciones 25 y 57.

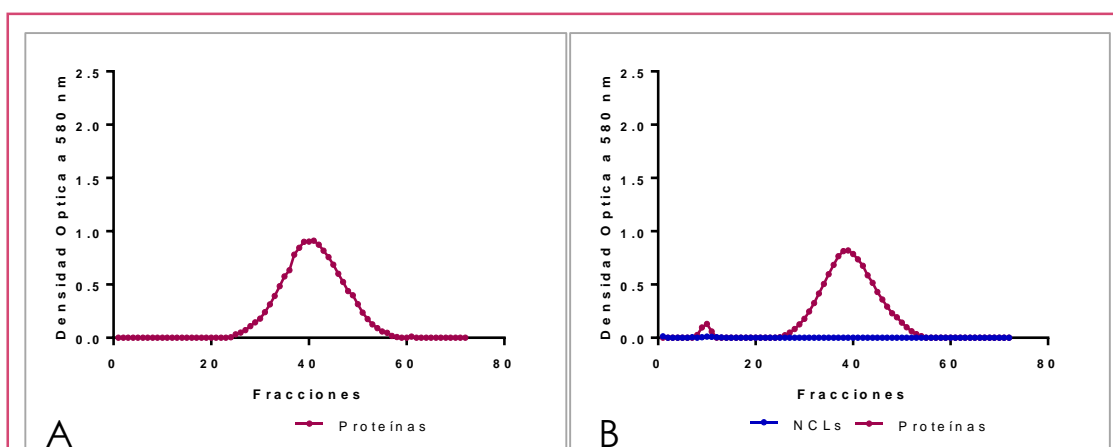


Figura 3.4. Cromatogramas de los controles de elución de Bevacizumab (BVZ) libre y nanocápsulas lipídicas funcionalizadas (NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida).

Los gráficos de líneas muestran la densidad óptica a 580 nm de las fracciones obtenidas luego de la purificación de (A) BVZ purificado libre (Control Ac libre) y, de (B) una mezcla física de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y BVZ sin funcionalizar (Control MF). Las líneas de la serie "NCLs" y, de la serie "Proteínas" corresponden a los resultados obtenidos antes y después del ensayo de Micro BCA™, respectivamente.

Las mediciones de TMP del control MF, presentadas en la *Tabla 3.3*, corroboran la presencia de partículas entre las fracciones 9 y 13. Además, la presencia de proteínas en las fracciones con partículas demuestra que el Ac no funcionalizado puede interaccionar con las mismas, pero en menor medida comparado a la unión covalente. Las fracciones 10, 11 y 12 muestran presencia de partículas con un TMP entre 73,5 y 65,5 nm, los cuales corresponden con los tamaños de las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. Por último, el análisis de los resultados correspondientes al control Ac libre y control MF, demuestran que las nanopartículas eluyen entre las fracciones 10 y 20, y que el Ac libre a partir de la fracción 25.

A su vez, los TMP, IP y el perfil de la SEC obtenidas para las NCLs-BVZ fueron comparables con aquellos obtenidos en trabajos previos del grupo del Dr. Benoit, como en el caso de las NCLs conjugadas al AC monoclonal OX26 (Béduneau *et al.*, 2007) y de las NCLs conjugadas al Ac monoclonal AC133 (Bourseau-Guilmain *et al.*, 2012). Cabe destacar que además, en estos trabajos, se estudió la cinética de adsorción del polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida en las NCLs, las propiedades reológicas de NCLs con DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida insertado en su superficie, y la inmunoespecificidad de los Acs conjugados a las NCLs (Béduneau *et al.*, 2007; Bourseau-Guilmain *et al.*, 2012; Sehedic *et al.*, 2017).

| Fracción N° | TMP (nm) | IP | PZ (mV) | NCLs (mg/ml) |
|-------------|------------------------|-------|---------|--------------|
| 10 | 73,53 | 0,111 | - | 4,28 |
| 11 | 67,7 | 0,062 | -7,31 | 4,72 |
| 12 | 65,5 | 0,047 | -6,35 | 2,78 |
| 24 | 63,4 | 0,132 | - | 0 |
| 30 | 57,5 | 0,112 | - | 0 |
| 40 | 111 _(95,8%) | 0,345 | - | 0 |
| | 4760 _(4,2%) | | | |

Tabla 3.3. Tamaño medio de partícula (TMP), Índice de Polidispersidad (IP), Potencial Zeta (PZ) y concentración de Nanocápsulas Lipídicas (NCLs) de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión de tamaño molecular de la mezcla física de NCLs-DESPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y BVZ libre sin funcionalizar.

3.4.2-Estudios de caracterización de NCLs-BVZ

3.4.2.1-Electroforesis SDS-PAGE y *Western-blot*

La técnica de SDS-PAGE se utilizó para verificar el acoplamiento entre BVZ y DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. La SDS-PAGE, es una técnica ampliamente utilizada para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética en función de la longitud de la cadena polipeptídica y la masa molecular, entre otros factores. El Dodecilsulfato de Sodio (SDS, del inglés *"Sodium Dodecyl Sulfate"*) provoca la desnaturalización de las proteínas permitiendo la separación por la diferencia del peso molecular, la longitud de la cadena y la forma de la proteína.

Teniendo en cuenta que el BVZ es un Ac humanizado y que posee una región específica murina, las membranas obtenidas luego de la transferencia del gel de SDS-PAGE, se revelaron con un Ac anti-mouse. En consecuencia, las bandas que pueden apreciarse en las Figuras 3.5 y 3.6 luego del revelado, mostraron la

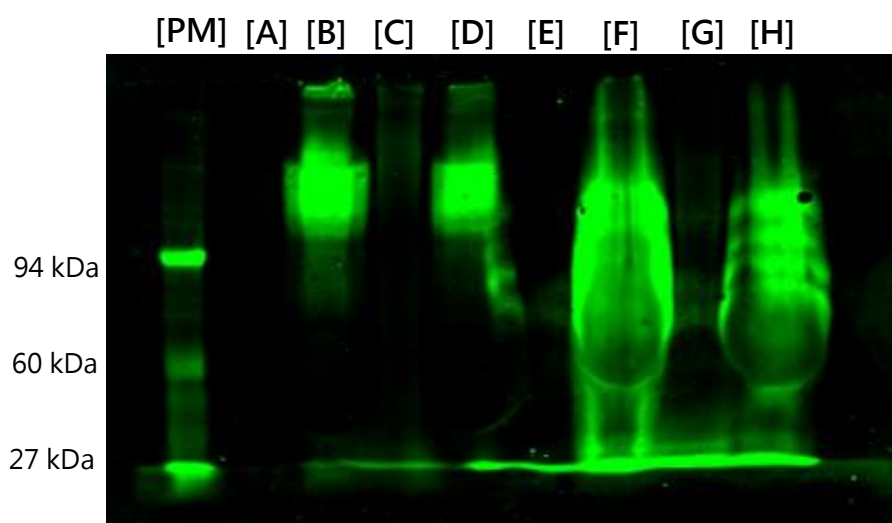


Figura 3.5. SDS-PAGE y Western-blot de Nanocápsulas lipídicas cargadas con Bevacizumab (NCLs-BVZ) I

La imagen muestra el resultado de una membrana revelada con un anticuerpo secundario anti-mouse correspondiente al gel de SDS-PAGE (7,5%) en condiciones desnaturalizantes no-reductoras, sembrado con: [PM]-Marcador de peso molecular; [A]- DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, [B]- BVZ, [C]-NCLs-BVZ y, [D]-Control MF; y en condiciones desnaturalizantes reductoras con [E]-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, [F]- BVZ, [G]-NCLs-BVZ y, [H]- Control MF. El ensayo se realizó luego de 5 días de la formulación de las NCLs-BVZ.

presencia de BVZ. En la Figura 3.5, en condiciones desnaturalizantes no-reductoras, el BVZ testigo con PM de 149 kDa (Calle B) se ubica por encima de la proteína de 94 kDa correspondiente al marcador de PM. De la misma manera, la corrida del Control de MF correspondiente a BVZ (no-funcionalizado) y NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, muestra una banda que coincide con la ubicación de la banda de BVZ testigo. La calle sembrada con NCLs-BVZ (Calle C) no mostró ninguna banda por encima de la banda del BVZ testigo, lo cual podría deberse a que las nanopartículas al poseer un mayor tamaño no migraron quedando retenidas en el sitio de siembra, debido al tamaño de poro del gel. No se observaron bandas en la (Calle A) sembrado con NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida debido a que no hay presencia de una región específica murina que reconozca el anticuerpo secundario.

En condiciones desnaturalizantes y reductoras, el SDS rompe las uniones no covalentes y el agente reductor altera los enlaces disulfuro separando las cadenas

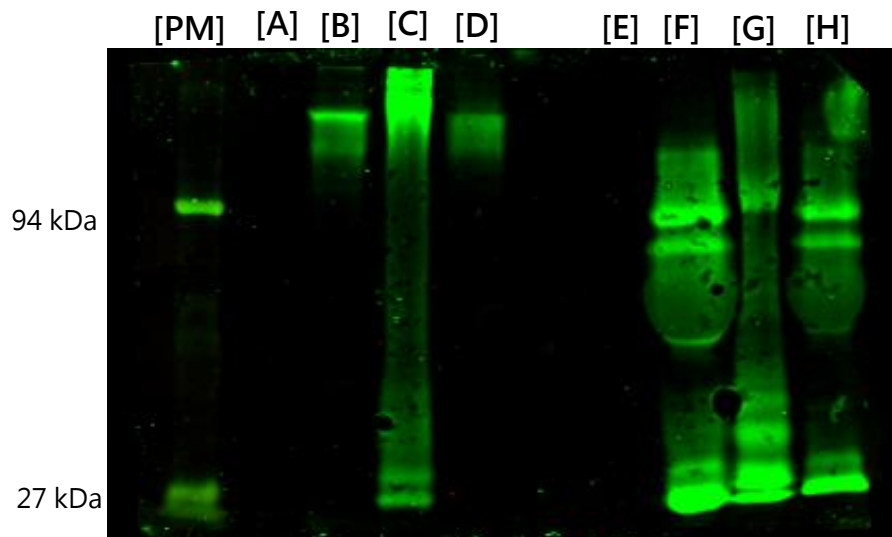


Figura 3.6. SDS-PAGE y Western blot de Nanocápsulas lipídicas cargadas con Bevacizumab (NCLs-BVZ) II

La imagen muestra el resultado de una membrana revelada con un anticuerpo secundario anti-mouse correspondiente al gel de SDS-PAGE (7,5%) en condiciones desnaturalizantes no-reductoras, sembrado con: [PM]-Marcador de peso molecular; [A]- DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, [B]- BVZ, [C]-NCLs-BVZ y, [D]-Control MF; y en condiciones desnaturalizantes reductoras con [E]-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, [F]- BVZ, [G]-NCLs-BVZ y, [H]-Control MF. El ensayo se realizó luego de 30 días de la formulación de las NCLs-BVZ.

livianas y cadenas pesadas del Ac. En el ensayo en estas condiciones, debido a la concentración elevada de Ac, las calles sembradas con BVZ (Calle F) y con el control MF (Calle H) muestran bandas solapadas correspondientes a moléculas con PM superiores a 94 kDa, hasta moléculas más pequeñas que 27 kDa. La calle sembrada con las NCLs-BVZ (Calle G) mostró una banda clara en la región correspondiente a moléculas de 60 kDa.

Con el objetivo de optimizar la concentración de las muestras sembradas y evaluar si las NCLs-BVZ conservan el Ac integro en la formulación, el experimento se repitió luego de 30 días utilizando las mismas muestras a una menor concentración de BVZ testigo y de control de MF, y una mayor concentración de NCLs-BVZ. Como se puede observar en la *Figura 3.6*, en condiciones desnaturalizantes no-reductoras, la banda del BVZ testigo (Calle B) se ubica por encima de la proteína de 94 kDa correspondiente al marcador de PM. De la misma manera, el control de MF (Calle D) muestra una banda que se corresponde con el BVZ testigo. La calle sembrada con NCLs-BVZ (Calle C) mostró una banda por encima de la banda del BVZ testigo infiriendo partículas más grandes, las cuales no migran. Además, en esta calle se observaron bandas más claras a la altura de 27 kDa del marcador de PM. Nuevamente, no se observaron bandas en la calle sembrada con NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (Calle A).

Probablemente la banda ubicada a 27 kDa en la calle de NCLs-BVZ en condiciones no-reductoras, son producto de la ruptura de enlaces del Ac durante el almacenamiento. Sin embargo, la banda por encima de 94 kDa fue más oscura, por lo cual se puede inferir que la cantidad de fragmentos de las cadenas de BVZ producto de la ruptura de enlaces es pequeña, en comparación a la cantidad de NCLs-BVZ y que, la mayor parte de BVZ esta cargado en las nanopartículas. Para respaldar esta hipótesis, las bandas obtenidas en la zona de 27 kDa correspondientes a NCLs-BVZ tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se cuantificaron utilizando el programa ImageJ. Los resultados mostraron que la intensidad de las bandas obtenidas en condiciones no-reductoras representan el 15% respecto a las obtenidas en condiciones reductoras.

Como se mencionó anteriormente, en condiciones reductoras, se rompen las uniones disulfuro y se separan las cadenas livianas y pesadas del Ac. En este sentido, los carriles sembrados con BVZ (calle F) y con el control MF (Calle H) muestran una banda cercana a 94 kDa correspondiente a las cadenas pesadas del BVZ y una banda cercana a 27 kDa correspondiente a sus cadenas livianas. Además, la calle sembrada con las NCLs-BVZ (Calle G) mostró bandas levemente por encima de aquel sembrado con BVZ testigo (correspondientes a las cadenas livianas y pesadas), por la presencia de las NCLs. A partir de la migración del BVZ testigo hasta la región cercana a 94 kDa se podría inferir que el agente reductor no causó la separación completa de los distintos dominios del anticuerpo, originándose fragmentos de las dos cadenas pesadas unidas, fragmentos de una cadena pesada con una cadena liviana y fragmentos de cadenas livianas por separado. Para corroborar la separación completa de las cadenas pesadas entre sí y con las cadenas livianas, se debería calentar las muestras además de agregarle el agente reductor.

A partir de los resultados obtenidos en los dos estudios y la comparación de los mismos, se puede inferir la presencia de BVZ en la formulación, la unión entre el polímero insertado en las NCLs y el BVZ, y además que, una porción de Ac se libera de las NCLs luego de 30 días de su formulación; teniendo en cuenta que:

- En el primer experimento, se verificó la ausencia de bandas en la calle sembrada con NCLs-BVZ en condiciones no-reductoras respecto a las diferentes bandas que aparecen en condiciones reductoras.
- En el segundo experimento, luego de 30 días de formulación, se apreció la banda oscura cercana a 94 kDa obtenida en la calle sembrada con NCLs-BVZ en condiciones no-reductoras, en comparación con las bandas obtenidas en el carril sembrado con éstas nanopartículas en condiciones reductoras correspondientes a PM menores. Además, en condiciones no-reductoras la banda clara correspondiente a la ubicación de la cadena liviana del Ac indica presencia de Ac no unido a las NCLs.

A su vez, el análisis y las conclusiones de los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con los hallazgos de otros dos trabajos en los cuales utilizaron esta técnica para verificar la unión covalente entre péptidos y nanopartículas. En uno de ellos, se confirmó la conjugación del Ac monoclonal trastuzumab a nanopartículas formadas a partir del virus X de la papa. Esta conclusión derivó de la observación de una banda ubicada por encima de la correspondiente a la cadena pesada del Ac y a la de la proteína de la cubierta del virus de papa X, en la calle donde se sembró el conjugado (Esfandiari *et al.*, 2015).

En el mismo sentido, en un estudio de conjugación covalente de un antígeno de influenza A a la superficie de nanopartículas de polímero de quitosano a través de enlaces tioéster (Liu *et al.*, 2015), se observaron resultados similares a los obtenidos con las NCLs-BVZ. Por un lado, las nanopartículas y el polímero quedaron retenidos en el sitio de siembra, y por otro, se observaron bandas similares al antígeno libre en las calles sembradas con la mezcla física de antígeno y nanopartículas, y el polímero unido al antígeno. En las nanopartículas con antígeno sólo se observaron bandas débiles correspondientes al antígeno sugiriendo la carga de la mayor parte del antígeno en las mismas.

Considerando que en los trabajos mencionados se respalda el análisis correspondiente a los resultados de SDS-PAGE y *Western-blot* de NCLs-BVZ realizado en este trabajo, se puede inferir de manera indirecta la unión entre BVZ y el polímero insertado en las NCLs.

3.4.2.2-Microcalorimetría diferencial de barrido

En paralelo al ensayo de SDS-PAGE y *Western-blot*, se realizó un estudio de microcalorimetría diferencial de barrido con el objetivo de estudiar la estabilidad térmica del BVZ luego de su conjugación con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. Para ello, mediante esta técnica, se estudiaron el BVZ purificado, las NCLs-BVZ y NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida.

Para el análisis de los resultados, es útil conocer la estructura de Acs monoclonales como el BVZ del tipo IgG1, la cual se representó en la *Figura 3.1*. Las cadenas de un Ac monoclonal, se pliegan en dominios de aproximadamente 110

residuos, que tienen una arquitectura característica de lámina beta conocida como el "pliegue de inmunoglobulina". Existen dos dominios de inmunoglobulina en la cadena liviana, VL y CL, y cuatro dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada, VH, CH1, CH2, y CH3 (" V " y " C " representan " variable " y " constante", respectivamente). Además, cuando un Ac IgG1 humano es digerido por papaína, origina dos tipos de fragmentos de tamaño similar: el fragmento Fc (compuesto por dos dominios CH2 y dos dominios CH3) y el fragmento Fab (compuesto por CH1, CL, VH y VL)(Ionescu *et al.*, 2008). En este sentido, la microcalorimetría diferencial de barrido mide el despliegue dependiente de la temperatura de un Ac evidenciado por una endoterma de transición y, a menudo, puede resolver por separado el despliegue de sus dominios Fab y Fc. Cabe destacar que la formulación y la composición de un Ac (como su pH o fuerza iónica) determinan su desdoblamiento térmico inducido (Ionescu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2010; Adem *et al.*, 2014). De acuerdo a esto, esta técnica se utilizó para monitorizar el desdoblamiento inducido térmicamente de BVZ libre y del BVZ acoplado a las NCLs formulado en *buffer HEPES*.

En la *Figura 3.7*, se muestran los resultados correspondientes a los termogramas de BVZ, NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y NCLs-BVZ. En el perfil del BVZ se puede observar una transición de desnaturalización a 72 °C y otra a 82 °C. En línea con estudios realizados por otros autores, la primera transición en el perfil del BVZ corresponde al despliegue del fragmento Fab y el despliegue de un dominio en el fragmento Fc, mientras que, la segunda transición corresponde al despliegue de CH3 del fragmento Fc (Ionescu *et al.*, 2008; Adem *et al.*, 2014).

En relación a los resultados obtenidos para las NCLs-BVZ, el termograma mostró también dos transiciones, una a 69 °C y otra a 82 °C. Sin embargo, se observó un corrimiento de -3 °C en la primera transición y una disminución en la entalpía en comparación con las transiciones de BVZ. Este comportamiento podría relacionarse con un efecto de desestabilización térmica de BVZ como consecuencia de su conjugación con las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida.

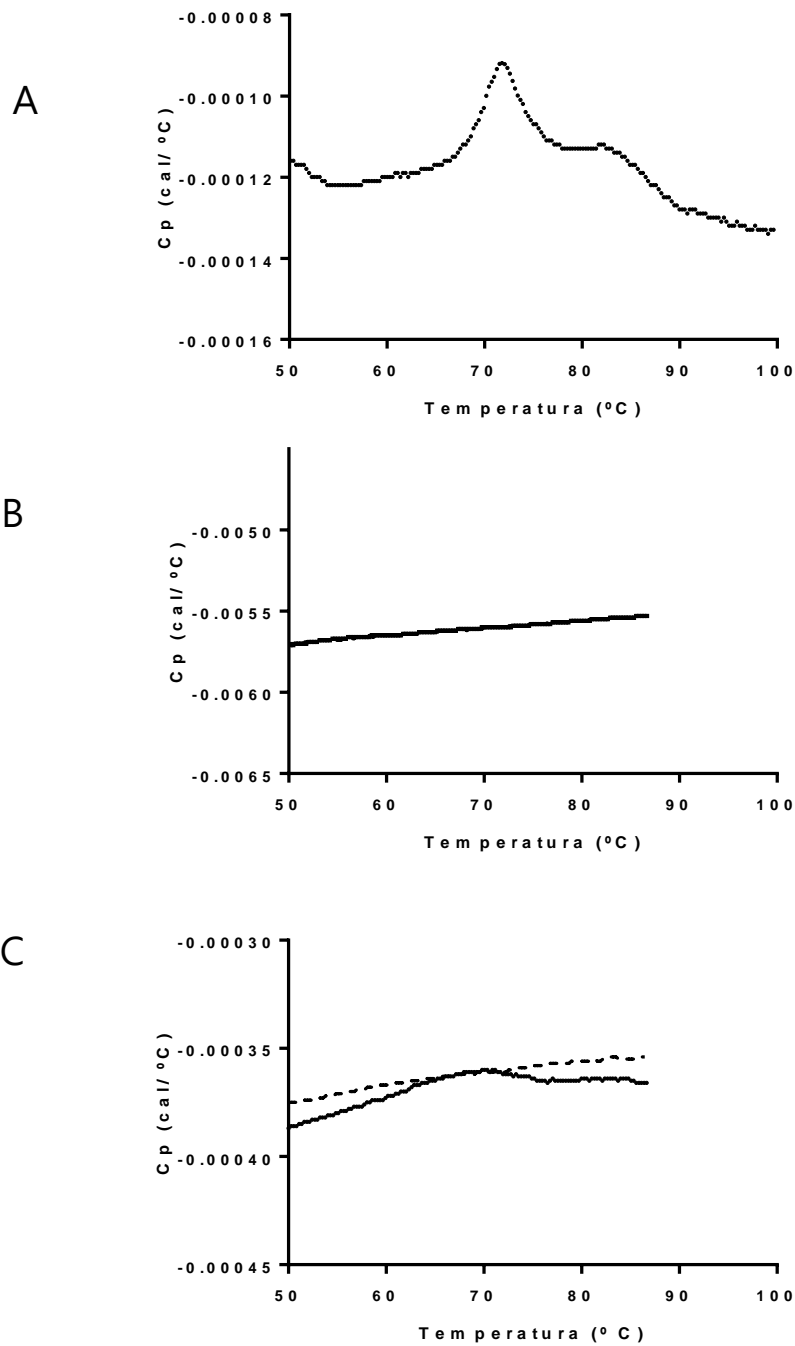


Figura 3.7. Microcalorimetría diferencial de barrido de Nanocápsulas Lipídicas cargadas con Bevacizumab (NCLs-BVZ)

La imagen muestra los termogramas obtenidos por microcalorimetría diferencial de barrido de (A) Bevacizumab purificado, (B) NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y, (C) NCLs-BVZ.

Los perfiles representados con línea sólida corresponden al primer ciclo de calentamiento y los representados con líneas discontinuas corresponden al último ciclo.

En este sentido, se encuentra descrito en la bibliografía que la conjugación entre las cisteínas libres generadas por la reducción parcial de los enlaces disulfuro intercatenarios en el Ac y un enlazador que contiene un grupo maleimida reactivo con el grupo tiol, conduce a la desestabilización del dominio CH2. (Beckley *et al.*, 2013; Adem *et al.*, 2014; Wiggins *et al.*, 2015). Por lo tanto, a partir de la comparación del termogramas de NCLs-BVZ con BVZ, la disminución de primer evento térmico se puede asociar a la desestabilización del mencionado dominio permitiendo inferir la conjugación del grupo maleimida del polímero insertado en las NCLs con el grupo tiol del BVZ. Estos resultados concuerdan con los observados en la conjugación de Acs por enlace covalente con otros polímeros, proteínas o fármacos en trabajos realizados por otros autores (Wakankar *et al.*, 2010; Adem *et al.*, 2014; Wiggins *et al.*, 2015). Cabe destacar que se ha reportado que, la probabilidad de cambios en la estructura secundaria o terciaria debido a la conjugación de compuestos con cisteínas intercatenarios de un Ac es baja, pero cuando los conjugados son térmicamente estresados, cualquier efecto estructural podría llegar a ser más pronunciado (Beckley *et al.*, 2013; Adem *et al.*, 2014). Estos cambios podrían ser detectados en los termogramas.

3.4.2.3-Capacidad de carga, porcentaje de acoplamiento y propiedades físicoquímicas de las NCLs-BVZ

Con el objetivo de determinar la cantidad de Ac que pueden cargar las NCLs, se formularon NCLs-BVZ con diferentes cantidades iniciales de BVZ, utilizando concentraciones constantes de polímero (11 mM) y nanopartículas (131 mg/ml). Las NCLs se prepararon a partir de cantidades iniciales de BVZ correspondientes a 1,5 mg; 2,5 mg; 3,0 mg; 4,0 mg y 5,0 mg, y a las cuales se denominó NBVZ-1,5; NBVZ-2,5, NBVZ-3, NBVZ-4 y NBV-5, respectivamente. Es importante señalar que esta cantidad inicial de BVZ definirá el número de Acs por NCL, mientras que la concentración de cada formulación se determinará en función del volumen de reconcentración luego del proceso de purificación de las NCLs-BVZ.

Luego de su obtención, se cuantificaron las fracciones de la purificación de NCLs-BVZ correspondientes al BVZ libre mediante las determinaciones de Micro

BCA™ y, se calcularon la capacidad de carga de BVZ en las NCLs y el porcentaje de acoplamiento de BVZ en función de su cantidad inicial. Finalmente, las fracciones con NCL-BVZ resultantes del proceso de purificación se reconcentraron por ultracentrifugación a un volumen final entre 1,0 y 1,5 ml.

Los resultados de los cromatogramas presentados en la *Figura 3.8*, mostraron que a partir de 1,5 mg; 2,5 mg y 3,0 mg iniciales de BVZ (NBVZ-1,5; NBVZ-2,5 y NBVZ-3) disminuye la cantidad de Ac libre luego de la reacción de conjugación y, por lo tanto, aumenta el porcentaje de acoplamiento de BVZ en las NCLs respecto a la cantidad inicial (87%, 94% y 98%, respectivamente). Para cantidades iniciales de BVZ de 4,0 mg o 5,0 mg (NBVZ-4 y NBVZ-5, respectivamente), el cromatograma muestra una mayor cantidad de Ac libre y, por lo tanto, un menor porcentaje de acoplamiento (80%) respecto a esas cantidades iniciales. La tendencia del acoplamiento en relación a las cantidades iniciales de BVZ posiblemente puede deberse a que, a concentraciones relativamente bajas de Ac, existen suficientes grupos maleimida del polímero para reaccionar con el Ac funcionalizado mientras que, al aumentar el número de Acs, la disponibilidad de esos grupos estaría limitada.

Cabe destacar que, se obtienen NCLs con mayor dosis de BVZ conforme aumenta la cantidad inicial de Ac. Las NBVZ-4 y NBVZ-5, presentaron dosis de BVZ mayores (3,2 mg y 4,0 mg de BVZ cargado, respectivamente) respecto a las dosis de NCLs que fueron preparadas a partir de 1,5 mg; 2,5 mg y 3,0 mg de Ac (NBVZ-1,5; NBVZ-2,5, NBVZ-3, respectivamente). Sin embargo, pese a que la dosis de BVZ es mayor en las NCLs obtenidas a partir de cantidades iniciales mayores del mismo, se debe tener en cuenta la cantidad de Ac no acoplado que se pierde en el proceso de preparación. Por ésta razón, en favor de la optimización del proceso tecnológico, se seleccionaron las NCLs-BVZ preparadas a partir de cantidades iniciales de hasta 3,0 mg de BVZ para pruebas de caracterización posteriores.

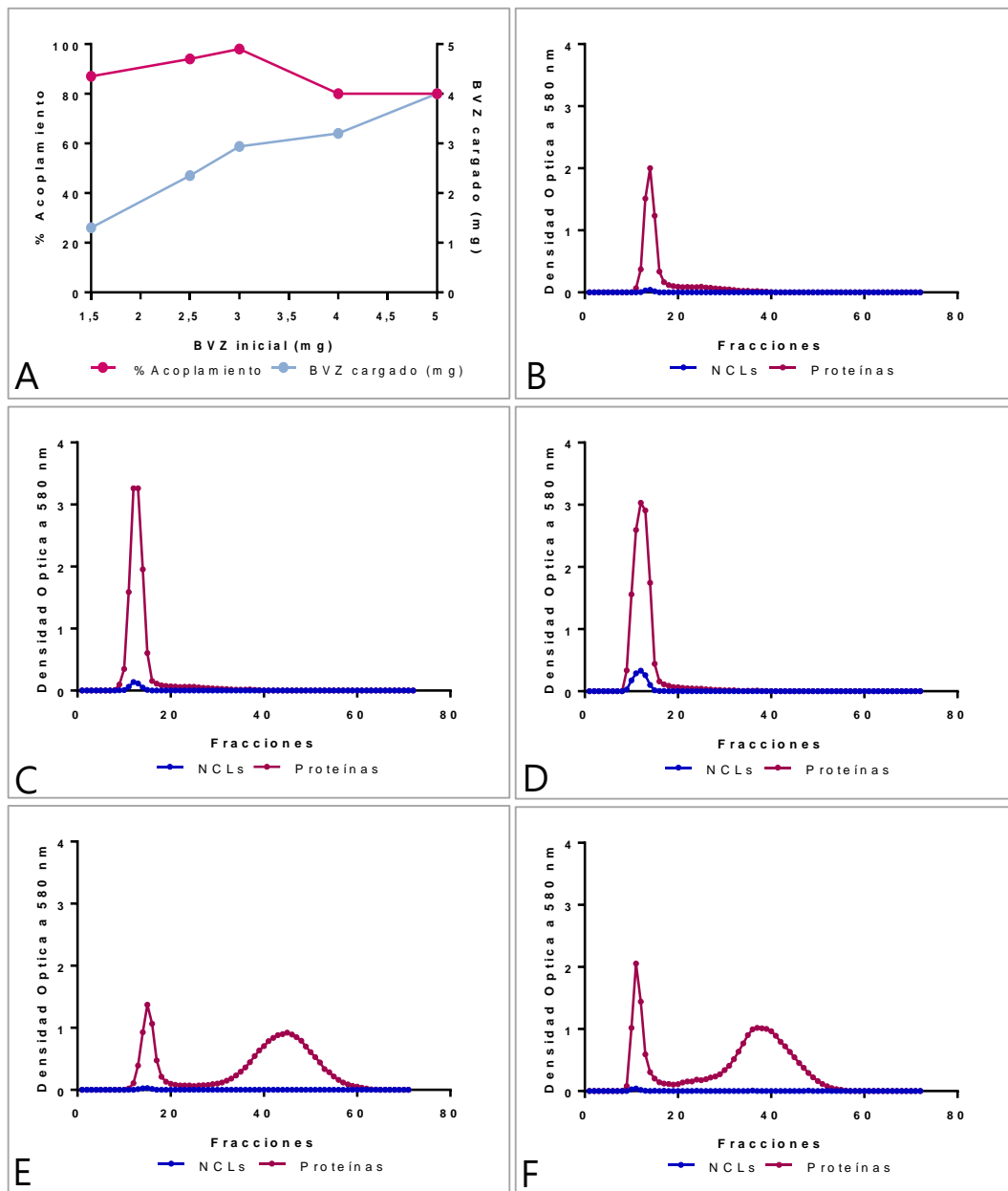


Figura 3.8. Cromatogramas de la purificación de Nanocápsulas Lipídicas de Bevacizumab (NCLs-BVZ) a partir de diferente cantidad inicial de anticuerpo

En el gráfico (A) las líneas representan la tendencia del porcentaje (%) de acoplamiento de Bevacizumab (BVZ) las NCLs y el BVZ cargado en las mismas en función de la cantidad inicial de anticuerpo. En los gráficos restantes, las líneas representan la densidad óptica a 580 nm de las fracciones obtenidas luego de la purificación de NCLs-BVZ formuladas a partir de una cantidad inicial de BVZ purificado correspondiente a (B)1,5 mg, (C)2,5mg, (D)3,0 mg, (E)4,0 mg y (F)5,0 mg. Las líneas de la serie "NCLs" y de la serie "Proteínas" corresponden a los resultados obtenidos antes y después del ensayo de Micro BCA™, respectivamente.

En este sentido, como se puede observar en la *Tabla 3.4*, las NBVZ-1,5; NBVZ-2,5, NBVZ-3, presentaron TMP entre 123 y 314 nm, un IP mayor a 0,2 y un PZ negativo. Los resultados mostraron que a medida que aumenta la cantidad de BVZ acoplado aumenta el TMP y el IP de la formulación, y su PZ se hace más electropositivo. Es razonable pensar que las NCLs son más grandes a medida que presentan más Ac en su superficie y que, además, la cantidad de Ac por NCLs varía originando una formulación menos homogénea por lo cual la distribución de tamaño es mayor a la de las NCLs convencionales (IP= 0,037) y de NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (IP= 0,052).

En tanto, el PZ se hace menos electronegativo debido que al aumentar la cantidad de BVZ en las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (PZ= -37mv), en la superficie queda expuesta menos carga negativa correspondiente al polímero. De acuerdo estos los resultados obtenidos y a los correspondientes al porcentaje de acoplamiento de Ac, las tres formulaciones se seleccionaron para estudios posteriores.

| Formulación | BVZ inicial (mg) | Acoplamiento (%) | BVZ cargado (mg) | TMP (nm) | IP | PZ (mV) | BVZ unido a VEGF (%) | BVZ unido a VEGF (mg) |
|-------------|------------------|------------------|------------------|----------|-------|---------|----------------------|-----------------------|
| NBVZ-1,5 | 1,5 | 87±5 | 1,30 | 123±10 | 0,234 | -28±2 | 29,3 | 0,38 |
| NBVZ-2,5 | 2,5 | 94±5 | 2,35 | 196±13 | 0,280 | -19±4 | 25,3 | 0,59 |
| NBVZ-3 | 3,0 | 98±2 | 2,94 | 314±110 | 0,387 | -14±6 | 11,7 | 0,34 |

Tabla 3.4. Propiedades de las Nanocápsulas Lipídicas cargadas con bevacizumab (NCLs-BVZ) obtenidas a partir de diferentes cantidades iniciales de anticuerpo.

3.4.2.4-Capacidad de unión de NCLs-BVZ a VEGF

El estudio de capacidad de unión de NCLs-BVZ a VEGF se realizó mediante un estudio de ELISA, con el objetivo de evaluar la funcionalidad del BVZ cargado en las NCLs de unirse a su antígeno específico. Para ello, se evaluaron las formulaciones NBVZ-1,5; NBVZ-2,5, NBVZ-3.

Los resultados presentados en al *Tabla 3.4*, muestran que el porcentaje de Ac que se une al antígeno adsorbido en la placa respecto a la cantidad de BVZ cargado en las NCLs, tiende a disminuir a medida que aumenta la cantidad de Ac acoplado en la superficie. Sin embargo, si se observan los valores de la dosis de BVZ unido a VEGF, las NCLs-BVZ preparadas con 2,5 mg iniciales de BVZ (NBVZ-2,5) mostraron una mayor cantidad de Ac unido al antígeno (0,59 mg) que NBVZ-1,5; y NBVZ-3.

Es necesario señalar que, en ninguno de los casos la cantidad de Ac acoplado se une en su totalidad al VEGF. Este comportamiento se puede atribuir al hecho que el BVZ está unido a la superficie de las NCLs y, por lo tanto, no se encuentra libre en solución para interactuar con el antígeno adsorbido a la placa. En este sentido, el BVZ que interactúa con el VEGF es aquel BVZ cargado en las NCLs que tiene acceso a la superficie de la placa donde se encuentra el antígeno. Por el contrario, por impedimento estérico una proporción de BVZ cargado en las NCLs no tendría acceso a la placa y, en consecuencia, la posibilidad de unirse al VEGF.

A diferencia de nuestro trabajo otros autores utilizaron esta técnica asegurando que el BVZ está libre en solución con el fin de evaluar la integridad del BVZ luego del proceso tecnológico utilizado para obtener nanopartículas (Varshochian *et al.*, 2013) y, para determinar indirectamente la capacidad de carga del mismo por cuantificación indirecta del Ac no cargado (Varshochian *et al.*, 2015). Igualmente, también se utilizó para evaluar la actividad del Ac luego de liberarse de nanopartículas poliméricas (Yandrapu *et al.*, 2013).

A partir de estos resultados se puede concluir que, si bien esta técnica no es útil para cuantificar la cantidad de BVZ cargado en las NCLs, permite corroborar su capacidad de interactuar con su antígeno VEGF.

3.4.3-Efecto antiangiogénico *in-vitro* de las NCLs-BVZ

Con el objetivo de evaluar el efecto de las NCLs-BVZ obtenidas sobre la angiogénesis, se utilizó el ensayo *in-vitro* de formación de túbulos de células endoteliales sobre *Matrigel*, en el cual estas células pueden formar una red tipo

telaraña. Teniendo en cuenta que la formación de túbulos de células endoteliales es uno de los pasos más importantes en el proceso de angiogénesis, el efecto de las NCLs-BVZ sobre la formación de los mismos permite hacer inferencia sobre la eficacia de las mismas.

Para ello, por un lado, las células HUVEC sobre *Matrigel* se incubaron en medio EMB-2 con Avastin® y NBVZ-2,5 en concentraciones de BVZ de 0,5 y 2,0 μM ; y como control negativo del estudio, se utilizaron células HUVEC no tratadas (células control, CC). Durante el ensayo, las CC se movilizaron sobre el gel, se dispersaron y generaron extensiones laterales para formar conexiones intercelulares dentro de las 3 horas de la siembra. Luego de 6 horas, formaron una red de endotubos bien establecida; la cual se puede observar en la *Figura 3.9*, en la imagen (A) obtenida por microscopía de contraste de fases luego de 24 horas de incubación. Además, en las imágenes correspondiente a las células tratadas con Avastin® y NBVZ-2,5 se visualiza una disminución de elementos vasculares respecto a la imagen de las CC.

La cuantificación de las mismas mostró que hay una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje (%) de puntos de ramificación en las formulaciones tratadas con Avastin® en concentración 2,0 μM y, en aquellas tratadas con NBVZ-2,5 en ambas concentraciones estudiadas, respecto a CC. Además, se observó una disminución significativa en el % de formación de polígonos tanto para Avastin en concentración 0,5 μM ($p < 0,05$) y 2,0 μM ($p < 0,00001$) como para las NBVZ-2,5 en ambas concentraciones ($p < 0,00001$).

Estos resultados son comparables, con los obtenidos en trabajos realizados por otros autores en relación al efecto observado en células HUVEC tratadas con dosis de BVZ similares. En uno de ellos, se observó un pequeño efecto inhibitor en la formación de túbulos cuando estas células se trataron con BVZ en una concentración de 0,5 μM y, la inhibición la movilización celular y la generación de procesos laterales en una concentración de 5,0 μM (Hoang *et al.*, 2012). En otros, se logró un efecto inhibitor parcial de la formación de capilares en HUVEC por la administración de dosis mayores de BVZ, en conjunto con otros fármacos. En uno

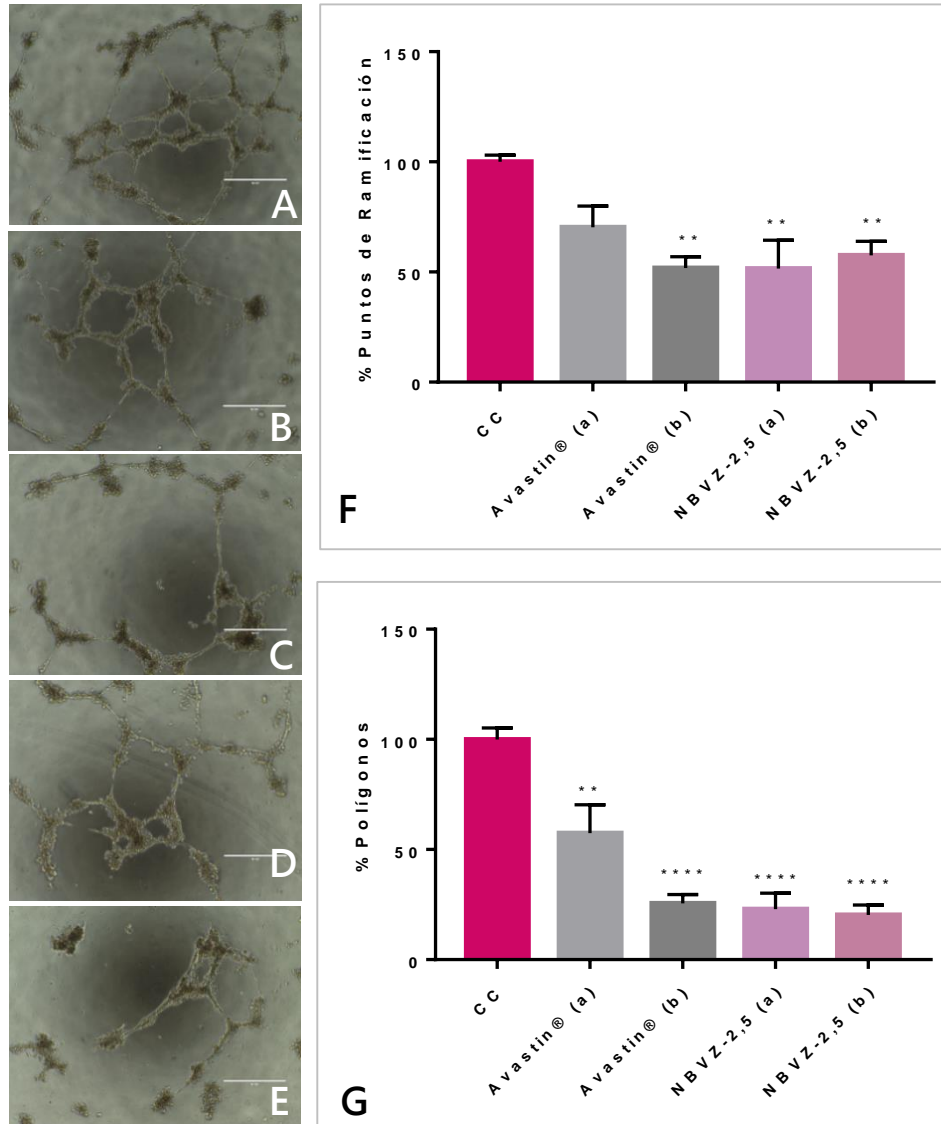


Figura 3.9. Estudio de angiogénesis in-vitro sobre Matrigel para la evaluación del efecto antiangiogénico de Nanocápsulas Lipídicas de Bevacizumab (NCLs-BVZ) I

Las imágenes de microscopía de contraste de fases muestran las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC): (A) sin tratamiento (CC: Células Control) y, tratadas con (B) Avastin® (a= 0,5 μ M), (C) Avastin® (b= 2,0 μ M), (D) NBVZ-2,5 (a= 0,5 μ M) y (E) NBVZ-2,5 (b=2,0 μ M). Los gráficos de barras muestran los resultados de la cuantificación de las Imágenes, expresados la media \pm S.E.M del porcentaje (%) de los (F) Puntos de ramificación y (G) Polígonos respecto al CC, de dos experimentos. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas (* p <0,05; ** p <0,005; **** p <0,0001) se representan respecto al CC. Abreviaturas: NBVZ-2,5: NCLs-BVZ obtenidas a partir de 2,5 mg iniciales de bevacizumab.

de ellos, el BVZ se administró con simvastatina (Lee *et al.*, 2014), y en otro, se administró en combinación con un Ac monoclonal anti-endoglina (Liu *et al.*, 2014). Los resultados reportados por estos autores respaldan el efecto antiangiogénico observado en células HUVEC incubadas con medio EBM-2 sobre *Matrigel* luego del tratamiento con NBVZ-2,5 en dosis de BVZ hasta 2,0 μM .

Por otro lado, en este Trabajo de Tesis, se estudió el efecto de Avastin[®] y NBVZ-2,5 en una concentración correspondiente a BVZ de 0,5 μM y 2,0 μM sobre células HUVEC estimuladas con VEGF sobre *Matrigel*. Como control del estudio, se utilizó células HUVEC estimuladas con VEGF no tratadas (Control Células Estimuladas, CE). Como se puede observar en la *Figura 3.10*, las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases luego de 24 horas de incubación mostraron que el CE presenta más elementos vasculares que las células estimuladas con VEGF y tratadas con Avastin[®] o NBVZ-2,5. En este sentido, la cuantificación de las imágenes mostró que hay una disminución significativa en el % de puntos de ramificación y de formación de polígonos cuando las células son tratadas tanto con Avastin[®] como con NBVZ-2,5; respecto a CE. No obstante, la formulación de NBVZ-2,5 en una concentración de 0,5 μM mostró una disminución en la formación de túbulos mayor que la obtenida en células tratadas con NBVZ-2,5 en una concentración de 2,0 μM .

Además, cabe señalar que, si se comparan los resultados de la formación de túbulos por las CC respecto al CE, aunque el efecto observado es similar, la cuantificación de las imágenes no mostró un aumento significativo en la formación de túbulos en las HUVEC estimuladas con VEGF (comparación no mostrada). Probablemente, el medio de cultivo este saturado y, por lo tanto, no se logre un estímulo para un aumento significativo en la formación de túbulos ante el agregado del VEGF. Para confirmar la eficacia de las NCLs-BVZ, como perspectiva de este trabajo se propone ajustar las condiciones experimentales, aumentar el número de repeticiones del ensayo y complementarlo con un estudio de la evaluación de la migración celular.

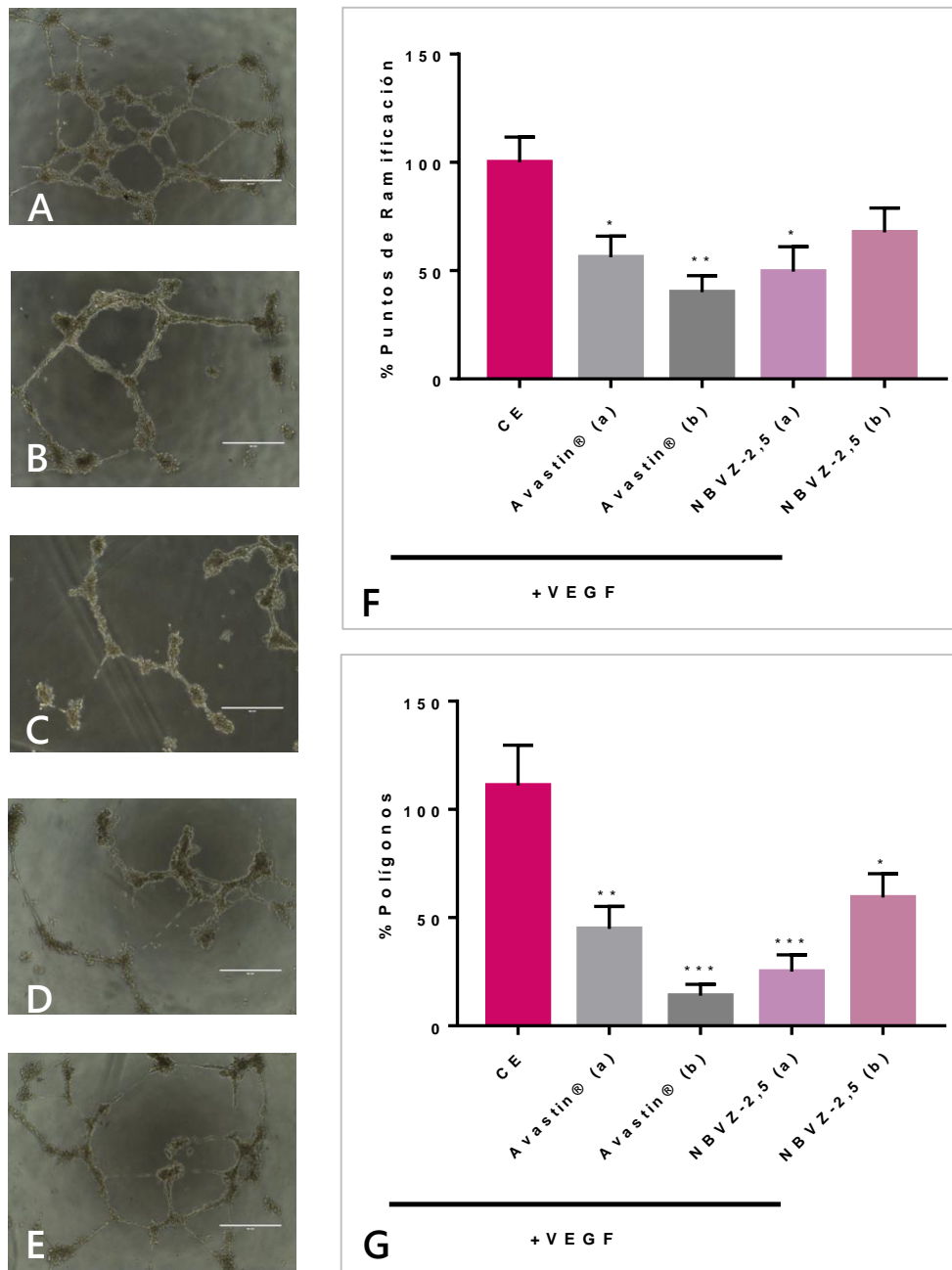


Figura 3.10. Estudio de angiogénesis in-vitro sobre Matrigel para la evaluación del efecto antiangiogénico de Nanocápsulas Lipídicas de Bevacizumab (NCLs-BVZ) II

Las imágenes de microscopía de contraste de fases muestran las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) estimuladas con factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF): (A) sin tratamiento (CE: Células Control Estimuladas) y tratadas con (B) Avastin® ($a=0,5\mu\text{M}$), (C) Avastin® ($b=2,0\mu\text{M}$), (D) NBVZ-2,5 ($a=0,5\mu\text{M}$) y (E) NBVZ-2,5 ($b=2,0\mu\text{M}$). Los gráficos de barras muestran los resultados de la cuantificación de las imágenes, expresados la media \pm S.E.M del porcentaje (%) de los (F) Puntos de ramificación y (G) Polígonos respecto al CE, de dos experimentos. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($*p<0,05$; $**p<0,005$; $***p<0,0001$) se representan respecto al CE. Abreviaturas: NBVZ-2,5: NCLs-BVZ obtenidas a partir de 2,5 mg iniciales de bevacizumab.

En comparación al trabajo realizado por otros autores, la reducción en la longitud de los tubos formados en células HUVEC estimuladas con VEGF, fue logrado luego de la administración de Avastin® y la combinación de Avastin® y Erbitux® (Bhuvaneshwari *et al.*, 2011). Además, este ensayo ha sido utilizado para evaluar el efecto antiangiogénico de otros sistemas nanoparticulados cargados con fármacos antiangiogénicos y nanopartículas funcionalizadas con péptidos para transporte activo (Yu *et al.*, 2010) entre las que se pueden citar: nanopartículas para la administración combinada de doxorrubicina y curcumina (Zhang *et al.*, 2017), nanopartículas cargadas con un conjugado de heparina y ácido gambogico, y funcionalizadas con péptido C (Dahmani *et al.*, 2016) y nanopartículas poliméricas de PEG y PLGA modificadas con péptidos y cargadas con paclitaxel (Lv *et al.*, 2016) (Yu *et al.*, 2015).

Por último, se estudió el efecto de las distintas NCLs-BVZ con el objetivo de comparar si la cantidad de Acs por nanopartícula influye en el efecto antiangiogénico. Para ello, las células HUVEC se incubaron con las formulaciones NBVZ-1,5, NBVZ-2,5y NBVZ-3 a una concentración de BVZ de 2,0 μM , y con NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. Como control negativo del estudio, se utilizaron células HUVEC no tratadas (células control, CC). Se debe tener en cuenta que al normalizar la concentración de BVZ a 2,0 μM , la concentración de NCLs es mayor para la formulación con cantidad inicial de 1,5 mg de BVZ, ya que presenta menos Acs por nanopartícula.

En relación a las células tratadas, como se puede observar en la *Figura 3.11*, los resultados mostraron que, en la concentración estudiada (2,0 μM), las NCLs-BVZ disminuyen el porcentaje (%) de puntos de ramificación y de formación de polígonos respecto a las CC. A su vez, se observó que estos efectos tienden a ser mayores cuando las células son tratadas con las formulaciones NBVZ-2,5 y NBVZ-3; en las cuales se evitó claramente la movilización celular y la generación de procesos laterales de HUVEC y se observaron tubos fragmentados, en mayor medida. Además, no se observó un efecto antiangiogénico en las células tratadas con las NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida respecto a las CC, que puede ser explicado por la ausencia de una molécula anti-VEGF en la formulación.

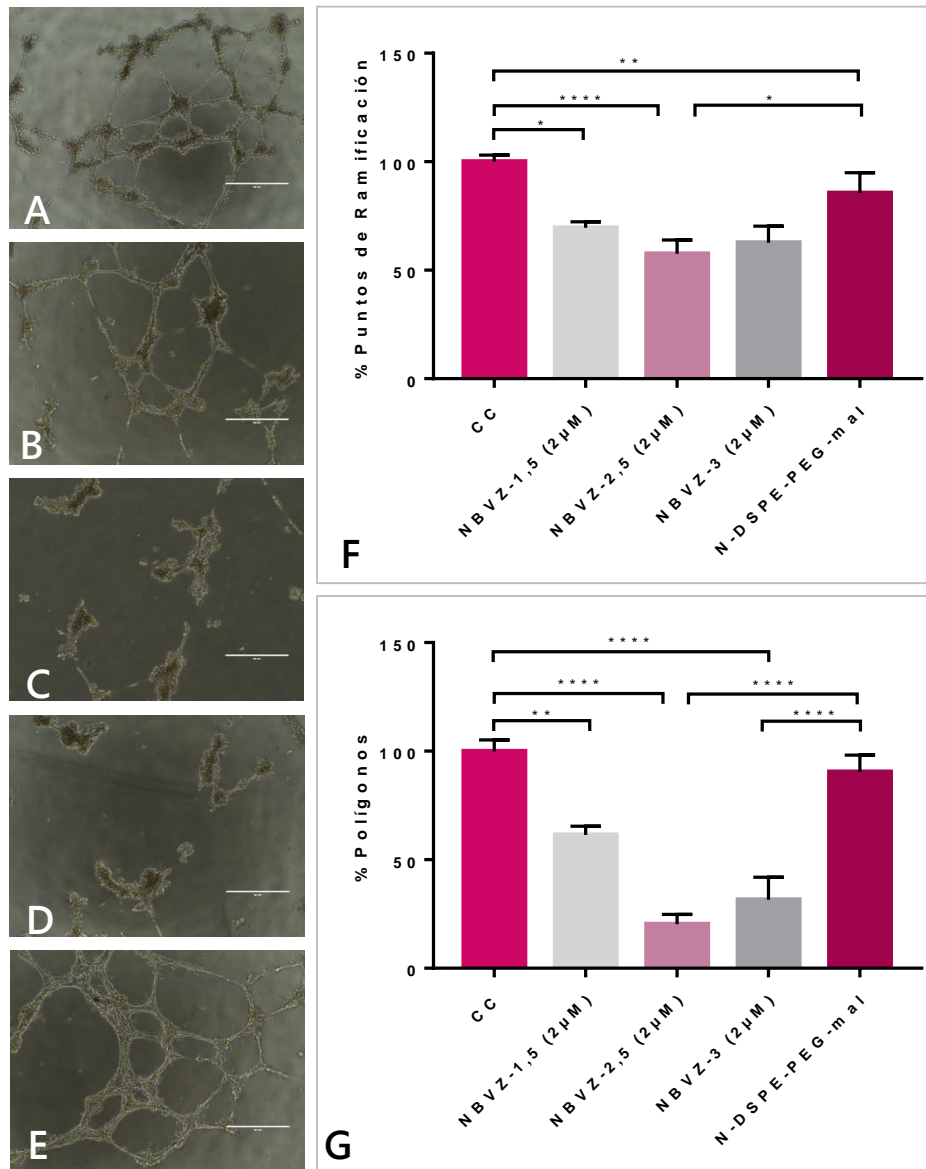


Figura 3.11. Estudio de angiogénesis in-vitro sobre Matrigel para la evaluación del efecto antiangiogénico de Nanocápsulas Lipídicas de Bevacizumab (NCLs-BVZ) III.

Las imágenes de Microscopía de contraste de Fases muestran las Células HUVEC (A) sin tratamiento (CC: Células control) y luego de ser incubadas con (B) NBVZ-1,5, (C) NBVZ-2,5, (D) NBVZ-3 y (E) NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (en el gráfico: N-DSPE-PEG-mal). Los gráficos de barras muestran la media \pm S.E.M del porcentaje (%) (F) Puntos de ramificación y (G) Polígonos respecto al CC, de dos experimentos. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $****p < 0,0001$) se representan respecto al control y a N-DSPE-PEG-mal. Abreviaturas: NBVZ-1,5; NBVZ-2,5 y NBVZ-3 corresponden a NCLs-BVZ obtenidos a partir de 1,5 mg; 2,5 mg y 3,0 mg iniciales de bevacizumab. NCLs-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida: Nanocápsula lipídica con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida insertado en su superficie.

Teniendo en cuenta las imágenes obtenidas y los resultados del % de puntos de ramificación y de polígonos no se puede considerar que hay una diferencia entre el efecto de las distintas NCLs-BVZ mediante este ensayo, aunque se observa que a mayor número de Acs por nanopartícula el efecto inhibitorio tiende a ser mayor.

Del análisis global de los resultados se puede inferir que las NCLs-BVZ obtenidas son efectivas en la inhibición de formación de túbulos. Si bien se considera necesario repetir los experimentos para obtener un mayor número de resultados, este ensayo nos permite demostrar que el BVZ cargado en las NCLs tiene un efecto antiangiogénico *in-vitro* y el mismo es comparable al obtenido con Avastin®.

3.4.4-Obtención de NCLs cargadas con TA y BVZ (Estudio preliminar)

A partir de las formulaciones de NCLs cargadas con TA obtenidas de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 2 y, las NCLs-BVZ obtenidas y caracterizadas durante el desarrollo del presente trabajo, se realizaron estudios preliminares para la obtención de NCLs cargadas con TA y BVZ en una misma formulación. En este sentido, podría esperarse que la obtención de los sistemas por separado podría predecir el éxito de la obtención de una formulación combinada. Sin embargo, se debe tener en cuenta que diferentes variables involucradas en el proceso de obtención de cada tipo de NCLs por separado, pueden dificultar la incorporación de otro fármaco a la misma y, en consecuencia, la obtención de una formulación con ambos fármacos en una misma formulación.

En éste sentido, mediante la primera metodología propuesta en la cual se hizo la inserción de polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida a la formulación Nao-TA1, no se logró obtener la formulación combinada. Los resultados de la purificación de esta formulación luego de ser expuesta a la post-inserción, mostraron que en las fracciones correspondientes a nanopartículas no se cuantificó TA, mientras que se determinó la presencia de este fármaco en las fracciones posteriores. Probablemente, durante la inserción del polímero en la capa de surfactantes, el fármaco es liberado desde las NCLs. Se debe tener en cuenta que durante el proceso

de calentamiento disminuye la rigidez de la capa de surfactantes y, así como el polímero puede insertarse en la misma, el TA presente en el interior o en la misma capa, puede liberarse.

Por el contrario, mediante el "método de inversión de fases e inserción en un solo paso", se obtuvo una formulación de NCLs cargada con TA, *DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida* insertado en su estructura y BVZ acoplado (Nao-TA-*DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida*-BVZ). La formulación mostró que el 85% del TA incorporado es encapsulado en la nanopartícula. Si se comparan los resultados de encapsulación de TA obtenidos para Nao-T1 y Nao-TA-*DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida*-BVZ, se puede observar que en la primera se obtiene una menor cantidad de fármaco en el interior (43%) mientras que en el segundo esa cantidad es mayor. Esta diferencia puede explicarse en función de la cantidad de PEG presente en la formulación. Como se demostró en el capítulo 2, el TA tiene una solubilidad elevada en el PEG y, en consecuencia, la presencia de una mayor proporción de PEG (proveniente del Solutol® HS 15 y del *DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida*) durante el proceso de obtención en las NCLs, podría favorecer la incorporación del fármaco al interior de las NCLs.

Los resultados obtenidos demostraron que el método de inversión de fases e inserción en un solo paso" permite obtener una formulación combinada de NCLs cargadas con TA y BVZ. Por lo tanto, como perspectiva de trabajo se propone caracterizar la formulación obtenida y evaluar su efecto terapéutico.

3.4.5-Activación del sistema del complemento

El sistema del complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la respuesta inmune, responsable de la respuesta innata que desempeña un papel importante en la defensa no específica al interceptar un amplio repertorio de patógenos invasores, partículas, células dañadas y envejecidas del cuerpo, y otros antígenos (Regueiro González *et al.*, 2006; Boraschi *et al.*, 2017). La activación del complemento es una cascada de activación basada en proteólisis, que se realiza a través de tres vías principales (vía alternativa, clásica y lectina), que se desencadenan de forma diferente pero, convergen en la hidrólisis de la tercera

proteína del complemento (C3) para eliminar patógenos o sus toxinas (Kinoshita, 1991; Moghimi y Szebeni, 2003; Regueiro González *et al.*, 2006). Las nanopartículas pueden ser reconocidas por las proteínas del sistema del complemento luego de su administración intravenosa y, eliminadas rápidamente de la sangre por las células del sistema de fagocitos mononucleares (Moghimi y Szebeni, 2003).

Por esta razón, este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la bioestabilidad biológica de diferentes NCLs obtenidas en el Capítulo 2 y Capítulo 3: las NCLs blanco clásicas de 50 nm (**Nb**) (Beatrice Heurtault *et al.*, 2002), las NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica (**NbA-20**), NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica cargadas con TA (**Nao-TA1**), NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida insertado en su superficie (**Nbao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida**), y la formulación combinada NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida cargadas con TA y con BVZ acoplado en su superficie (**Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ**).

En el ensayo realizado en este capítulo, la vía clásica del complemento se activa después del contacto con eritrocitos de oveja sensibilizados, lo que conduce a la lisis de estas células y la liberación de hemoglobina. El fundamento de la técnica empleada, consiste en la determinación de la cantidad de suero capaz de lisar el 50% de un número fijo de los eritrocitos de oveja previamente sensibilizados (CH50) (Basile *et al.*, 2012). El consumo de CH50 es representado como una función del área de las nanopartículas (cm²), lo cual está relacionado al aumento de la concentración de NCLs. El consumo de unidades CH50 se midió a un nivel fijo de SNH en presencia de un área superficial creciente de partículas. Como se puede observar en la *Figura 3.12*, por un lado, las Nb-A20, Nao-TA1 y Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ mostraron un comportamiento similar a las Nb hasta una superficie 1000 cm², consumiéndose entre 20 y 25% de unidades de CH50. Por otro lado, ante la exposición de Nao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida se observó un mayor porcentaje de consumo de unidades de CH50 que ante la exposición de Nb, Nb-A20, Nao-TA1 y Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ. Por último, se observó una alta respuesta del sistema del complemento por exposición a Nao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ

en comparación a la observada ante la exposición de las otras formulaciones de NCLs, en el rango de superficies estudiadas (0-2500 cm²).

Los resultados obtenidos en este estudio pueden relacionarse con la información reportada en bibliografía sobre la activación del sistema del complemento por nanopartículas. En principio, es bien conocido que se exploraron

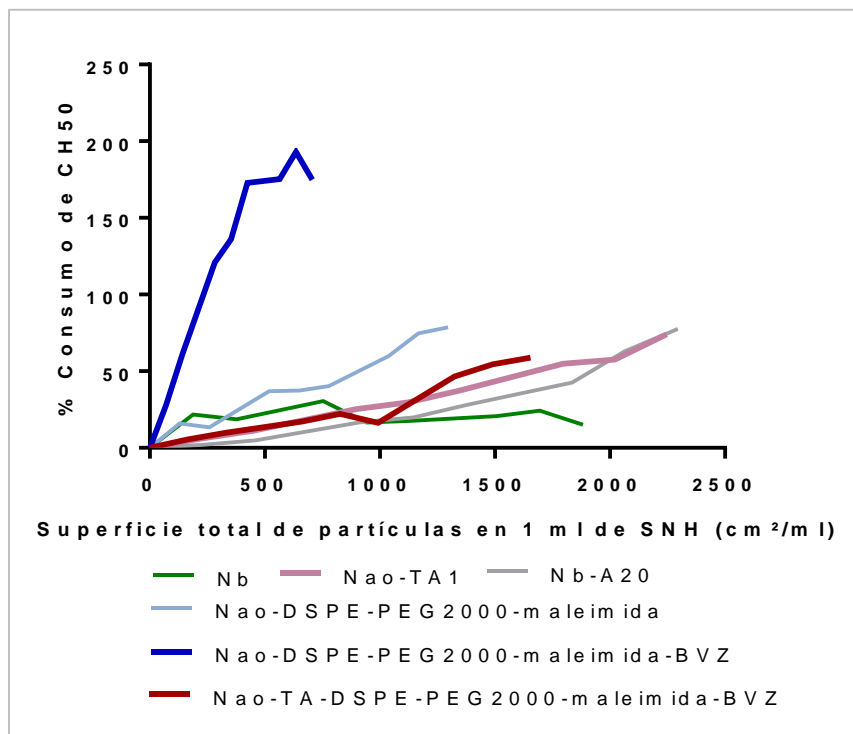


Figura 3.12. Activación del sistema del Complemento por diferentes tipos de Nanocápsulas Lipídicas (NCLs).

El gráfico de líneas representa el porcentaje (%) de consumo de unidades de eritrocitos de oveja previamente sensibilizados (CH50) en suero sormal humano (SNH) a 37 °C. El consumo de CH50 se representa como una función del área de las nanopartículas en cm², lo que se relaciona con el aumento de concentración de las NCLs. Las formulaciones evaluadas corresponden a: las NCLs blanco clásicas de 50 nm (Nb), las NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica (NbA-20), NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica cargadas con TA (Nao-TA1), NCLs blanco con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida insertado en su superficie (Nbao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida), y la formulación combinada NCLs con 20% de ácido oleico en su matriz lipídica y 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida cargadas con TA y con BVZ acoplado en su superficie (Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ).

modificaciones en la superficie de las nanopartículas para protegerlas del mecanismo de reconocimiento del sistema del complemento como el agregado de PEG. En este sentido, se demostró que los derivados lipídicos de PEG pueden ser usados para obtener portadores de larga circulación dado que sus cadenas pueden formar una capa hidrófila protectora en la superficie de las nanopartículas que impide la interacción con los componentes de la sangre (Allen *et al.*, 1991; Woodle y Lasic, 1992; Woodle, Newman y Cohen, 1994; Moghimi y Szebeni, 2003; Owens y Peppas, 2006; Basile *et al.*, 2012).

En relación a las NCLs, en un estudio realizado por Vonarbourg y cols., se observó que las NCLs de 50 nm mostraron una baja activación de las proteínas del complemento a bajos valores superficiales (hasta 1000 cm^2) (Vonarbourg *et al.*, 2006), demostrando que la activación de estas proteínas por las NCLs es tamaño dependiente y, que la presencia de una capa de PEG sobre la superficie de NCLs no cambia el comportamiento de las nanopartículas. A su vez, demostraron que pequeñas cadenas de PEG (PEG 660) en las NCLs, protegen a las mismas de la activación del complemento. Sin embargo, estos autores demostraron que cuando se utilizó el modificador PEG de alto peso molecular, se produjeron NCLs más grandes (alrededor de 10 nm mayores) y se favoreció la activación de proteínas, debido a la mayor facilidad que tienen para adsorberse en superficies mayores. En este sentido, estos hallazgos son comparables con el comportamiento observado para Nao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida y Nao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ, obtenidas en este Trabajo de Tesis. No obstante, en el caso de la formulación combinada Nao-TA-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ, aunque el TMP es mayor a las Nb clásicas y comparable a Nao-DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-BVZ, la activación del complemento puede estar disminuida por la acción corticosteroide del TA.

De este modo, los valores obtenidos para la formulación combinada y NCLs cargadas con TA podrían ser despreciados y esperar una mínima activación del sistema del complemento luego de la administración parenteral de esta clase de nanopartículas. Cabe destacar que para el tratamiento de las neovascularizaciones intraoculares, si bien las NCLs serían administradas vía intravítrea, éstos resultados muestran que en el caso de que las formulaciones alcancen circulación sistémica, la

activación del sistema del complemento sería potencialmente baja. A su vez, los mismos podrían tomarse en cuenta en el caso que las NCLs desarrolladas en este Trabajo de Tesis sean administradas vía intravenosa para el tratamiento de otras patologías en los cuales estos fármacos son utilizados.

Por último, a partir del volumen de formulación que se inyecta en experimentos *in-vivo* se calcula la superficie de NCLs, ya que no existe un área óptima establecida para las mismas. De este modo, se determina la zona de la curva área/activación en las que es posible trabajar.

3.5-CONCLUSIONES PARCIALES

Teniendo en cuenta que el BVZ presenta limitaciones en la obtención de formas farmacéuticas, los objetivos del Capítulo fueron satisfactoriamente alcanzados. Luego del análisis y discusión de los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones parciales en relación a las NCLs-BVZ:

- *El método de post-inserción resultó adecuado para la obtención de NCLs con superficie modificada mediante la inserción de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, y la conjugación con BVZ.*
- *La unión entre el polímero insertado en las NCLs y el BVZ se verificó mediante diferentes técnicas.*
- *Se obtuvieron NCLs-BVZ con diferentes cantidades de Ac conjugado en su superficie, con propiedades coloidales aceptables y capaces de interaccionar con el antígeno específico.*
- *Mediante estudios in-vitro, se demostró la capacidad de disminuir la formación de túbulos, permitiendo inferir la eficacia de su efecto antiangiogénico.*

En consecuencia, se puede concluir que las NCLs constituyen un sistema prometedor para la vehiculización de BVZ en el segmento posterior, en el cual el Ac es incorporado a una estructura de mayor tamaño que potencialmente disminuiría la eliminación del fármaco en la cavidad ocular prolongando su tiempo de

permanencia y, de esta manera, tendiendo a mejorar el tratamiento de las neovascularizaciones oculares.

En cuanto a la formulación combinada de NCLs cargadas con TA y BVZ, se establecen las conclusiones parciales:

- *El "método de inversión de fases e inserción en un solo paso" permitió obtener una formulación con TA en el interior de las NCLs y el BVZ acoplado en su superficie.*
- *Además, estas NCLs mostraron una eficacia de encapsulación de TA superior a las de las NCLs-TA obtenidas en el capítulo 2.*

Los resultados obtenidos permiten plantear como proyección de este trabajo tanto la caracterización coloidal de la formulación como así también estudios de biocompatibilidad y estudios de evaluación de la eficacia de una terapia mixta (corticoide + Ac) destinada a patologías de retina.

Por último, de acuerdo a los resultados obtenidos, las PLFs descritas en el presente Capítulo son una alternativa válida para avanzar en estudios de eficacia terapéutica *in-vitro* e *in-vivo*, con el objetivo de verificar su potencial uso en el tratamiento de las neovascularizaciones oculares.

CAPÍTULO 4

ESTUDIOS PRELIMINARES DE
EVALUACIÓN DEL EFECTO
TERAPÉUTICO DE DOXICICLINA EN
LA NEOVASCULARIZACIÓN
INTRAOCULAR



Capítulo 4 : ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE DOXICICLINA EN LA NEOVASCULARIZACIÓN INTRAOCULAR

4.1-MARCO DE REFERENCIA

La neovascularización desempeña un rol importante tanto en los procesos fisiológicos como patológicos oculares, en los cuales, el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) es el responsable de sólo el 50% de los estímulos angiogénicos mientras que otros factores como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF- 1), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β , por su nombre en inglés "transforming growth factor") también participan activamente (Azar, 2006; Lim *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011; Lorenc, 2014). En este contexto, resulta imprescindible ampliar el espectro de potenciales blancos terapéuticos, tanto a nivel celular como molecular, con el fin de desarrollar nuevas estrategias tendientes a recuperar la funcionalidad retinal y la de otras estructuras oculares dañadas en los desórdenes neovasculares.

En este sentido, existen reportes sobre la capacidad de las tetraciclinas de interactuar con enzimas involucradas en el proceso de neovascularización, a partir de la cual se proponen estos fármacos como estrategias para contribuir en su regulación. Las tetraciclinas inhiben las MMPs al reducir su transcripción y activación, y además, al inhibir a la enzima activa (Horwitz *et al.*, 2014). Las tetraciclinas, como grupo terapéutico, son antibióticos de amplio espectro que actúan a nivel ribosómico donde interfieren con la síntesis de proteínas. Además, se ha investigado su participación en procesos tales como la inflamación, la proteólisis, la apoptosis, la quelación de metales, la ionoforesis y el metabolismo óseo (Sapadin y Fleischmajer, 2006).

Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes (Coronato *et al.* 2012), que pueden degradar la elastina, la gelatina y los colágenos I, IV y V; y así facilitar el remodelamiento de la membrana basal y la matriz extracelular, permitiendo que las células endoteliales migren durante la angiogénesis (Samtani *et al.*, 2009). Las MMPs colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) son capaces de escindir al colágeno intersticial dando lugar a colágeno desnaturalizado o gelatina mientras que, las MMPs gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) son aquellas que pueden afectar el colágeno desnaturalizado o gelatina y, también digerir colágenos I, II y III (Sapadin y Fleischmajer, 2006; Coronato *et al.*, 2012).

En particular, la doxiciclina (DX) es un antibiótico semi-sintético del grupo de las tetraciclinas de acción prolongada y bajo costo que se ha utilizado de forma segura durante décadas en farmacoterapéutica (Cox *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013). Además de sus conocidas propiedades antibióticas, se ha reportado que la DX posee propiedades no antibióticas versátiles tales como su rol de inhibidor no selectivo y de amplio espectro de MMPs (Su *et al.*, 2011). La DX actúa como un inhibidor no competitivo de las MMPs al interactuar con los átomos de zinc o calcio dentro del centro estructural de estas proteínas (Samtani *et al.*, 2009). Este fármaco está aprobado por la FDA como un inhibidor sistémico de MMPs para el tratamiento de la periodontitis y la rosácea (Horwitz *et al.*, 2014).

A nivel ocular, diferentes estudios han demostrado que la DX administrada por la vía oral puede inhibir efectivamente la neovascularización ocular mediante la potente inhibición de la actividad de MMPs (Dan *et al.*, 2008; Samtani *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). En el tratamiento de los trastornos corneales, las tetraciclinas inhiben la lisis causada por lesiones químicas en este tejido y otras ulceraciones no infecciosas al inhibir la actividad de MMPs. Por otra parte, se ha reportado que en la inhibición de la neovascularización inducida por VEGF mediante DX, la actividad inhibidora de MMPs sería responsable sólo parcialmente; estando implicada además la vía de señalización PI3K / Akt / eNOS, un mecanismo independiente de MMPs (Su *et al.*, 2013).

En el caso de la neovascularización coroidea, MMP-2 y MMP-9 se localizan en la membrana de Bruch en las áreas de formación de nuevos vasos. Se ha

demostrado que la DX oral obstaculiza eficazmente la progresión de la neovascularización coroidea en un modelo *in-vivo*, sugiriendo que el fármaco alcanza la coroides para atenuar estas enzimas proteolíticas (Samtani *et al.*, 2009).

De acuerdo a los antecedentes expuestos se planteó como hipótesis, que la DX es un potencial adyuvante a ser utilizado en el tratamiento de las neovascularizaciones oculares a partir de su capacidad de inhibir las MMPs. En consecuencia, el objetivo de este capítulo consistió, como paso previo a la incorporación este fármaco en formulaciones farmacéuticas, en evaluar el efecto terapéutico de doxiciclina clorhidrato (DX-CH) en el tratamiento del proceso de angiogénesis ocular como prueba de concepto direccionada a la búsqueda de terapias alternativas.

Para ello, por un lado, se realizaron estudios *in-vitro* para evaluar la toxicidad del fármaco y, su efecto sobre la secreción de MMPs. Por otro lado, se realizaron estudios *in-vivo* para determinar la modificación de la respuesta electrofisiológica luego de su administración. Por último, se realizó un estudio preliminar del efecto del fármaco, en un modelo *in-vivo* de neovascularización inducida por hipoxia.

Los experimentos in-vitro e in-vivo se realizaron en estrecha colaboración con la Dra. María Cecilia Sánchez y su grupo de investigación; en el Departamento de Bioquímica Clínica de esta Facultad y el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología – CIBICI CONICET. En particular, los estudios experimentales in-vitro de toxicidad y efecto terapéutico fueron realizados en colaboración con el Dr. Pablo Barcelona. Los estudios experimentales in-vivo de toxicidad y efecto terapéutico se realizaron en colaboración con la Dra. María Constanza Paz.

Por último, se realizó un estudio de evaluación del efecto del fármaco seleccionado sobre la formación de túbulos en colaboración con la Dra. Mariana Belén Joray en el Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales del Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales y Sustentabilidad José Sanchez Labrador S.J.- IRNASUS-CONICET. Universidad Católica de Córdoba.

4.2-MATERIALES

4.2.1-Doxiciclina y reactivos

La DX-CH fue provista por Parafarm® (Buenos Aires, Argentina). El cloruro de sodio (NaCl) fue provisto por Ciccarelli® (Buenos Aires, Argentina) y el agua por Milli RO System® (Millipore®, Argentina).

El reactivo *3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl2H-tetrazolium bromide* (MTT), los reactivos de zimografía y cultivo celular fueron provistos por Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, MO).

4.2.2-Líneas celulares

Las células de Müller (MGC, por su nombre inglés "*Müller Glial Cells*") son las principales células gliales de la retina y contribuyen a la estructura normal de este tejido y a su homeostasis. Se extienden a través de todas las capas de la retina, desde el límite con el humor vítreo hasta el extremo distal de la capa nuclear externa, y contribuyen a la formación de la membrana limitante interna y de la membrana limitante externa. De la misma manera que las células del epitelio pigmentario retinal, las células de Müller son células fagocitarias y forman parte del mecanismo de defensa del ojo (Del Amo *et al.*, 2017).

El modelo celular de experimentación *in-vitro* fue desarrollado en una línea de MGC humana (MIO-M1) espontáneamente inmortalizada, proporcionada gentilmente por G. Astrid Limb (Instituto UCL de Oftalmología y Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido). Esta línea celular posee las mismas características fenotípicas y funcionales que un cultivo primario de células de Müller, es decir muestra los mismos marcadores antigénicos y la misma respuesta electrofisiológica a glutamato (Lorenc, 2014). Las células se cultivaron en DMEM (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) con 4500 mg/l de glucosa, suplementado con L-glutamina (GlutaMAX, Invitrogen), 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 µg/ml; Invitrogen) a 37 °C con 5% de CO₂.

Por otra parte, células endoteliales aórticas bovinas (BAEC, de acuerdo a su nombre en inglés "*Bovine Aortic Endothelial Cells*") se utilizaron para el ensayo de formación de túbulos. Las mismas fueron cultivadas en medio DMEM

suplementado con 20% de SFB, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, a 37 °C y en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de dióxido de carbono.

4.2.3- Animales

Para los experimentos *in-vivo*, se utilizaron ratones C57BL/6, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad de La Plata y criados en el bioterio del CIBICI-CONICET. Todos los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo las normas de la "Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO) y del Comité de Ética de nuestra Facultad. La autorización para la utilización de animales de experimentación ha sido aprobada por el Comité Evaluador de los Protocolos Experimentales en el Uso de Animales según expediente 15-05-54899 (Resol. HCD 451/07)).

4.3-METODOLOGÍA

4.3.1-Estudios farmacéuticos: determinación de pH y osmolaridad

Las soluciones acuosas isotónicas de DX-CH se prepararon en concentraciones entre 10 µg/ml y 10000 µg/ml para ser utilizadas en cultivos celulares y en estudios *in-vivo*. Los valores de osmolaridad de las soluciones resultantes se midieron y corrigieron con el propósito de administrar soluciones isotónicas. Estas mediciones se realizaron con un osmómetro de presión de vapor (Vapro Model 5600, ELITechGroup WESCOR[®], USA), utilizando soluciones estándares de 100, 290 y 1000 mosmoles / kg. Ambos valores se midieron por triplicado en todas las formulaciones y cuando resultó necesario, la osmolaridad se reguló con NaCl. Se prepararon soluciones isotónicas de NaCl 0,9% (vehículo) para ser utilizados como control de los estudios. Los valores de pH de las soluciones a administrar se determinaron utilizando un pHmetro Mettler Toledo[®] (Ohio, USA). Tanto para estudios *in-vivo* como *in-vitro*, todas las formulaciones fueron esterilizadas con un filtro de 0,22 µm (Minisart[®]) en campana de filtración vertical.

4.3.2-Estudios *in-vitro*

4.3.2.1-Viabilidad celular: estudio de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl2H-tetrazolium bromide (MTT)

Se realizaron estudios de la toxicidad de DX en cultivo celular con el objetivo de encontrar concentraciones seguras del fármaco para la posterior evaluación de su efecto terapéutico. Por un lado, las células MIO-M1 fueron incubadas con soluciones isotónicas de DX-CH en un rango de concentraciones de 10 µg/ml a 10000 µg/ml, con SFB y sin SFB. La citotoxicidad de las mismas fue evaluada mediante el ensayo de MTT por quintuplicado.

Brevemente, se sembraron 3000 células por pocillo dispersas con 100 µl de medio con SFB. Las células en confluencia, se incubaron a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) con 100 µl de soluciones isotónicas de DX-CH. Luego del tiempo determinado, se agregó 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y, la placa se incubó en oscuridad durante 3 horas a 37 °C. A continuación, se retiró cuidadosamente el medio y se agregó 200 µl de dimetilsulfóxido. Los valores de absorbancia se midieron a 560 nm usando un lector multiplaca. El porcentaje de viabilidad celular se calculó respecto a la absorbancia de células cultivadas en ausencia de DX-CH (células control).

4.3.2.2-Evaluación *in-vitro* del efecto de DX-CH sobre las MMPs

Para analizar el efecto de DX-CH sobre la actividad de gelatinasas extracelulares (MMP-2 y MMP-9) secretadas, las células MIO-M1 se incubaron con DX-CH en un rango de concentraciones de 10 µg a 100 µg/ml, durante 72 horas. Los medios de las células se recolectaron y liofilizaron para luego ser resuspendidos en un volumen menor. Posteriormente, se analizaron mediante ensayos de zimografía en geles co-polimerizados con gelatina. Por último, se tomaron fotos de los geles, y las bandas claras fueron cuantificadas con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

4.3.2.3-Evaluación *in-vitro* del efecto de DX-CH sobre la formación de túbulos

Para analizar el efecto de DX-CH sobre la formación de túbulos se utilizó la técnica desarrollada por Arnaoutova y Kleinman (Arnaoutova y Kleinman, 2010). Las células BAEC en fase logarítmica y con una confluencia del 80% se colocaron en una placa de 96 pocillos "media área", previamente recubiertos con 25 μ l de *Matrigel* reducida en factores de crecimiento y libre de rojo de fenol (CORNING®); a una densidad de 15000 células por pocillo. Las células se incubaron con DX-CH en concentración de 50 μ g/ml y VEGF (BPS Bioscience) a una concentración de 10 ng/ml durante 24 horas a 37 °C y en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de dióxido de carbono. Como control negativo las células se incubaron con una solución de NaCl 0,9% (vehículo) mientras que, como control positivo de inhibición de formación de túbulos se empleó suramina sódica (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 30 μ M. Todas las concentraciones mencionadas hacen referencia a la concentración final en el pocillo. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio invertido (Olympus® CKX41), y se analizaron con el programa ImageJ.

4.3.3-Estudios *in-vivo*

4.3.3.1-Evaluación de la toxicidad *in-vivo* de DX-CH

Para evaluar la funcionalidad retinal *in-vivo* luego de la administración de DX-CH se utilizaron ratones C57BL/6J de 5 meses de edad expuestos a ciclos de luz/oscuridad. Los animales fueron inyectados (1 μ l) vía intravítrea con soluciones de DX-CH de 1000 μ g/ml y 10000 μ g/ml, respectivamente, durante el ciclo de luz. A continuación, nuevamente, los animales fueron expuestos a ciclos de 12 horas luz /12 horas oscuridad. A los 3, 15 y 30 días posteriores a la inyección (P3, P15 y P30; respectivamente) se realizaron los estudios electrofisiológicos de retina y, a continuación, la eutanasia de los animales para su evaluación histopatológica. Se analizaron por lo menos 3 animales (6 ojos) para cada tiempo de análisis. Como control, se inyectaron animales con solución *buffer* PBS vía intravítrea.

4.3.3.2- Modelo de retinopatía inducida por oxígeno

El modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR por su nombre en inglés "*Oxygen induced Retinopathy*"), publicado por Smith y col. (Smith *et al.*, 1994) y ampliamente caracterizado, se utilizó para reproducir las características de desórdenes neovasculares retinales como el prente en la ROP y la RD proliferativa (Figura 4.1). Para ello, ratones C57BL/6 en el día 7 Postnatal (P7), fueron colocados junto a sus madres en una cámara con oxígeno al 75% (O₂ 75%) durante 5 días. El oxígeno se comprobó dos veces al día con un analizador (Teledyne Analytical Instruments, CA, USA). A continuación, los animales fueron colocados durante otros 5 días a oxígeno ambiental (O₂ 21%), período en el que transcurre en relativa hipoxia respecto del anterior y, durante el cual se activa la neovascularización en este modelo. Luego, se procedió a la enucleación de estos animales (P17) para la obtención de tejido retinal y su posterior análisis.

En este trabajo, en P7 los animales fueron inyectados con una solución de DX-CH a una concentración de 5 mg/ml, y con solución *buffer* PBS como vehículo (control). El tejido ocular enucleado fue procesado para estudios de zimografía. Previamente, la respuesta electrofisiológica retinal fue evaluada por electroretinografía. Se utilizaron al menos tres ratones por grupo (6 ojos).

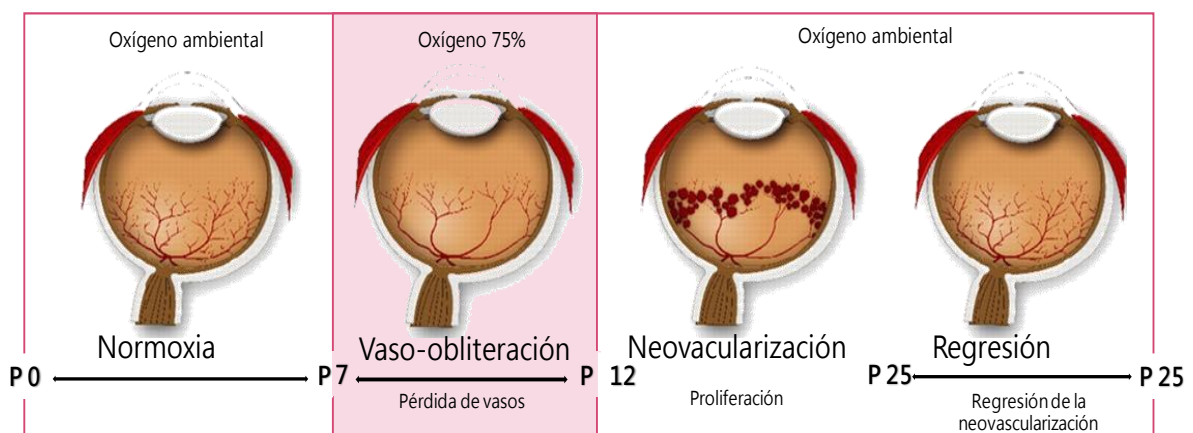


Figura 4.1. Modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratones C57BL/6
(Adaptación Stahl y cols.)

4.3.3.3-Inyección de los animales

Los ratones fueron anestesiados con inyecciones intraperitoneales de 0,5 ml/kg de una mezcla que contiene 100 mg/ml de ketamina, 20 mg/ml de xilazina y 10 mg/ml de acepromacina, tanto en el estudio de toxicidad como en el modelo de OIR. Posteriormente, los ojos fueron tratados con una solución de proparacaína (anestésico local). Las inyecciones intraoculares (*Figura 4.2*) se realizaron bajo un microscopio quirúrgico, utilizando una jeringa Hamilton™ acoplada a una aguja especial 30G de punta roma, que ocasiona un daño mínimo al ojo. Se inyectó un volumen de 1 μ l, a fin de evitar daños en la retina. Luego, se aplicó un antibiótico local sobre la superficie de cada ojo inyectado.



Figura 4.2. Inyección intravítrea

4.3.3.4-Estudios electrofisiológicos

Ratones C57BL/6 fueron adaptados a la oscuridad durante toda una noche. A continuación, los animales se manipularon bajo luz roja tenue debido a que la retina presenta principalmente fotorreceptores bastones, los cuales son poco sensibles a esta luz recuperando la adaptación lentamente. Los animales fueron anestesiados con inyección intraperitoneal de 0,5 ml/kg del cóctel descrito en el apartado anterior. Las pupilas fueron dilatadas con tropicamida al 1% (Midril®, Alcon®, Buenos Aires, Argentina) y la córnea se lubricó con un gel constituido por

0,4% de polietilenglicol 400 y 0,3% propilenglicol (Systane[®], Alcon, Buenos Aires, Argentina) para prevenir el daño en ese tejido. Los ratones fueron expuestos al estímulo de luz a una distancia de 20 cm dentro de un campo *Ganzfeld*. Se insertó un electrodo de referencia en la parte posterior de la cabeza entre las orejas, un electrodo conectado a tierra en la cola y, el electrodo de plata (electrodo activo) se colocó en contacto con la córnea central. Los electrorretinogramas se registraron simultáneamente en ambos ojos. Se amplificaron, filtraron (1,5 Hz filtro de baja frecuencia, 1000 Hz filtro de alta frecuencia) y promediaron (Akonic BIO-PC[®], Argentina) diez respuestas a destellos de luz blanca no atenuada (5 cd.s/m², 0,2 Hz) de un fotoestimulador (diodos emisores de luz) ajustado al máximo brillo.

La onda-a se midió como la amplitud desde el inicio del registro hasta la máxima depresión de la deflexión negativa y, la amplitud de la onda-b se midió desde la depresión de la onda-a hasta el pico de la onda-b. Los tiempos implícitos de las ondas a y b se midieron a partir del tiempo de presentación del flash hasta el canal de la onda-a o el pico de la onda-b, respectivamente. Los potenciales oscilatorios (OPS, por su nombre en inglés "*Oscillatory Potentials*") se promediaron en un solo valor.

Tanto en el modelo OIR como en la evaluación de funcionalidad retinal del estudio de toxicidad de DX-CH *in-vivo*, las respuestas retinales de los ojos de los animales tratados con fármaco y aquellos inyectados con vehículo, se analizaron individualmente.

4.3.3.5-Extracción de retinas

Las retinas neurales de los ratones expuestos al modelo de OIR, sacrificados a distintos tiempos, se diseccionaron entre las capas del epitelio pigmentario retiniano y la coroides y, a continuación, se lavaron y almacenaron a -80 ° C hasta su utilización.

Una vez descongeladas, fueron sonicadas y homogenizados con *buffer* de lisis: Tris 0,0625 M, pH=6,8; 12,5% de glicerol y 1,25% de dodecilsulfato de sodio (SDS) con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y un cóctel inhibidor de proteasa

sin quelantes metálicos (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO) (Sanchez *et al.*, 2006). Luego, los lisados fueron centrifugados a 1000 rpm y 4 °C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron recolectados y la concentración de proteínas fue determinada por el método Micro BCA[™].

4.3.3.6-Criosección y estudios histopatológicos

Para la preparación de cortes, los ojos de los ratones se enuclearon y fijaron durante 2 horas con 4% de paraformaldeído a temperatura ambiente (Sanchez *et al.*, 2007; Lorenc *et al.*, 2017). A continuación, se incubaron en gradiente de sucrosa 10% (24 horas), 20% (5 horas) y 30% (5 horas) en buffer PBS a 4 °C. Luego, los ojos fueron incluidos en OCT (Crioplast[®], Biopack, Buenos Aires, Argentina) en matriz metálica y, mediante un criostato, se obtuvieron secciones seriales de 10 µm de espesor de tejido ocular, que luego se almacenaron a -80 °C. Finalmente, las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina, y se analizaron por microscopía óptica (Olympus[®] BX41 Microscope; Infinity 1[®] Camera).

4.3.3.7-Zimografía

Mediante esta técnica se analizó la actividad enzimática de las MMPs tanto en los extractos de retina como en los sobrenadantes de células MIO-M1 correspondientes a estudios *in-vivo* e *in-vitro*, respectivamente. Para ello, los sobrenadantes de células u homogenatos de retina se sometieron a electroforesis en gel de poli(acrilamida) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 7,5% co-polimerizados con gelatina al 1,5 mg/ml. Las muestras se diluyeron en *buffer* de muestra 5X (Tris-ácido clorhídrico 500 mM, pH=8,0; conteniendo 2% de SDS 2%, 10% de glicerol y 0,001% de azul de bromofenol) y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los geles se hidrataron durante 1 hora con Triton X-100 al 2,5% para eliminar el SDS, y la actividad de MMPs se desarrolló a 37 °C en el buffer enzimático (Tris- ácido clorhídrico 50 mM, NaCl 0,2 M y CaCl₂ 5 mM; pH=7,5) durante 48 horas. Después de la incubación, los geles se tiñeron durante 30 minutos en Azul de Coomassie R250 (0,125%; p/v) disuelto en metanol (45%, v/v) y ácido acético (10%, v/v). La actividad de las MMPs fue visualizada por la

degradación proteolítica de la gelatina como bandas claras respecto al fondo oscuro producto de la tinción de la gelatina. Se utilizaron gelatinas de sangre capilar como control positivo. Las MMP-2 y MMP-9 se identificaron por su tamaño molecular usando marcadores de PM (14,5-200 kDa) (Bio-Rad[®], Hercules, CA). Las zimografías se realizaron en duplicado para las muestras de cultivo celular y, en triplicado para los homogenatos de retina del ensayo *in-vivo*. Las imágenes se digitalizaron y cuantificaron por densitometría mediante el programa ImageJ. La densidad de las bandas se midió por duplicado y se expresó como porcentaje respecto del control.

4.3.4-Análisis estadístico

En todos los ensayos, los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.) de experimentos independientes. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante test t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) y, se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 7.

4.4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1-Soluciones de DX-CH

Las soluciones de DX-CH en una concentración entre 10 y 10000 $\mu\text{g/ml}$ mostraron un pH entre 2,5 y 5, y a su vez, valores de osmolaridad entre 83 y 270 mosm/kg (*Tabla 4.1*) que se corrigieron a valores entre 287 y 300 mosm/kg con NaCl. Las soluciones mostraron valores ácidos de pH conforme al aumento de concentración de DX-CH.

Estos resultados permitieron disponer de los valores necesarios para preparar soluciones compatibles con ensayos biológicos y, además, brindan información valiosa para ensayos de pre-formulación posteriores. Teniendo en cuenta los valores de pH que presentan las soluciones de DX-CH, se puede esperar que su acidez afecte la la integridad y viabilidad celular.

| DX-CH ($\mu\text{g/ml}$) | Osmolaridad (mosm/kg) | pH |
|----------------------------|-----------------------|-------|
| 10 | 298 \pm 2 | 4,626 |
| 20 | 304 \pm 5 | 4,488 |
| 100 | 301 \pm 5 | 3,866 |
| 200 | 288 \pm 2 | 3,612 |
| 2000 | 301 \pm 1 | 3,006 |
| 5000 | 298 \pm 3 | 2,617 |
| 10000 | 290 \pm 2 | 2,355 |

Tabla 4.1. Caracterización de soluciones de Doxiciclina Clorhidrato (DX-CH)

4.4.2-Estudios *in-vitro*

4.4.2.1-Estudio de viabilidad celular

Como punto de partida, se exploró la toxicidad de soluciones de DX-CH en diferentes concentraciones con el fin de encontrar un rango seguro para la posterior evaluación del efecto terapéutico en cultivo celular.

Los resultados del estudio de MTT en células MIO-M1, como se puede observar en la *Figura 4.3*, mostraron que de acuerdo a la norma ISO 10993-9 (International Organization for Standardization (ISO), 2009), la DX-CH es considerada no citotóxica a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ debido que se obtuvo una viabilidad celular mayor al 70% respecto a las células control (células en ausencia de DX-CH), tanto en células incubadas con SFB como en aquellas incubadas sin suero.

El análisis en detalle de los gráficos de la *Figura 4.3* muestra que, luego de 24 horas de tratamiento, la DX-CH reduce la viabilidad celular entre un 40% y 50% en los cultivos tratados con soluciones isotónicas de DX-CH en concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; tanto en ausencia como presencia de SFB. Luego de 48 o 72 horas de incubación, la viabilidad celular se reduce a más del 50%. Estos resultados, podrían estar relacionados tanto con la exposición de las células

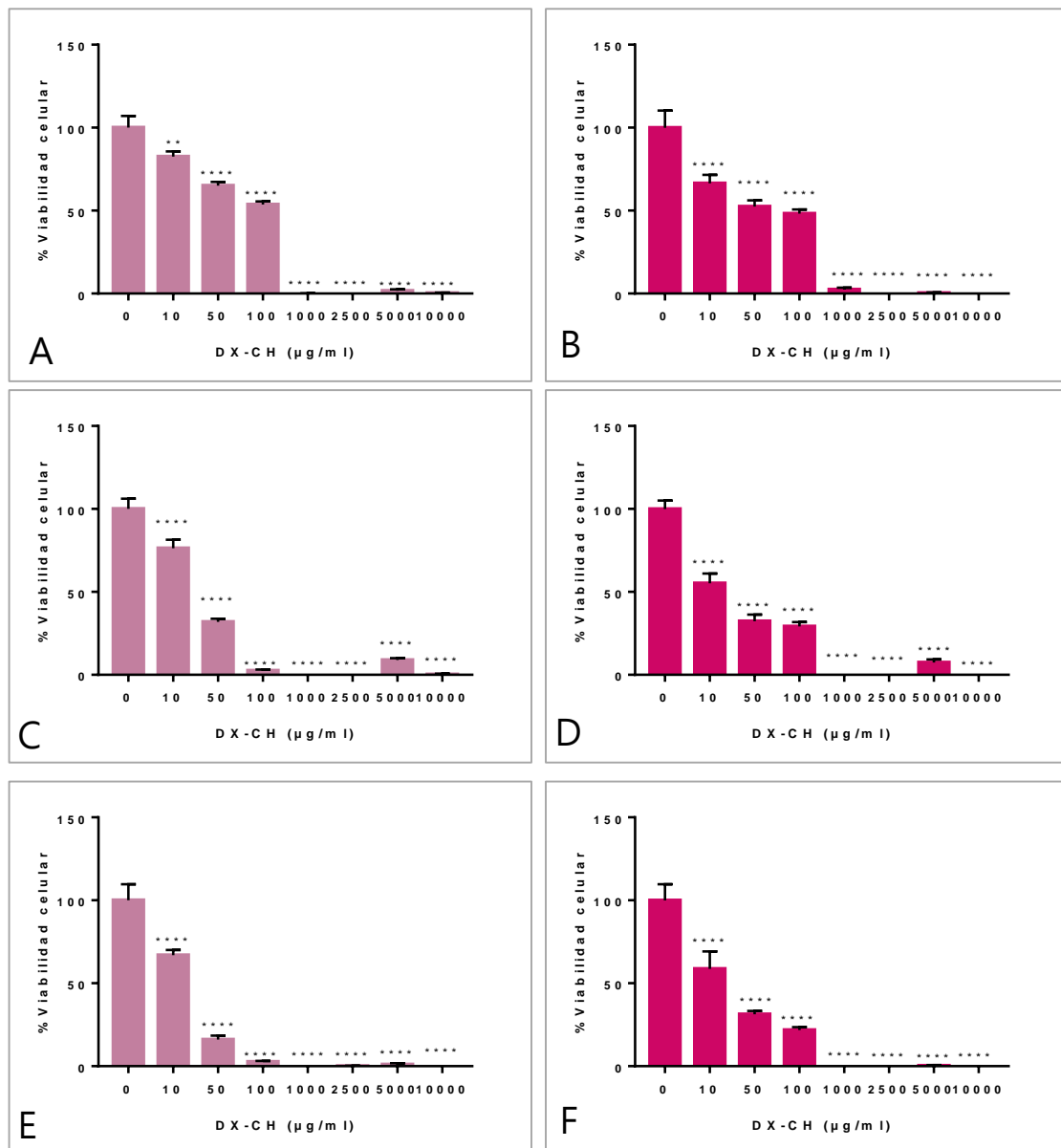


Figura 4.3. . Porcentaje de viabilidad celular obtenidas mediante el estudio MTT en células MIO-M1 incubadas con soluciones isotónicas de Doxiciclina Clorhidrato (DX-CH), en presencia y ausencia de Suero Fetal Bovino (SFB).

Los gráficos de barras ilustran la disminución significativa de la viabilidad celular luego de la incubación con DX-CH (10 a 10000 µg/ml) durante (A y B) 24 horas, (C y D) 48 horas y (E y F) 72 horas; en comparación con células incubadas en ausencia de DX-CH (control negativo). Las células se cultivaron en ausencia de SFB (A, C y E) y en presencia de SFB (B, D y F). Los datos se muestran como la media de cinco experimentos \pm S.E.M, (** $p < 0,005$; **** $p < 0,0005$).

al fármaco como con el pH ácido que presentan las soluciones de DX-CH a concentración elevada de fármaco.

A pesar de que el gráfico muestra que el porcentaje de viabilidad celular tiende a ser menor en las células cultivadas con SFB que para aquellas incubadas en ausencia de SFB a bajas concentraciones de DX-CH, cabe destacar que la absorbancia del primero fue mayor respecto a la del segundo para todos los tiempos de análisis. Las células mostraron un comportamiento esperado, debido a que los nutrientes aportados por el suero favorecen la supervivencia de las mismas y, un mayor número de células implica una mayor absorbancia. Además, se observó que la viabilidad celular tiende a disminuir en ambas condiciones a mayor tiempo de exposición. Los resultados aportados por este estudio son importantes debido a la escasa información reportada sobre la toxicidad de DX en cultivos de células oculares.

En este sentido, una búsqueda sistemática arrojó solo dos artículos que hacen referencia a la biocompatibilidad de DX-CH en los cuales se estudiaron concentraciones comprendidas en el rango explorado en este ensayo en otras líneas celulares diferentes, que coinciden con nuestros resultados. Por un lado, en un estudio *in-vitro* en un cultivo primario de queratocitos obtenidos de estroma corneal, se mostró que este fármaco afecta la viabilidad de estas células en una concentración cercana a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Smith y Cook, 2004). Sin embargo, otro estudio en células epiteliales de córnea humana no mostró evidencia de toxicidad cuando las mismas se trataron con DX 10 $\mu\text{g/ml}$ (Li *et al.*, 2001).

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la solución de DX-CH a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ para el estudio de evaluación de su efecto terapéutico *in-vitro*, debido a que es considerada no citotóxica luego de 24 horas de tratamiento conforme a la mencionada norma ISO. Además, para la evaluación del efecto de DX-CH *in-vitro*, también se seleccionaron las soluciones en concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ a pesar no ser consideradas biocompatibles, debido a que se observa un gran porcentaje de células viables.

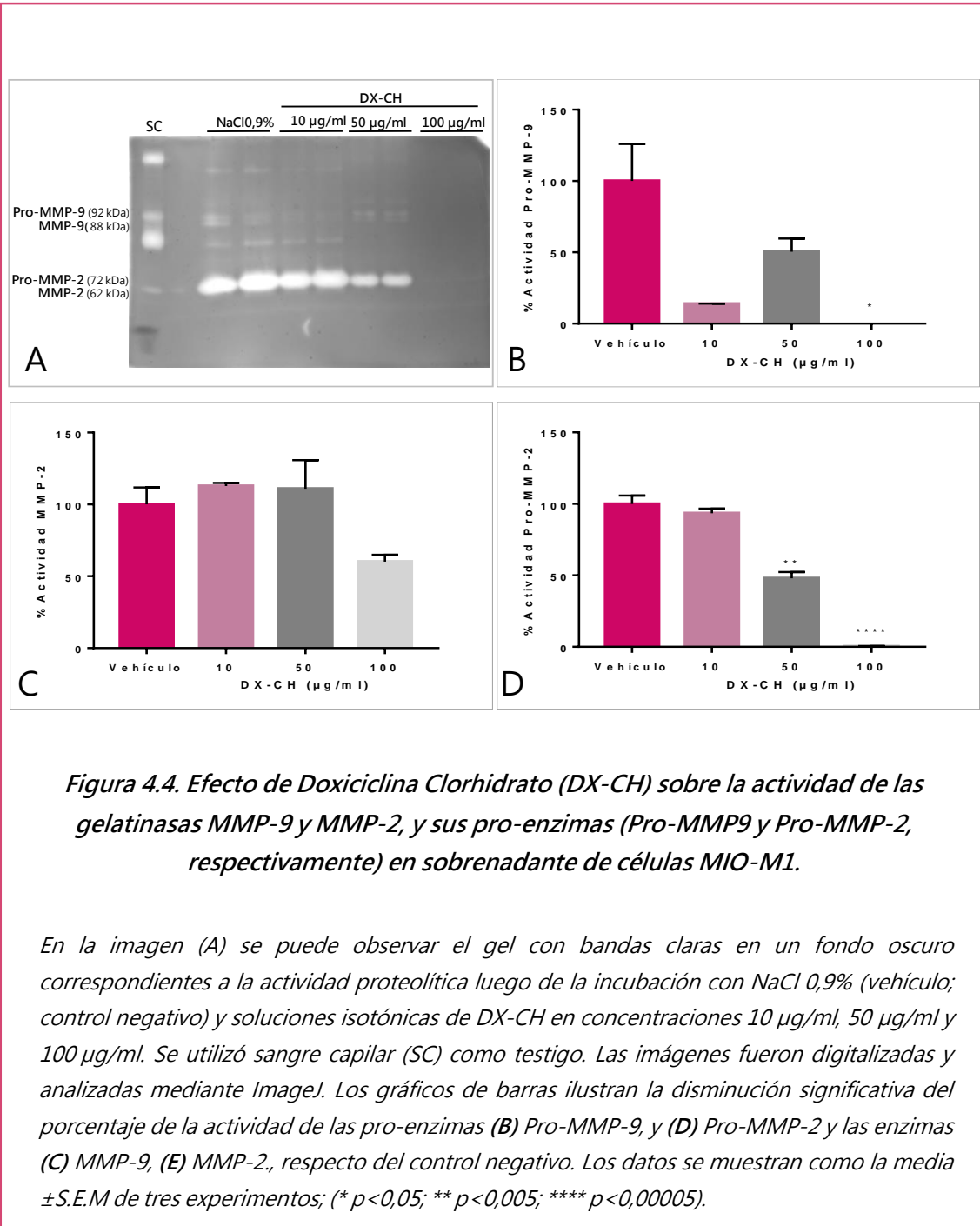
4.4.2.2-Evaluación *in-vitro* del efecto de DX-CH sobre las MMPs

Con el objeto de analizar el efecto de DX sobre la inhibición de las MMPs, cultivos de células MIO-M1 se trataron con dosis crecientes del fármaco y luego, los sobrenadantes se analizaron por ensayos de zimografía. En la *Figura 4.4*, la actividad de las MMPs fue visualizada por la degradación proteolítica de la gelatina como bandas claras respecto al fondo oscuro, producto de la tinción de la gelatina no degradada. Los medios de cultivo de células incubadas sin DX-CH muestran actividad de Pro-MMP-2 y Pro-MMP-9, demostrando que en condiciones basales estas enzimas se encuentran principalmente en su forma de pro-enzima.

Las MMPs son activadas a partir de la ruptura proteolítica del péptido N-terminal de la pro-enzima, la cual es inactiva en condiciones normales debido a que el dominio propéptido "cierra" el dominio cisteína que controla la actividad enzimática. En la zimografía, el detergente SDS origina un cambio conformacional desnaturizante y reversible promoviendo la apertura del sitio activo de la enzima. De esta manera, la pro-enzima conserva su tamaño molecular, diferenciándose de la forma activa y preservando su actividad gelatinolítica en el ensayo zimográfico (Birkedal-Hansen *et al.*, 2002; Novoa-Herrán y Sánchez-Gómez, 2011) y, por lo cual, se observan bandas de Pro-MMPs activas en los geles.

Cuando los cultivos se trataron con DX-CH, se observó una disminución de la actividad de Pro-MMP-2 y Pro-MMP-9, conforme al aumento de la dosis de fármaco utilizada. En ese sentido, las bandas de Pro-MMP-2 disminuyeron en los carriles sembrados con sobrenadantes de células tratadas con 50 µg/ml respecto a aquellos en los cuales fueron tratadas con 10 µg/ml mientras que, no se observaron bandas en los carriles correspondientes al tratamiento con 100 µg/ml.

A su vez, se apreció una banda menor debajo de la banda Pro-MMP-2, correspondiente a la MMP-2 activada (62 kDa). Esta banda y una banda de 92 kDa correspondiente a la MMP-9 activa de los carriles sembrados con sobrenadantes de células tratadas con DX-CH fueron detectables en el análisis densitométrico, a pesar de que son poco perceptibles a la visión en la imagen. La actividad de MMP-9 (88 kDa) se puede visualizar en el gel debajo de la actividad de la Pro-MMP-9



correspondiente a una banda de menor intensidad, sin embargo, para evitar errores en la discriminación de la forma activa de MMPs, se tomaron ambas bandas (Pro-MMP-9 y MMP-9) como una sola banda en la cuantificación densitométrica del gel que se representó como actividad de la Pro-MMP-9. Se debe tener en cuenta que las bandas de MMP-2 y MMP-9 no pueden ser evidenciadas con claridad debido a que el sistema celular no fue estimulado para la producción de gelatinasas y solo refleja las condiciones basales celulares. En los gráficos de barras se pueden

observar los resultados del procesamiento de las imágenes. Los resultados se expresaron como el valor promedio de cada condición y las diferencias significativas obtenidas del análisis estadístico (ANOVA de una vía) se muestran respecto al control (NaCl 0,9%; vehículo).

Estos resultados mostraron que la DX-CH tiene un efecto sobre la actividad de Pro-MMP-2 y Pro-MMP-9, demostrando que a medida que aumenta la concentración de fármaco disminuye significativamente la actividad de estas pro-enzimas gelatinasas respecto a la actividad basal resultante de células tratadas con vehículo. La actividad de Pro-MMP-9 tiende a disminuir a un 50% cuando las células fueron tratadas con 50 µg/ml de fármaco, y no se observa actividad de la misma bajo tratamiento con 100 µg/ml ($p < 0,05$). De la misma manera, la actividad de MMP-2 tiende a disminuir conforme aumenta la dosis de DX-CH y, la actividad de Pro-MMP-2 disminuye significativamente en un 50% ($p < 0,05$) y de manera total ($p < 0,00005$) con el tratamiento en concentraciones 50 µg/ml y 100 µg/ml de fármaco, respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados del estudio de citotoxicidad se debe considerar que la disminución de la actividad de las MMPs podría deberse a la disminución de células viables. Sin embargo, cabe destacar que, las células observadas por microscopía de contraste de fases luego de 24 horas de incubación con DX-CH a todas las concentraciones estudiadas y antes de tomar el sobrenadante para su evaluación por zimografía, mostraron características morfológicas normales. A su vez, las células tratadas durante 24 horas con DX-CH en una concentración de 100 µg/ml mostraron disminución total de la actividad de Pro-MMP-2 y Pro-MMP-9 mientras que el estudio de citotoxicidad muestra la presencia del 50% de células viables en estas condiciones. En base a esto, se podría inferir el efecto del fármaco sobre la actividad de estas enzimas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con la inhibición de secreción de Pro-MMP-2 y Pro-MMP-9 de células corneales incubadas con DX reportada en trabajos de otros autores y contribuyen a dilucidar el potencial efecto de DX inhibiendo las MMPs. En este sentido, Sobrin y cols. mostraron una disminución de la actividad de pro-MMP-9 (superior al 70%) en el sobrenadante de células epiteliales de córnea humana tratadas con DX (50 µg/ml) comparada con la

correspondiente a células no tratadas, mediante ensayos de zimografía. Además, en los mismos cultivos tratados con DX se observó una disminución de la actividad de MMP-9 mediante un estudio de actividad enzimática (Sobrin *et al.*, 2000). En línea con lo anterior, en otro estudio de zimografía de las mismas células tratadas con DX (10 µg/ml) y una combinación de DX y metilprednisolona, también se observó una marcada reducción en la banda pro-MMP-9, y una disminución mayor de 70% en la actividad de la enzima en comparación con cultivos no tratados mediante el estudio de actividad enzimática (Dursun *et al.*, 2001). En otro trabajo, Li y cols. observaron una reducción de la actividad de MMP-9 en un cultivo primario de células de epitelio de córnea humana incubadas a bajas dosis con citocinas estimulantes (IL-1β y TNF-α) y tratadas con DX (10 µg/ml). Luego de diferentes estudios, estos autores sugirieron que la producción es inhibida solo a nivel de proteína al inhibir la traducción, la secreción o ambas (Li *et al.*, 2001). Por último, Smith y Cook estudiaron el efecto de DX sobre las MMPs corneales y su contribución a los mecanismos de reparación de la superficie ocular, aportando que la inhibición corneal de MMP-2 por DX (100 µM) resultó parcialmente dependiente de calcio (Ca²⁺) pero irreversible (Smith y Cook, 2004).

Por otra parte, en células epiteliales corneales humanas primarias, también se demostró que, la DX (5 - 40 µg/ml) inhibe la producción y actividad de MMP-9 inducida por TGF-β, apoyando la eficacia informada sobre el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular mediadas por MMP-9 (Kim *et al.*, 2005). Más recientemente, el efecto de DX sobre la actividad de la gelatinasa MMP-9 también fue investigado en células epiteliales de pterigión humano incubadas con DX, mostrando una disminución efectiva de la misma de una manera dependiente de la dosis (10 - 1000 µg/ml) (Cox *et al.*, 2010).

Los antecedentes antes mencionados respaldan los resultados obtenidos en el ensayo de evaluación del efecto de DX-CH sobre la actividad basal de MMPs en células MIO-M1 determinada mediante zimografía de este Trabajo de Tesis. Como se mencionó anteriormente, considerando que luego del tratamiento de estas células con 100 µg/ml de DX-CH durante 24 horas se observó que el 50% de las células son metabólicamente activas en el estudio de citotoxicidad y que, en los

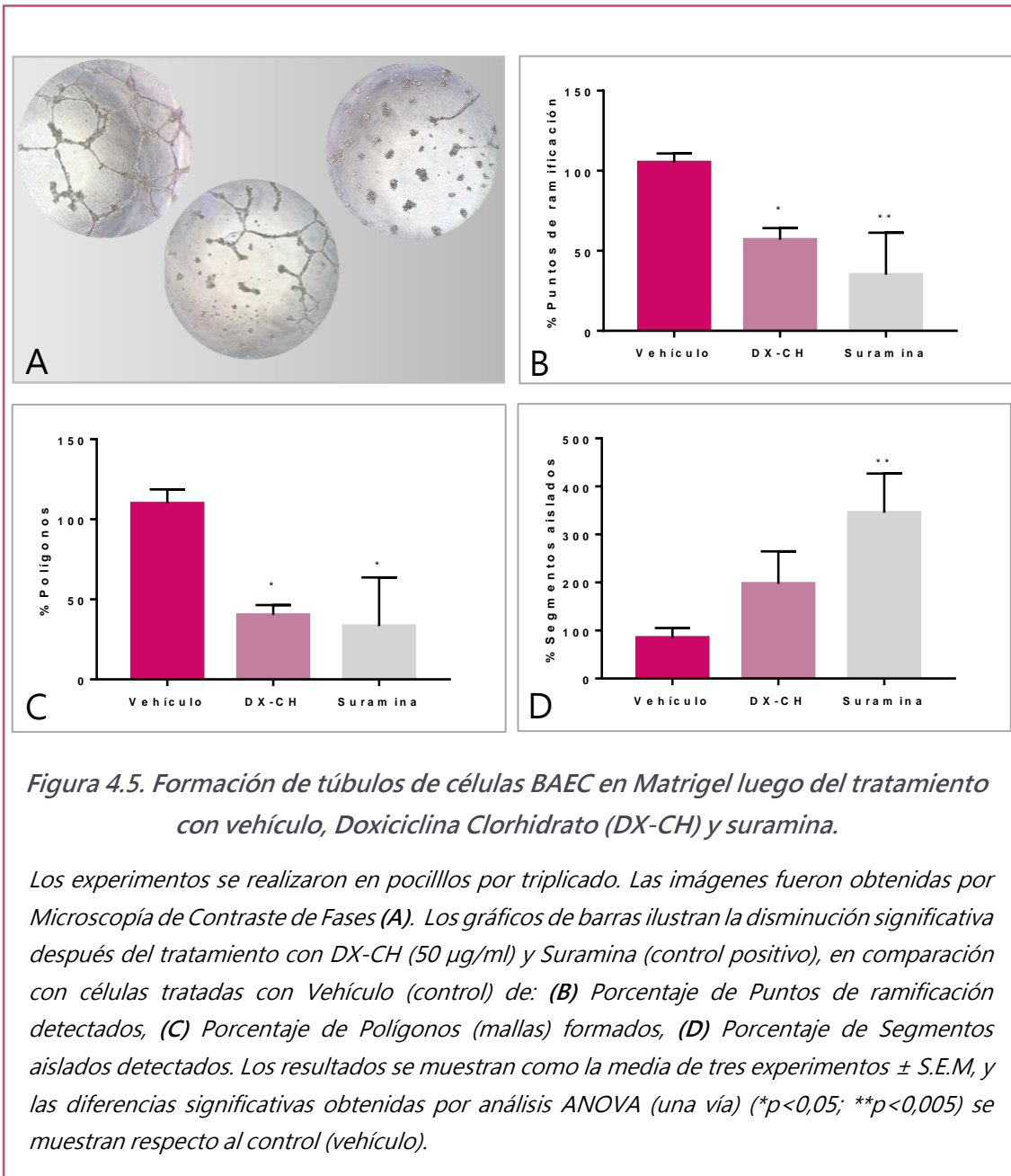
sobrenadantes de las células tratadas con esta dosis disminuyó de manera total la actividad de la Pro-MMP-9 y Pro-MMP-2 se puede inferir que este fármaco inhibe la actividad de las gelatinasas MMP-2, MMP-9 y sus pro-enzimas. En base a estos resultados, se avanzó en las siguientes pruebas de evaluación de efecto terapéutico *in-vitro* e *in-vivo*.

4.4.2.2-Evaluación *in-vitro* del efecto de DX-CH sobre la formación de túbulos

Para evaluar el efecto de DX-CH sobre la participación de las células endoteliales en la formación de estructuras vasculares, se realizó un estudio de formación de túbulos en el cual células BAEC fueron depositadas en pocillos recubiertos con *Matrigel*, incubadas 24 horas con el fármaco y estimuladas con VEGF. El ensayo se realizó en una concentración de 50 µg/ml teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios *in-vitro* anteriores, a pesar de utilizar una línea celular diferente.

Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de contraste de fases y procesadas con el programa ImageJ. En la *Figura 4.5*, se puede visualizar una reducción en el número de estructuras vasculares en las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases de los pocillos incubados con DX-CH respecto al control (NaCl 0,9%; vehículo). En los gráficos de barras se muestran los resultados de la cuantificación de las imágenes, y el análisis estadístico (ANOVA de una vía) respecto al control (NaCl 0,9%; vehículo).

Estos resultados muestran que existe una reducción significativa del porcentaje de puntos de ramificación ($p < 0,05$) y del porcentaje de polígonos ($p < 0,05$) en los pocillos incubados con DX-CH respecto a los obtenidos en las células incubadas con vehículo. Adicionalmente, en línea con estos resultados, se puede observar que el número de segmentos aislados tiende a ser mayor en los pocillos tratados con DX-CH y, es significativamente mayor en aquellos tratados con suramina, un inhibidor de la angiogénesis.



Del mismo modo que en el estudio anterior, se deben tener en cuenta los resultados del estudio de viabilidad celular y considerar que la disminución de la formación de túbulos podría deberse a la citotoxicidad del fármaco. A su vez, no se encontraron reportes bibliográficos sobre el efecto de DX sobre la formación de túbulos de células endoteliales. La búsqueda arrojó solamente un trabajo relacionado, en el cual se demostró que este fármaco reduce la migración de células epiteliales de pterygium y de células endoteliales de la microvasculatura dermal humana (Cox *et al.*, 2010).

En este sentido y a partir del estudio realizado en este capítulo, se puede inferir de manera parcial, un efecto inhibitorio *in-vitro* de la DX-CH en la formación de túbulos de células endoteliales. Sin embargo, el mismo debe ser comprobado mediante otros ensayos con diferentes dosis de fármaco, teniendo en cuenta la regulación del pH de la solución del mismo y, además, conociendo la citotoxicidad del mismo específicamente en estas células. Para dar sustento complementario a la hipótesis planteada sobre el potencial uso de este fármaco como adyuvante en la terapia de las neovascularizaciones, se llevaron a cabo estudios *in-vivo*.

4.4.3-Estudios *in-vivo*

4.4.3.1-Estudio de toxicidad

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in-vitro*, se realizó un estudio *in-vivo* de la toxicidad ocular de DX-CH. Para el mismo, ratones C57BL/6 se inyectaron vía intravítrea con soluciones de fármaco 1000 µg/ml y 10000 µg/ml. Teniendo en cuenta la dilución del fármaco en la cavidad intravítrea, se seleccionaron aquellas soluciones con concentraciones 10 y 100 veces superiores a la mayor concentración administrada en los estudios de cultivo celular en la cual se observaron células viables. Como control se inyectaron animales con una solución de NaCl 0,9% (vehículo). A continuación, con el objetivo de evaluar posibles alteraciones a nivel ocular producidas por la administración de DX-CH, se realizaron estudios de electroretinografía a todos los animales inyectados y, se analizaron los cortes histológicos oculares de los mismos, luego de su eutanasia en los días P3, P15 y P30.

El electroretinograma resultante del estudio de electroretinografía es una señal compuesta generada por la retina en respuesta a estímulos de luz (Smith *et al.*, 2014). La fototransducción, que tiene lugar en los fotorreceptores, es un proceso mediante el cual se traduce la energía lumínica recibida en una serie de señales eléctricas y se transmite mediante sinapsis a las células bipolares y luego, a células ganglionares que conducirán la información hacia el núcleo geniculado mediante un código de frecuencias de descarga de potenciales de acción que finalmente, se

enviarán a la corteza visual primaria. Cuando una parte de la retina se ilumina repentinamente, todas sus células se activan simultáneamente y, las corrientes generadas por ellas se mezclan en el espacio extracelular y el vítreo. Una pequeña parte de la corriente se escapa de la córnea, donde se puede registrar como una caída de voltaje a través de la resistencia extracelular en un electroretinograma (Ogden, 2006).

En una prueba mesotópica en la cual se estudia la respuesta mixta máxima de conos y bastones, el electroretinograma se compone de una deflexión negativa (onda-a) generada por la activación eléctrica de los fotorreceptores, seguida de una deflexión positiva (onda-b), generada por la activación eléctrica de las células bipolares despolarizantes. A su vez, una vez que los componentes lentos generados en fotorreceptores y células bipolares son filtrados, se pueden determinar los OPS. Estos últimos se observan como deflexiones del trazado y, corresponden a la actividad eléctrica generada en neuronas retinianas con capacidad de producir potenciales de acción, células amacrinas y ganglionares.

En este estudio de toxicidad, como se puede observar en la *Figura 4.6*, los electroretinogramas mostraron que a pesar de que existe una disminución en la amplitud de la onda-a de algunos animales inyectados con DX-CH respecto a la de los animales control, la respuesta se recupera en P30 en todos los casos y no se observan diferencias en los tiempos de latencia de la misma. La disminución en la amplitud es significativa para aquellos animales inyectados con 1000 µg/ml de fármaco en P3 ($p < 0,00005$) y P15 ($p < 0,05$) pero, no es significativa para aquellos inyectados con una dosis mayor. Respecto a los OPS, sólo se observa una disminución significativa en la amplitud de los animales inyectados con 1000 µg/ml de fármaco en un solo día de estudio (P15). No obstante, en ningún caso se observan diferencias significativas entre las amplitudes de la onda-b de los animales inyectados con DX-CH en relación a su control en el día de estudio respectivo y ni entre los tiempos de latencia correspondientes a la misma.

En este sentido, se encuentra descrito que la amplitud global del electroretinograma en ratones es sustancialmente menor que el

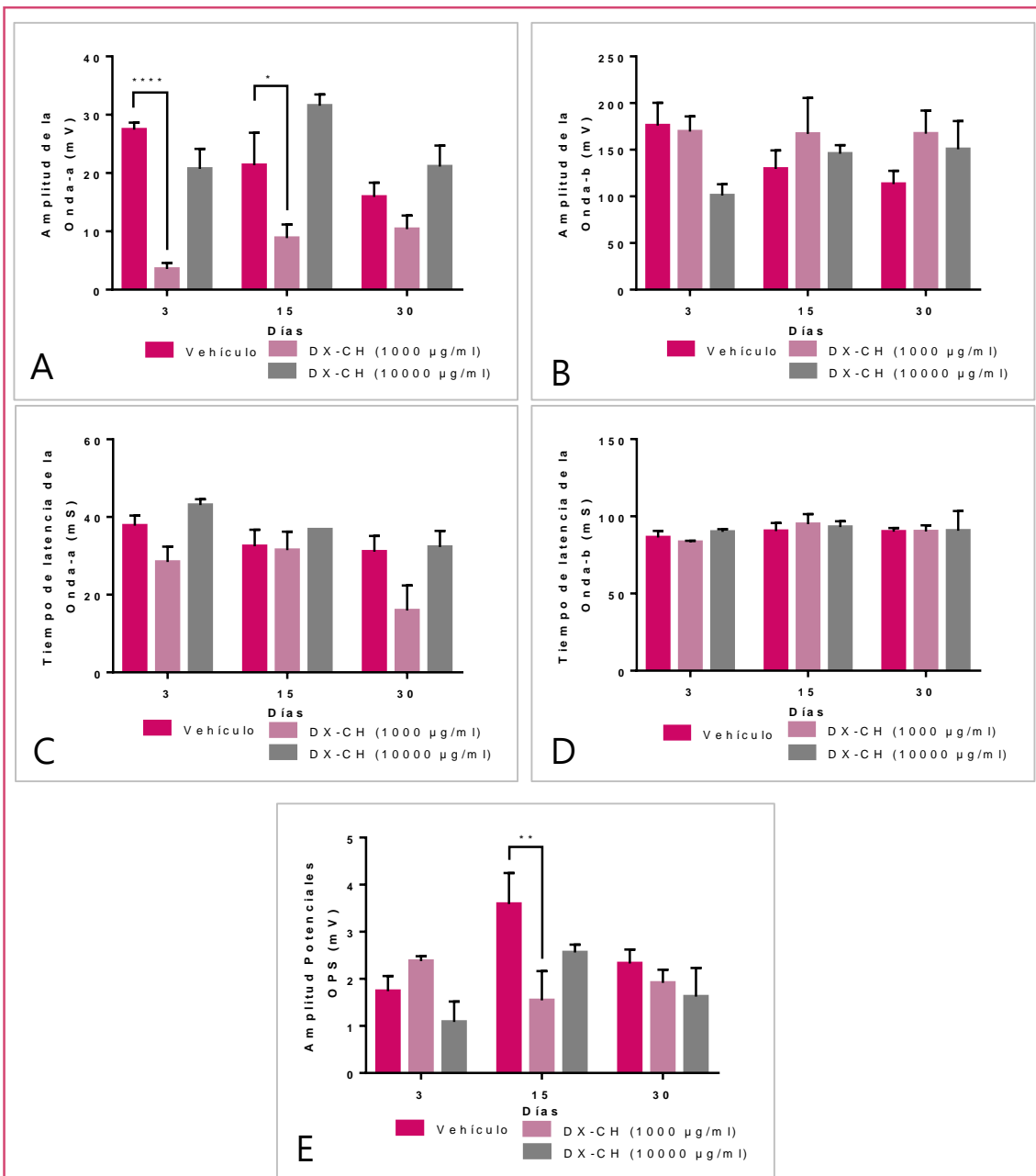


Figura 4.6. Respuesta electrofisiológica de ratones C57BL6 inyectados con Doxiciclina Clorhidrato (DX-CH) vía intravítrea.

Los gráficos de barras muestran los valores de amplitud de la (A) onda-a, (B) onda-b y (E) potenciales oscilatorios (OPS) expresados en milivoltios (mV) y los valores de los tiempos de latencia expresados en milisegundos (ms) de la (C) onda-a, y (D) onda-b correspondientes a los electroretinogramas de animales inyectados con vehículo y soluciones de DX-CH en concentraciones 1000 y 10000 µg/ml, en P3, P15 y P30. Los datos se muestran como la media \pm S.E.M de tres animales por condición en cada día de estudio. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA se expresan respecto a la respuesta del control negativo (vehículo) respectivo de su día de estudio (** $p < 0,005$; **** $p < 0,00005$).

electroretinograma de un ratón adaptado a la oscuridad y, la respuesta generalmente puede estar dominada por la onda de polaridad positiva (onda-b) según la intensidad de la luz entre otras condiciones de estímulo (Pardue y Peachey, 2014). Además, se ha reportado que cambios menores en la onda-a pueden atribuirse a pequeños cambios en los factores externos como por ejemplo la temperatura del animal, la dilatación de la pupila, la hidratación corneal o el estado anestésico (Robson y Frishman, 2014). De acuerdo a esto, la disminución de la amplitud de la onda-a que parece no estar relacionado a la dosis del fármaco, podría estar asociada tanto a los factores externos mencionados como al traumatismo causado por la inyección, el cual ya ha sido descrito anteriormente por otros autores (Becker *et al.*, 2017). A partir de la recuperación de las amplitudes de la onda-a y de los OPS en todos los animales en P30, y que la amplitud de la onda-b de los animales inyectados con DX-CH no presenta variaciones respecto al control se puede inferir que, la administración intravítrea del fármaco a las concentraciones estudiadas no produce alteraciones que afecten la respuesta funcional de la retina a largo plazo.

En cuanto al análisis de los cortes histológicos oculares que se muestran en la *Figura 4.7*, no se observaron diferencias entre los espesores de las diferentes capas de la retina correspondientes a los ojos de los animales inyectados con DX-CH, en comparación a aquellos observados en el control. En línea con los resultados obtenidos en los estudios de electroretinografía en los cuales no se percibieron cambios en la fisiología retinal, tampoco se observaron alteraciones a nivel de la estructura de la retina luego de la administración intravítrea de DX-CH en las concentraciones estudiadas.

Al igual que en los estudios *in-vitro*, son escasos los estudios sobre la toxicidad ocular *in-vivo* de DX. En comparación con nuestro estudio, se ha reportado una disminución significativa de las señales en los electroretinogramas de conejos albinos inyectados por vía intravítrea con 0,1 ml de soluciones de DX en concentraciones mayores a 2500 µg/ml. Sin embargo, cuando los animales se inyectaron con concentraciones menores a 1250 µg/ml, no se observaron cambios en las respuestas de electrofisiológicas ni hubo signos de toxicidad retiniana en los

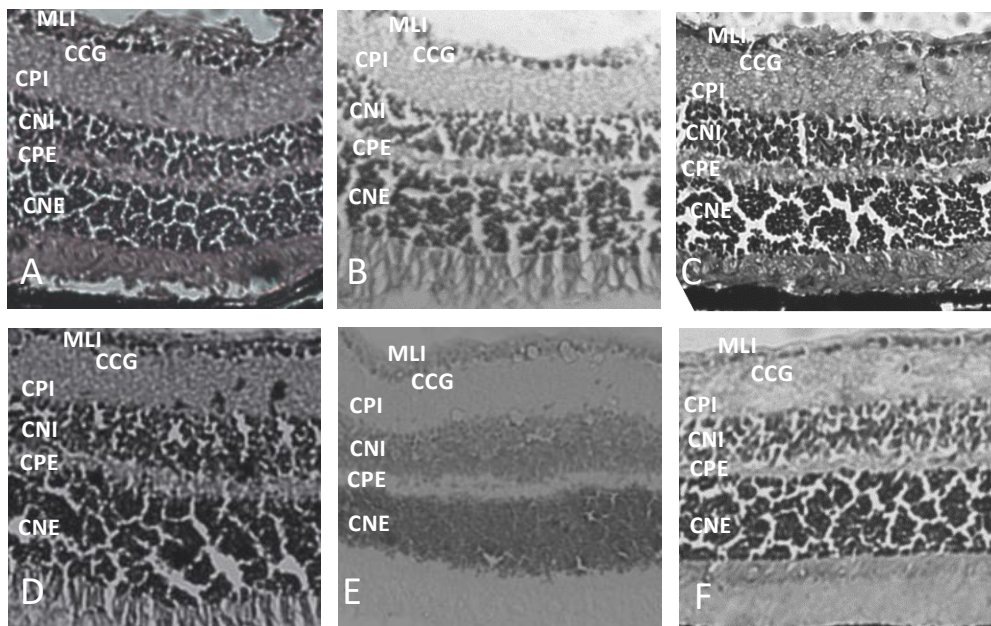


Figura 4.7. Cortes histológicas de retinas de ratones C57BL/6, inyectados con Doxiciclina Clorhidrato (DX-CH) vía intravítrea.

Las imágenes de microscopía óptica de retinas con tinción hematoxilina/eosina de animales inyectados con: (A) vehículo (NaCl 0,9%; control negativo) en P15, (B) DX-CH 1000 µg/ml en P15, (C) DX-CH 10000 µg/ml en P15, (D) Vehículo en P30, (E) DX-CH 1000 µg/ml en P30 y, (F) DX-CH 10000 µg/ml en P30. Magnificación de la imagen: 100X.

Abreviaturas: MLI: Membrana Limitante Interna. CCG: Capa de Células Ganglionares. CPI: Capa Plexiforme interna. CNI: Capa Nuclear interna. CPE: Capa Plexiforme Externa. CNE: Capa Nuclear Externa

exámenes de biomicroscopía, oftalmoscopia indirecta e histología (Aydin *et al.*, 2007). La dosis administrada en los conejos de este estudio es superior a aquella administrada en el estudio de toxicidad en ratones C57BL6 de este capítulo de tesis, sin embargo, se deben tener en cuenta las diferencias anatómicas de las diferentes especies y el factor de dilución del fármaco.

El volumen vítreo relativo es significativamente más pequeño en ojos de ratón en comparación con los ojos humanos (Skeie y Mahajan, 2013), estimándose un valor de 5 µl para ratones de 2 meses, de acuerdo a medidas realizadas por resonancia magnética cuantitativa de alta resolución (Kaplan *et al.*, 2010). Si se considera que el vítreo de los ratones de 5 meses tienen un volumen mayor a 5 µl, la dosis de 1000 µg/ml de DX-CH administrada *in-vivo* sería comparable con los

resultados obtenidos en el estudio de viabilidad celular en HCE tratadas con 100 µg/ml de fármaco. La diferencia observada en los resultados podría deberse a que, aunque las células de Müller son una de las células más resistentes de la retina, en el estudio de cultivo celular se está evaluando únicamente la respuesta de este tipo de células frente a DX-CH. Como contrapartida, en el estudio *in-vivo*, se está evaluando la respuesta de un conjunto de células. Por lo tanto, no se observa evidencia de daño ocasionado por la administración intravítrea del fármaco ya que, el mismo podría estar compensado por la respuesta homeostática del conjunto de células que forman el tejido.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que las soluciones de DX-CH administradas en ratones C57BL6 mediante inyección intravítrea en una concentración igual o menor a 10000 µg/ml, no demostraron evidencia de toxicidad ocular.

4.4.3.2-Estudio del efecto de DX-CH en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno

Con el objetivo de evaluar la eficacia *in-vivo* de DX-CH en la neovascularización ocular, se inyectaron ratones recién nacidos expuestos al modelo OIR con una solución de este fármaco (5000 µg/ml) por vía intravítrea en P12. A continuación, en P17, se evaluó la respuesta electrofisiológica de los animales y el tejido ocular fue extraído para la determinación de la actividad de MMPs en los homogenatos de retina.

La dosis se seleccionó procurando administrar una dosis menor a la mayor dosis evaluada en el estudio de toxicidad *in-vivo*; considerando que el volumen del humor vítreo de los ratones de 5 meses utilizados en el mencionado ensayo es mayor a los de los ratones recién nacidos expuestos al modelo OIR. Como control del estudio, se utilizaron ratones inyectados con vehículo (NaCl 0,9%) expuestos al modelo OIR. Los resultados del electroretinografía presentados en la *Figura 4.8*, mostraron que el tratamiento con DX-CH no modifica la respuesta electrofisiológica de los animales expuestos a OIR respecto al control.

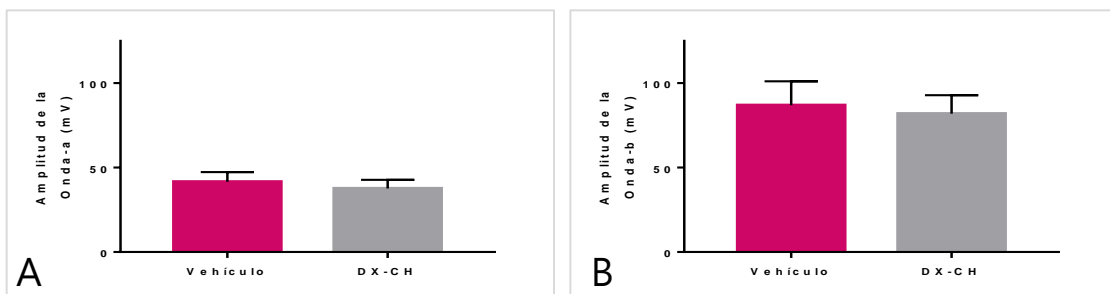
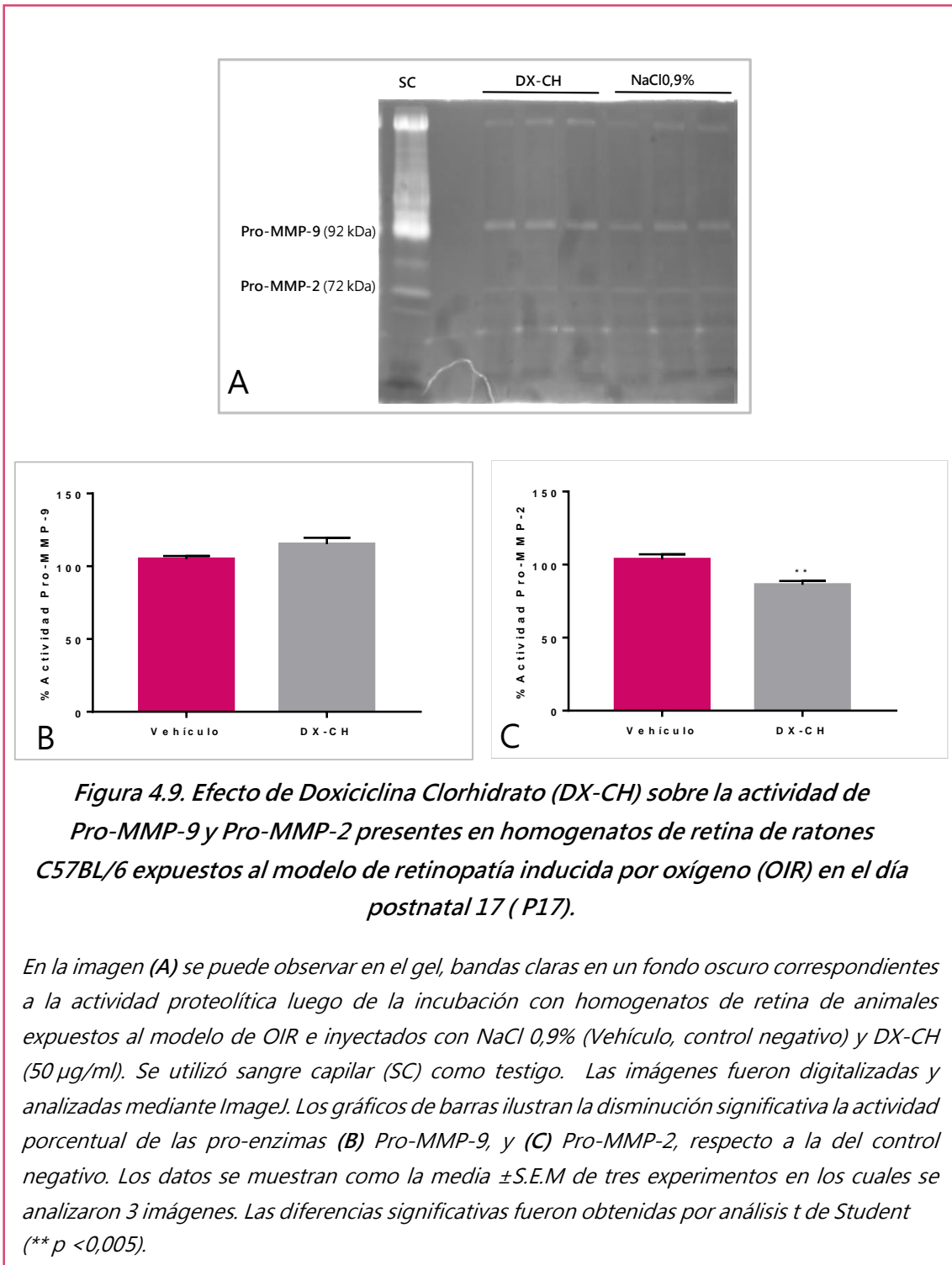


Figura 4.8. Electrorretinografía de ratones C57BL6 expuestos al modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) y tratados con Doxiciclina Clorhidrato (DX-CH).

Los gráficos de barra muestran los valores de la amplitud de (A) la onda-a y (B) la onda-b, de los animales inyectados con vehículo y solución de DX-CH en concentraciones 5000 $\mu\text{g/ml}$ en el día posnatal 12. Los valores de cada respuesta se representan como la media expresada en milivoltios (mV) \pm S.E.M, de tres animales por condición. El análisis estadístico de t de Student demostró que no existen diferencias significativas entre los valores de las amplitudes de las ondas de los animales inyectados con DX-CH respecto al vehículo.

En la *Figura 4.9*, se pueden observar los resultados de la evaluación de la actividad de gelatinasas mediante zimografía en los homogenatos de retina. La sensibilidad del método no permite visualizar de una manera clara diferencias entre la actividad de las enzimas de las retinas de los distintos grupos de animales. El procesamiento de las imágenes mostró una disminución significativa ($p < 0,005$) de la actividad de la Pro-MMP-2 de las retinas de los animales tratados con DX-CH respecto a la correspondiente a la de los animales control. Por otra parte, no se observó una diferencia significativa entre la actividad de la Pro-MMP-9 de las retinas de ambos grupos de animales.

En el mismo sentido, si se comparan los ensayos de zimografía de sobrenadante de células de Müller respecto al de homogenatos de retina, el efecto de DX-CH sobre las gelatinasas es claro en el primero. Sin embargo, en el segundo la sensibilidad de la técnica no permite asegurar el efecto del fármaco sobre la actividad de las MMPs dado que el escenario tisular es más complejo. Se debe tener en cuenta que el nivel de MMPs en el homogenato podría quedar diluido respecto al presente en el sobrenadante celular.



Dado que las MMPs están involucradas en la remodelación tisular y participan activamente en el proceso de neovascularización retinal (Lorenz *et al.*, 2017) el efecto de DX-CH debería completarse con la inmunotinción de la retina completa a fin de evaluar el efecto de este fármaco sobre la vasoclusión y vasobliteración retinal. De acuerdo a los resultados hasta aquí obtenidos, no se

espera observar una disminución marcada sobre la formación de vasos o de ovillos neovasculares, ya que las MMPs tienen una participación parcial en el desarrollo del proceso de neovascularización. Sin embargo, se espera lograr un efecto vascular importante luego de una terapia combinada de un anti-VEGF y un inhibidor de MMPs, debido a que éste último contribuiría y ayudaría a potenciar la acción del primero.

En relación a los resultados obtenidos en este estudio, otros autores han reportado el efecto de la DX en la neovascularización y en lesiones corneales en modelos murinos *in-vivo*. En este sentido, en un estudio se observó que la DX administrada en agua inhibió la neovascularización en ratones en un 50% respecto a la observada en los controles, y un 30% de la neovascularización en un modelo inducido por la implantación de tubos de silicona con células epiteliales de pterigión (Cox *et al.*, 2010). En otro estudio, también la DX demostró que contribuye significativamente en la prevención de la angiogénesis y la inflamación corneal en ratones quemados con álcalis (Ling *et al.*, 2013).

Recientemente, Bian y cols. realizaron un estudio con el fin de evaluar los efectos DX sobre la actividad de la proteasa y las complicaciones producidas en la córnea en un modelo combinado de quemadura alcalina y ojo seco. Los resultados mostraron que las córneas tratadas con DX tópica (0,025%) sanaron más rápido que los controles y presentaron menor número de perforaciones y niveles menores de MMP-9, MMP-13, TIMP-1 y IL-1 β . A su vez, las transcripciones génicas, disminuyeron inmunorreactividad de MMP-1, MMP-9 y MMP-13 y niveles de gelatinasas en la córnea (Bian *et al.*, 2016). Por último, se reportó que la administración tópica de DX (1%) en pacientes, demostró ser efectiva en la reducción de la neovascularización corneal y recuperación de la superficie ocular (Jovanovic y Nikolic, 2014).

A partir de la información proporcionada por los reportes bibliográficos antes mencionados y los resultados *in-vitro* e *in-vivo* obtenidos en este Trabajo de Tesis se considera apropiado, en el marco de perspectivas propuestas, ajustar las dosis de DX-CH para tratar los ratones expuestos al modelo OIR y, como se mencionó

anteriormente, completar la evaluación con un estudio de inmunotinción de retina completa. Además, se propone evaluar el efecto de DX como coadyuvante de terapias anti-VEGF en el modelo OIR.

De este modo, haciendo énfasis en la información recabada se podrá avanzar en diferentes estudios que permitan ponderar la DX-CH como una estrategia válida en el tratamiento de las patologías neovasculares oculares.

4.5-CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos hasta el momento, permitieron arribar a las siguientes conclusiones parciales:

- *La administración de DX-CH vía intravítrea en concentraciones entre 1000 y 10000 µg/ml en ratones C57BL/6, no afecta la funcionalidad retinal a largo plazo ni demostró evidencia de daño histológico.*
- *La DX-CH reduce la actividad de MMP-9 y MMP-2 y de sus respectivas pro-enzimas, tanto en estudios in-vitro en células MIO-M1 como así también en el modelo OIR.*
- *De forma preliminar, la DX-CH mostró actividad anti-angiogénica en células BAEC, la cual debe ser corroborada en otras concentraciones de fármaco para arribar a datos concluyentes.*

Para respaldar estos estudios, se debería estudiar el efecto de la administración de una mayor concentración de DX-CH y realizar una mayor caracterización de la respuesta al tratamiento de los animales expuestos al modelo.

Estos indicios preliminares, hacen un aporte al conocimiento en el área de estudio y permiten sustentar la potencial utilización de DX-CH como opción para terapias combinadas en el tratamiento de patologías que presenten neovascularización ocular. Sin dudas estos hallazgos iniciales, son un punto de partida para ensayos más específicos que se diseñaran como perspectiva del presente Trabajo de Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS



Capítulo 5 : CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

5.1-CONCLUSIONES FINALES

La presente Tesis Doctoral abordó el tratamiento de patologías neovasculares oculares mediante diseño de nuevas plataformas de liberación de fármacos (PLFs) para mejorar la terapia asociada a los fármacos seleccionados. En paralelo, se avanzó en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de terapias alternativas, explorando la aplicación de fármacos con potencial segundo uso farmacéutico. En este sentido se abordó, por un lado, la optimización de terapias convencionales con corticoides y anticuerpos (Acs) anti-VEGF mediante el desarrollo de nanocápsulas lipídicas (NCLs) como portadores de acetónido de triamcinolona (TA) y bevacizumab (BVZ). Por otro lado, se avanzó en estudios de toxicidad de doxiciclina clorhidrato (DX-CH) y, en estudios preliminares de eficacia, con el fin de encontrar dosis terapéuticas que permitan evaluar este fármaco como terapia alternativa en el tratamiento de procesos angiogénicos oculares. En la *Figura 5.1*, se puede visualizar un esquema del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

En relación al desarrollo de PLFs para la vehiculización de corticoides, se obtuvieron NCLs cargadas con TA (NCLs-TA) mediante un diseño experimental minucioso. Las NCLs lipídicas mostraron versatilidad en la modificación de su composición y en la metodología empleada para el cargado del fármaco. Las NCLs modificadas con 20% de ácido oleico o Captex[®] 500p en su núcleo lipídico, mostraron características físicoquímicas y morfológicas similares a las NCLs convencionales. Mediante el método directo se logró una mayor incorporación de fármaco en el sistema y, las técnicas desarrolladas permitieron determinar su

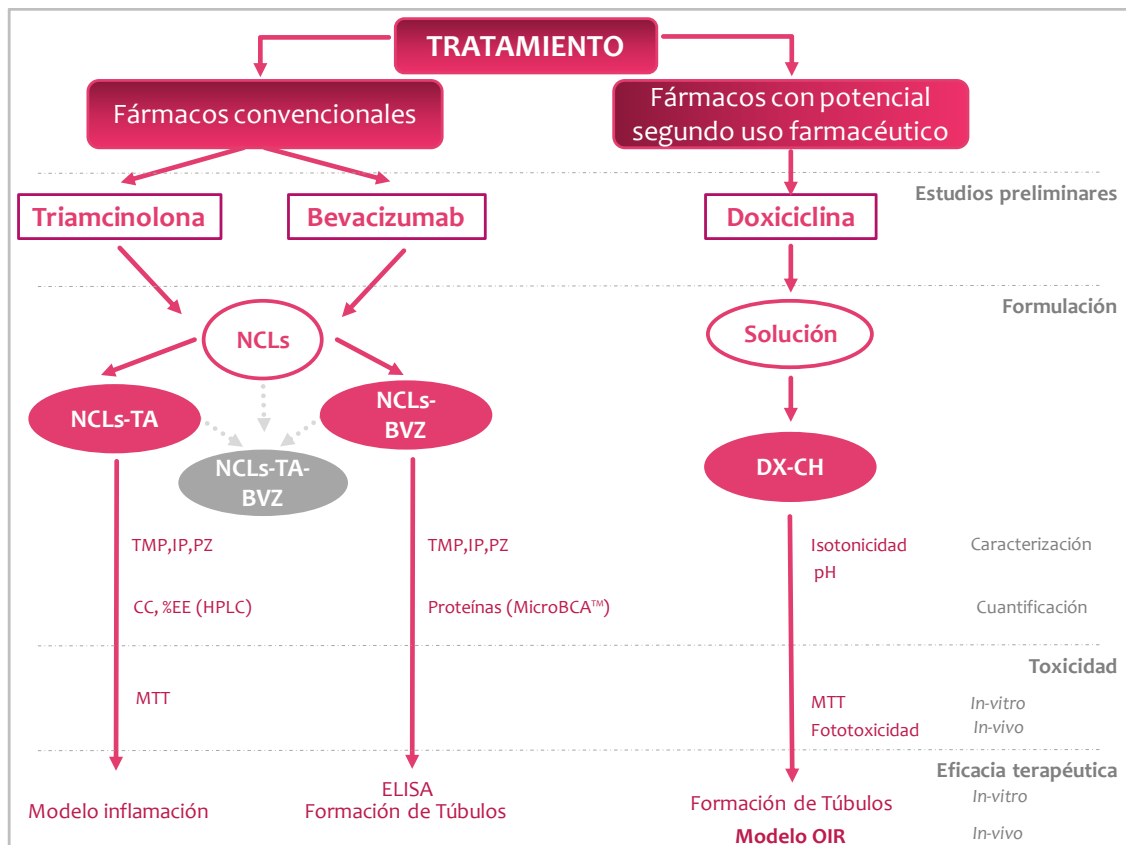


Figura 5.1. Esquema Final del Trabajo de Tesis.

capacidad de carga, eficiencia de encapsulación en la matriz lipídica y, en consecuencia, inferir de manera indirecta la ubicación de TA en la formulación. Además, las formulaciones obtenidas no presentaron variaciones en las propiedades estudiadas evidenciando su estabilidad durante el almacenamiento. Por último, las mismas resultaron no citotóxicas en cultivo celular de células epiteliales de córnea humana y capaces de disminuir la secreción de IL-6, permitiendo presumir su eficacia terapéutica.

En línea con lo anterior, mediante herramientas tecnológicas innovadoras diseñadas a este fin, se obtuvieron NCLs cargadas con BVZ (NCLs-BVZ) como estrategia de vehiculización de fármacos anti-VEGF. Las NCLs convencionales permitieron la funcionalización de su superficie con un polímero bifuncional y su conjugación a BVZ mediante un enlace covalente que fue verificado indirectamente. Las NCLs-BVZ obtenidas mostraron propiedades fisicoquímicas y capacidad de carga conformes a la cantidad de Ac en el nanosistema. A su vez, el BVZ cargado

fue capaz de unirse a su blanco terapéutico evidenciando que el proceso tecnológico utilizado no afecta la actividad de esta biomolécula. Por último, las NCLs-BVZ mostraron una reducción en la formación de túbulos de células endoteliales *in-vitro*, a partir de la cual se puede inferir su efectividad.

En paralelo, los estudios preliminares de obtención de una formulación mixta de NCLs cargada con TA y BVZ, mostraron que el polímero bifuncional favorece la incorporación de TA en las NCLs. A su vez, el estudio de activación del sistema del complemento mostró que a medida que aumenta el tamaño de partícula, el nanosistema tiende a ser menos "invisible" para el sistema inmune y, la comparación entre las respuestas a NCLs-BVZ y a la formulación de NCLs mixta presume la potencial eficacia de esta última debido a la acción del TA.

En cuanto a la prueba de concepto relacionada al efecto de DX-CH sobre la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) como potencial tratamiento de la angiogénesis, se avanzó en estudios *in-vitro* e *in-vivo* tanto de toxicidad como de eficacia terapéutica. Por un lado, la comparación de los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad *in-vitro* con aquellos obtenidos *in-vivo* junto a los escasos reportes bibliográficos, permitieron seleccionar dosis en las cuales no se evidenciaron daños oculares, punto de partida esencial para la posterior evaluación del efecto terapéutico del fármaco.

Por otro lado, los resultados del tratamiento de cultivos celulares con DX-CH permitió demostrar el efecto del fármaco sobre la actividad de las MMPs teniendo en cuenta los resultados de citotoxicidad. A su vez, en el estudio de angiogénesis *in-vitro* se determinó de manera parcial la capacidad de DX-CH de inhibir la formación de túbulos. Aunque los resultados obtenidos, son considerados como preliminares, se consideran satisfactorios a los alcances de la tesis y permiten establecer las bases para la continuación del trabajo. Por un lado, se puede presuponer que la dosis de DX-CH no es suficiente para lograr un efecto *in-vivo*, y por otro, que el efecto de DX-CH contribuye a la inhibición de la neovascularización pero como terapia única no es suficiente. Al mismo tiempo, resulta interesante evaluar el efecto del fármaco luego de ser administrado en distintos horarios dado que la fisiología ocular cambia drásticamente entre los ciclos luz/oscuridad, ya que

la misma es regulada por los relojes circadianos y, en consecuencia, podría influenciar en el efecto del fármaco.

En base a todo lo anteriormente discutido, se establecen las siguientes CONCLUSIONES FINALES del presente Trabajo de Tesis:

- *Se obtuvo una formulación de NCLs-TA estable, con efectos antiinflamatorios y no citotóxica en células oculares a las concentraciones estudiadas, que permitió la incorporación del fármaco sin necesidad de de solventes orgánicos.*
- *Se obtuvo una formulación de NCLs-BVZ novedosa y optimizada en su capacidad de carga, con potencial efecto antiangiogénico a nivel ocular.*
- *Se obtuvo una formulación de NCLs mixta (BVZ-TA) como base de una nueva PLFs innovadora.*
- *Se avanzó consistentemente en demostrar el efecto de DX-CH sobre las MMPs a nivel ocular y su efecto antiangiogénico como punto de partida para el diseño de estudios de mayor profundidad.*

En líneas generales, los sistemas nanoparticulados como PLFs obtenidos en este Trabajo, pueden considerarse como una estrategia prometedora que potencialmente mejoren el tratamiento de las neovascularizaciones oculares, relacionada a los fármacos seleccionados y, en consecuencia, tener un impacto considerable en la optimización de la terapia global de estas enfermedades. De la misma manera, los estudios relacionados a DX-CH permiten considerarla como una potencial terapia alternativa para el tratamiento de las patologías mencionadas.

5.2-PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis establecen las bases para un proyecto interdisciplinario de mayor alcance que comprende desarrollar un esquema de terapia combinada para el tratamiento de patologías oculares que presenten neovascularización.

A mediano plazo, se propone:

- Completar los estudios de evaluación de eficacia terapéutica de los sistemas nanoparticulados obtenidos en el modelo de neovascularización *in-vivo*. Por un lado, se plantea la evaluación de la eficacia de la terapia única de NCLs-BVZ y por otro, terapias combinadas utilizando a las NCLs-TA como coadyuvante de la terapia de BVZ o de NCLs-BVZ. Por último, completar los estudios de obtención y caracterización de la formulación combinada de NCLs cargadas con TA y BVZ, y su correspondiente evaluación.
- Avanzar en el estudio de prueba de concepto de la eficacia de DX-CH en el modelo *in-vivo*. Primero, realizando un ajuste de la dosis del fármaco y a continuación, evaluando la posibilidad de la utilización de DX-CH como coadyuvante de la terapia anti-VEGF establecida, en el modelo OIR.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

A

Achouri, D. *et al.* (2013) «Recent advances in ocular drug delivery.», *Drug development and industrial pharmacy*, 39(11), pp. 1599-617. doi: 10.3109/03639045.2012.736515.

Adem, Y. T. *et al.* (2014) «Auristatin Antibody Drug Conjugate Physical Instability and the Role of Drug Payload», *Bioconjugate Chemistry*. American Chemical Society, 25(4), pp. 656-664. doi: 10.1021/bc400439x.

Aiello, L. P. *et al.* (1995) «Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 92(23), pp. 10457-10461.

Allen, T. M. *et al.* (1991) «Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo.», *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1066(1), pp. 29-36.

Araki-Sasaki, K. *et al.* (1995) «An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 36(3), pp. 614-621.

Araujo, J. *et al.* (2009) «Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery.», *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. United States, 5(4), pp. 394-401. doi: 10.1016/j.nano.2009.02.003.

Araújo, J. *et al.* (2010) «Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications», *International Journal of Pharmaceutics*, 393(1-2), pp. 168-176. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.034.

Arnaoutova, I. y Kleinman, H. K. (2010) «In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract.», *Nature protocols*. England, 5(4), pp. 628-635. doi: 10.1038/nprot.2010.6.

Aydin, E. *et al.* (2007) «Toxicidad retiniana de doxicilina intravítrea: Estudio piloto», *ARCH SOC ESP OFTALMOL*, 82, pp. 223-228.

Azar, D. T. (2006) «Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic

factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis).», *Transactions of the American Ophthalmological Society*. United States, 104, pp. 264-302.

B

Bao-ChengTian *et al.* (2013) «Further investigation of nanostructured lipid carriers as an ocular delivery system: In vivo transcorneal mechanism and in vitro release study», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 102, pp. 251-256. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2012.08.021.

Barret, K. E. *et al.* (2010) *Ganong, Fisiología Médica*. 23.^a ed, *Nature*. 23.^a ed. Editado por I. McGraw-Hill Companies. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.07.010.

Barros, S. M. *et al.* (2016) «A review of solute encapsulating nanoparticles used as delivery systems with emphasis on branched amphipathic peptide capsules.», *Archives of biochemistry and biophysics*. United States, 596, pp. 22-42. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.027.

Basile, L. *et al.* (2012) «Serum-stable, long-circulating paclitaxel-loaded colloidal carriers decorated with a new amphiphilic PEG derivative.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 426(1-2), pp. 231-238. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.038.

Bastiat, G. *et al.* (2013) «A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging.», *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. Netherlands, 170(3), pp. 334-342. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.06.014.

Battaglia, L. *et al.* (2015) «Bevacizumab loaded solid lipid nanoparticles prepared by the coacervation technique: preliminary *in vitro* studies», *Nanotechnology*. IOP Publishing, 26(25), p. 255102. doi: 10.1088/0957-4484/26/25/255102.

Becker, S. *et al.* (2017) «Effect of subretinal injection on retinal structure and function in a rat oxygen-induced retinopathy model.», *Molecular vision*. United States, 23, pp. 832-843.

Beckley, N. S. *et al.* (2013) «Investigation into temperature-induced aggregation of an antibody drug conjugate.», *Bioconjugate chemistry*. United States, 24(10), pp. 1674-1683. doi: 10.1021/bc400182x.

Béduneau, A. *et al.* (2007) «Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments», *Biomaterials*, 28(33), pp. 4978-4990. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.014.

Béduneau, A. (2007) *Immunociblage du cerveau par des nanocapsules lipidiques*, *These*. Université d'Angers.

Beloqui, A. *et al.* (2016) «A comparative study of curcumin-loaded lipid-based nanocarriers in the treatment of inflammatory bowel disease.», *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. Netherlands, 143, pp. 327-335. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.038.

Benayoun, Y. *et al.* (2015) «[Current treatments for corneal neovascularization].», *Journal francais d'ophtalmologie*. France, 38(10), pp. 996-1008. doi: 10.1016/j.jfo.2015.09.006.

Bhuvanewari, R. *et al.* (2011) «Antiangiogenesis agents avastin and erbitux enhance the efficacy of photodynamic therapy in a murine bladder tumor model.», *Lasers in surgery and medicine*. United States, 43(7), pp. 651-662. doi: 10.1002/lsm.21109.

Bian, F. *et al.* (2016) «Differential Effects of Dexamethasone and Doxycycline on Inflammation and MMP Production in Murine Alkali-Burned Corneas Associated with Dry Eye.», *The ocular surface*. United States, 14(2), pp. 242-254. doi: 10.1016/j.jtos.2015.11.006.

Birkedal-Hansen, H. *et al.* (2002) «Matrix Metalloproteinases», *Current Protocols in Cell Biology*. Editado por K. Morgan et al. John Wiley y Sons, Inc., 13(10.8.), pp. 1-23.

Blumenkranz, M. S. y Hartzler, M. K. (2006) «The Mechanism of Action of Drugs for the Treatment of Vitreoretinal Scarring», en Ryan, S. (ed.) *Retina*. 4 th. China: Elsevier Inc., pp. 2241-2253.

Blumenkranz, M. S. y Moshfeghi, D. M. (2006) «Pharmacotherapy of Age-Related Macular Degeneration», en Ryan, S. J. (ed.) *Retina*. 4th ed. China: Elsevier Inc., pp. 1212-1239.

Boraschi, D. *et al.* (2017) «Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence.», *Seminars in immunology*. England, 34, pp. 33-51. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.013.

Bourlais, C. L. *et al.* (1998) «Ophthalmic drug delivery systems--recent advances.»,

Progress in retinal and eye research. England, 17(1), pp. 33-58.

Bourseau-Guilmain, E. *et al.* (2012) «Development and characterization of immunonanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133», *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 423(1), pp. 93-101. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.06.001.

Bozzuto, G. y Molinari, A. (2015) «Liposomes as nanomedical devices», *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press, 10, pp. 975-999. doi: 10.2147/IJN.S68861.

Bressler, S. B. *et al.* (2006) «Age-Related Macular Degeneration: Nonneovascular Early AMD, Intermediate AMD, and Geographic Atrophy», en Ryan, S. J. (ed.) *Retina*. 4th ed. China: Elsevier Inc., pp. 1042-74.

Brunton, L. y Lazo, J. (2013) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Bulbake, U. *et al.* (2017) «Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review.», *Pharmaceutics*. Switzerland, 9(2). doi: 10.3390/pharmaceutics9020012.

C

Cabral, T. *et al.* (2017) «Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets», *International Journal of Retina and Vitreous*. BioMed Central, 3(1), p. 31. doi: 10.1186/s40942-017-0084-9.

Chang, J. H. *et al.* (2012) «Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review», *Survey of Ophthalmology*. Elsevier Inc, 57(5), pp. 415-429. doi: 10.1016/j.survophthal.2012.01.007.

Chang, T. S. *et al.* (2009) «Short-term effectiveness of intravitreal bevacizumab versus ranibizumab injections for patients with neovascular age-related macular degeneration.», *Retina (Philadelphia, Pa.)*. United States, 29(9), pp. 1235-1241. doi: 10.1097/IAE.0b013e3181b20eed.

Chari, R. V. J. (2008) «Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs», *Accounts of Chemical Research*. American Chemical Society, 41(1), pp. 98-107. doi: 10.1021/ar700108g.

Chiang, H. y Hemmati, H. (2013) «Treatment of Corneal Neovascularization», *Optalmic Pearls*, Cornea, pp. 35-36.

Chung, H. *et al.* (2007) «Triamcinolone Acetonide-Mediated Oxidative Injury in Retinal Cell Culture: Comparison with Dexamethasone», *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(12), pp. 5742-5749. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-0566>.

Ciulla, T. A., Amador, A. G. y Zinman, B. (2003) «Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies.», *Diabetes care*. United States, 26(9), pp. 2653-2664.

Coronato, S., Laguens, G. y Di Girolamo, V. (2012) «ROL DE LAS METALOPROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES EN PATOLOGÍA TUMORAL», *MEDICINA*, 72(6), pp. 496-502.

Courant, T. *et al.* (2010) «Vectorization of copper complexes via biocompatible and biodegradable PLGA nanoparticles.», *Nanotechnology*, 21(16), p. 165101. doi: 10.1088/0957-4484/21/16/165101.

Cox, C. A. *et al.* (2010) «Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis.», *Ophthalmology*. United States, 117(9), pp. 1782-1791. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.01.037.

D

Daar, A. S. *et al.* (2002) «Top ten biotechnologies for improving health in developing countries.», *Nature genetics*. United States, 32(2), pp. 229-232. doi: 10.1038/ng1002-229.

Dahmani, F. Z. *et al.* (2016) «Multifunctional Polymeric Nanosystems for Dual-Targeted Combinatorial Chemo/Angiogenesis Therapy of Tumors.», *Advanced healthcare materials*. Germany, 5(12), pp. 1447-1461. doi: 10.1002/adhm.201600169.

Dan, L. *et al.* (2008) «Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis.», *Current eye research*. England, 33(8), pp. 653-660. doi: 10.1080/02713680802245772.

Del Amo, E. M. *et al.* (2017) «Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery.», *Progress in retinal and eye research*. England, 57, pp. 134-185. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.12.001.

De la Fuente, M. *et al.* (2010) «Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics.», *Advanced drug delivery reviews*. Netherlands, 62(1), pp. 100-117. doi: 10.1016/j.addr.2009.11.026.

Dhanapal, R. y Ratna, J. V. (2012) «Ocular Drug Delivery System: a Review», *International Journal of Innovative Drug Discovery*, 2(1), pp. 4-15.

Dominguez-Gil, Y. A., Suárez, H. y Martín, A. (1997) «Avances en Tecnología Farmacéutica», (3), pp. 57-122.

Du Toit, L. C. *et al.* (2013) «Design of an Anti-Inflammatory Composite Nanosystem and Evaluation of Its Potential for Ocular Drug Delivery», *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 102(8), pp. 2780-2805. doi: 10.1002/jps.23650.

Dursun, D. *et al.* (2001) «Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids.», *American journal of ophthalmology*. United States, 132(1), pp. 8-13.

Duvvuri, S., Majumdar, S. y Mitra, A. (2003) «Drug delivery to the retina: challenges and opportunities.», *Expert opinion on biological therapy*. England, 3(1), pp. 45-56. doi: 10.1517/14712598.3.1.45.

Duvvuri, S., Majumdar, S. y Mitra, A. K. (2004) «Role of metabolism in ocular drug delivery.», *Current drug metabolism*. Netherlands, 5(6), pp. 507-515.

E

Ebrahem, Q. *et al.* (2006) «Triamcinolone acetonide inhibits IL-6- and VEGF-induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 47(11), pp. 4935-4941. doi: 10.1167/iovs.05-1651.

Enríquez-de-Salamanca, A. *et al.* (2008) «Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: An in vitro model of ocular inflammation», *Cytokine*, 44(1), pp. 160-167. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.007>.

El Zaoui, I., Behar-Cohen, F. y Torriglia, A. (2015) «Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: analysis of cell death mechanisms.», *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. United States, 143(2), pp. 441-453. doi: 10.1093/toxsci/kfu243.

Esfandiari, N. *et al.* (2015) «A new application of plant virus nanoparticles as drug delivery in breast cancer», *Tumor Biology*. doi: 10.1007/s13277-015-3867-3.

F

Fang, J.-Y. *et al.* (2008) «Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC).», *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Netherlands, 70(2), pp. 633-640. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.05.008.

Farnoodian, M. *et al.* (2017) «Negative regulators of angiogenesis: important targets for treatment of exudative AMD.», *Clinical science (London, England: 1979)*. England, 131(15), pp. 1763-1780. doi: 10.1042/CS20170066.

Fernández, P. L. *et al.* (2008) *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. 18 a. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Food and Drug Administration (FDA) (2008) *PETITION REQUESTING FDA AMEND ITS REGULATIONS FOR PRODUCTS COMPOSED OF ENGINEERED NANOPARTICLES GENERALLY AND SUNSCREEN DRUG PRODUCTS COMPOSED OF ENGINEERED NANOPARTICLES SPECIFICALLY*. Washington, DC. Disponible en: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0210/06p-0210-cp00001-01-vol1.pdf>.

Formica, M. L., Calles, J. A. y Palma, S. D. (2015) «Polysaccharide-Based Nanocarriers for Ocular Drug Delivery.», *Current pharmaceutical design*. Netherlands, 21(33), pp. 4851-4868.

Fornaguera, C. y García-Celma, M. (2017) «Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale», *Journal of Personalized Medicine*, 7(4), p. 12. doi: 10.3390/jpm7040012.

Fornaguera, C. y Solans, C. (2017) «Methods for the in vitro characterization of nanomedicines—biological component interaction», *Journal of Personalized Medicine*, 7(1). doi: 10.3390/jpm7010002.

Francis, B. A., Chang, E. L. y Haik, B. G. (1996) «Particle size and drug interactions of injectable corticosteroids used in ophthalmic practice.», *Ophthalmology*. United States, 103(11), pp. 1884-1888.

Friberg, S., Lapczynska, I. y Gillberg, G. (1976) «Microemulsions containing nonionic surfactants—The importance of the pit value», *Journal of Colloid and Interface Science*, 56(1), pp. 19-32. doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(76\)90142-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(76)90142-9).

G

Gan, L. *et al.* (2013) «Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers.», *Drug discovery today*. England, 18(5-6), pp. 290-297. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.005.

Gaudana, R. *et al.* (2010) «Ocular Drug Delivery», *The AAPS Journal*, 12(3), pp. 348-360. doi: 10.1208/s12248-010-9183-3.

Gilbert, C. (2008) «Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control.», *Early human development*. Ireland, 84(2), pp. 77-82. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2007.11.009.

Goñi, F. J. *et al.* (2016) «Elevated Intraocular Pressure After Intravitreal Steroid Injection in Diabetic Macular Edema: Monitoring and Management», *Ophthalmology and Therapy*. Cheshire, pp. 47-61. doi: 10.1007/s40123-016-0052-8.

Gregoriadis, G. y Florence, A. T. (1993) «Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential.», *Drugs*. New Zealand, 45(1), pp. 15-28.

Guinedi, A. S. *et al.* (2005) «Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 306(1-2), pp. 71-82. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.09.023.

H

Hanout, M. *et al.* (2013) «Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Current Approaches and Pharmacologic Agents in Development», *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/830837.

Harris, A. *et al.* (2006) «Retinal and Choroidal Blood Flow in Health and Disease», en Ryan, S. J. (ed.) *Retina*. 4th ed. Elsevier Inc., pp. 84-102.

He, F. *et al.* (2010) «High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations.», *Journal of pharmaceutical sciences*. United States, 99(4), pp. 1707-1720. doi: 10.1002/jps.21955.

Herrero Vanrell, R. (2007) «Cesión controlada de fármacos en el segmento posterior: Nuevas tendencias », *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. scieloes , pp. 3-6.

Heurtault, B. *et al.* (2002) «A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers.», *Pharmaceutical research*. United States, 19(6), pp. 875-880.

Heurtault, B. *et al.* (2002) «Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 242(1-2), pp. 167-170.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., *et al.* (2003) «Physico-chemical stability of colloidal lipid particles.», *Biomaterials*. Netherlands, 24(23), pp. 4283-4300.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M.-C., *et al.* (2003) «The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution», *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. Inserm ERIT-M 0104, «Ingénierie de la Vectorisation Particulaire», 10 Rue A Boquel, 49100 Angers Cedex, France., 18(1), pp. 55-61. doi: 10.1016/s0928-0987(02)00241-5.

Hirani, A. *et al.* (2016) «Triamcinolone acetonide nanoparticles incorporated in thermoreversible gels for age-related macular degeneration.», *Pharmaceutical development and technology*. England, 21(1), pp. 61-67. doi: 10.3109/10837450.2014.965326.

Hirsjarvi, S. *et al.* (2013) «Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models.», *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. United States, 9(3), pp. 375-387. doi: 10.1016/j.nano.2012.08.005.

Hoang, T. *et al.* (2012) «Enhancement of radiation response with bevacizumab.», *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. England, 31, p. 37. doi: 10.1186/1756-9966-31-37.

Honda, M. *et al.* (2013) «Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets.», *International journal of nanomedicine*. New Zealand, 8, pp. 495-503. doi: 10.2147/IJN.S30725.

Horwitz, V. *et al.* (2014) «The beneficial effects of doxycycline, an inhibitor of matrix metalloproteinases, on sulfur mustard-induced ocular pathologies depend on the injury stage.», *Current eye research*. England, 39(8), pp. 803-812. doi: 10.3109/02713683.2013.874443.

Hsu, J. (2007) «Drug delivery methods for posterior segment disease.», *Current opinion in ophthalmology*. United States, 18(3), pp. 235-239. doi: 10.1097/ICU.0b013e3281108000.

Hughes, P. M. *et al.* (2005) «Topical and systemic drug delivery to the posterior segments.», *Advanced drug delivery reviews*. Netherlands, 57(14), pp. 2010-2032. doi: 10.1016/j.addr.2005.09.004.

Hunter, D. G. y Mukai, S. (1992) «Retinopathy of Prematurity: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment.», *International Ophthalmology Clinics*, 32(1). Disponible en: http://journals.lww.com/international-ophthalmology/Fulltext/1992/03210/Retinopathy_of_Prematurity_Pathogenesis_.14.aspx.

Huynh, N. T. *et al.* (2009) «Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine.», *International journal of pharmaceuticals*. Netherlands, 379(2), pp. 201-209. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.026.

International Organization for Standardization (ISO) (2009) «Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity», en (ISO), I. O. for S. (ed.) *ISO 10993-5:2009. biological evaluation of medical devices*.

Ionescu, R. M. *et al.* (2008) «Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies.», *Journal of pharmaceutical sciences*. United States, 97(4), pp. 1414-1426. doi: 10.1002/jps.21104.

Irache, J. M. (2008) «Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas», *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* .31 n.1, 31(1).

J

Jayaraman, M. S. *et al.* (2012) «Nano chitosan peptide as a potential therapeutic carrier for retinal delivery to treat age-related macular degeneration.», *Molecular vision*, 18(September), pp. 2300-8. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3441154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Jovanovic, V. y Nikolic, L. (2014) «The effect of topical doxycycline on corneal neovascularization.», *Current eye research*. England, 39(2), pp. 142-148. doi: 10.3109/02713683.2013.833246.

K

Kabat, E. A. y Mayer, M. M. (1991) «Complement and complement fixation», en Kabat, E. A. y Mayer, M. M. (eds.) *Experimental Immunochemistry*. Vol 2. Springfield, pp. 133-240.

Kambhampati, S. P. *et al.* (2015) «Intracellular delivery of dendrimer triamcinolone acetonide conjugates into microglial and human retinal pigment epithelial cells.», *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Netherlands, 95(Pt B), pp. 239-249. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.02.013.

Kang-Mieler, J. J. *et al.* (2017) *Extended ocular drug delivery systems for the anterior and posterior segments: biomaterial options and applications*, *Expert Opinion on Drug Delivery*. doi: 10.1080/17425247.2016.1227785.

Kang, S. y Chung, S. K. (2010) «The effect of subconjunctival combined treatment of bevacizumab and triamcinolone acetonide on corneal neovascularization in rabbits.», *Cornea*. United States, 29(2), pp. 192-196. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181b1c82f.

Kaplan, H. J. *et al.* (2010) «Vitreous Volume of the Mouse Measured by Quantitative High-Resolution MRI», *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(13), p. 4414. Disponible en: <http://dx.doi.org/>.

Karim, R. *et al.* (2016) «Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme:

Current state-of-the-art», *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 227, pp. 23-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.026.

Kazatchkine MD, Hauptmann G, N. U. (1986) «Techniques du Complément». Paris: Inserm, pp. 22-23.

Kewal, J. (2008) *Drug Delivery Systems*. Editado por Kewal K. Jain (Jain PharmaBiotech). Switzerland.

Kiel, J. W. (2010) «Anatomy», en Morgan & Claypool Life Sciences (ed.) *The Ocular Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.

Kim, H.-S. *et al.* (2005) «Doxycycline inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 via Smad and MAPK pathways in human corneal epithelial cells.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 46(3), pp. 840-848. doi: 10.1167/iovs.04-0929.

Kinoshita, T. (1991) «Biology of complement: the overture.», *Immunology today*. England, 12(9), pp. 291-295. doi: 10.1016/0167-5699(91)90001-A.

Kovach, J. L. *et al.* (2012) «Anti-VEGF Treatment Strategies for Wet AMD», *Journal of Ophthalmology*. doi: 10.1155/2012/786870.

L

Lamprecht, A. *et al.* (2004) «Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 278(2), pp. 407-414. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.03.018.

Landesman-Milo, D. y Peer, D. (2012) «Altering the immune response with lipid-based nanoparticles.», *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. Netherlands, 161(2), pp. 600-608. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.12.034.

Lee, S. J. *et al.* (2014) «Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, potentiate the anti-angiogenic effects of bevacizumab by suppressing angiopoietin2, BiP, and Hsp90alpha in human colorectal cancer.», *British journal of cancer*. England, 111(3), pp. 497-505. doi: 10.1038/bjc.2014.283.

Li, D. Q. *et al.* (2001) «Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells.», *Experimental eye research*. England, 73(4), pp. 449-459. doi:

10.1006/exer.2001.1054.

Lim, P., Fuchsluger, T. A. y Jurkunas, U. V (2009) «Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization.», *Seminars in ophthalmology*. England, 24(3), pp. 139-148. doi: 10.1080/08820530902801478.

Ling, S. *et al.* (2013) «Allograft survival enhancement using doxycycline in alkali-burned mouse corneas.», *Acta ophthalmologica*. England, 91(5), pp. e369-78. doi: 10.1111/aos.12070.

Liu, C.-H. *et al.* (2017) «Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies», *The FASEB Journal*, p. fj.201700336R. doi: 10.1096/fj.201700336R.

Liu, D. *et al.* (2016) «The smart drug delivery system and its clinical potential», *Theranostics*, 6(9), pp. 1306-1323. doi: 10.7150/thno.14858.

Liu, D., Song, Y. K. y Liu, F. (1995) «Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1.», *Pharmaceutical research*. United States, 12(11), pp. 1775-1780.

Liu, Q. *et al.* (2015) «Conjugating influenza a (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration.», *Journal of medical virology*. United States, 87(11), pp. 1807-1815. doi: 10.1002/jmv.24253.

Liu, Y. *et al.* (2014) «Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology», *Investigational New Drugs*. New York, pp. 851-859. doi: 10.1007/s10637-014-0129-y.

Liu, Z. *et al.* (2008) «Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems», *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 60(15), pp. 1650-1662. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.001.

Lorenc, V. E. (2014) *Estudios Celulares y Moleculares de la Neovascularización Retinal en Mamíferos. Participación del Sistema IGF-1/IGF-1R*. Universidad Nacional de Córdoba.

Lorenc, V. E. *et al.* (2017) «IGF-1R Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2, Pathological Neovascularization, and Functionality in Retinas of OIR Mouse Model.», *Molecular neurobiology*. United States. doi: 10.1007/s12035-017-0386-9.

Lv, L. *et al.* (2016) «Enhanced Antiglioblastoma Efficacy of Neovasculature and Glioma Cells Dual Targeted Nanoparticles.», *Molecular pharmaceuticals*. United

States, 13(10), pp. 3506-3517. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00523.

M

Mader, K. (2006) «Solid Lipid Nanoparticles as Drug Carriers», en Torchilin, V. (ed.) *Nanoparticulates as Drug Carriers*. London: Imperial College Press, pp. 187-205.

McCombs, J. R. y Owen, S. C. (2015) «Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry», *The AAPS Journal*. New York, pp. 339-351. doi: 10.1208/s12248-014-9710-8.

Minkov, I. *et al.* (2005) «Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: Part 2. Properties of the formed surface film.», *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. Netherlands, 44(4), pp. 197-203. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.07.001.

Mirza, A. Z. y Siddiqui, F. A. (2014) «Nanomedicine and drug delivery: a mini review», *International Nano Letters*, 4(1), p. 94. doi: 10.1007/s40089-014-0094-7.

Missiaen, R. *et al.* (2017) «Targeting endothelial metabolism for anti-angiogenesis therapy: A pharmacological perspective», *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc, 90, pp. 8-18. doi: 10.1016/j.vph.2017.01.001.

Moghimi, S. M. y Szebeni, J. (2003) «Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties.», *Progress in lipid research*. England, 42(6), pp. 463-478.

Mokhtarzadeh, A. *et al.* (2017) «Nano-delivery system targeting to cancer stem cell cluster of differentiation biomarkers.», *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. Netherlands, 266, pp. 166-186. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.028.

Mosmann, T. (1983) «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.», *Journal of immunological methods*. Netherlands, 65(1-2), pp. 55-63.

N

Narayanan, R. *et al.* (2006a) «Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells», *Investigative Ophthalmology and*

Visual Science, 47(2), pp. 722-728. doi: 10.1167/iovs.05-0772.

Narayanan, R. *et al.* (2006b) «Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 47(2), pp. 722-728. doi: 10.1167/iovs.05-0772.

Ni, X. *et al.* (2013) «Microstructure of microemulsion modified with ionic liquids in microemulsion electrokinetic chromatography and analysis of seven corticosteroids.», *Electrophoresis*. Germany, 34(17), pp. 2568-2576. doi: 10.1002/elps.201300168.

Novoa-Herrán, S. S. y Sánchez-Gómez, M. (2011) «El IGF-II estimula la actividad de MMP-9 y MMP-2 en un modelo de trofoblasto humano», *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), pp. 121-132.

O

Ogden, T. E. (2006) «Clinical Electrophysiology», en Ryan, S. J. (ed.) *Retina*. 4th ed. China: Elsevier Inc., pp. 351-371.

Owens, D. E. 3rd y Peppas, N. A. (2006) «Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 307(1), pp. 93-102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.

P

Paolicelli, P. *et al.* (2009) «Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye.», *Expert opinion on drug delivery*, 6(3), pp. 239-253. doi: 10.1517/17425240902762818.

Pardue, M. T. y Peachey, N. S. (2014) «Mouse b-wave mutants.», *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. Netherlands, 128(2), pp. 77-89. doi: 10.1007/s10633-013-9424-8.

Park, C. H. y Jaffe, G. J. (2006) «Steroids in Macular Disease», en Ryan, S. (ed.) *Retina*. China: Elsevier Inc., pp. 979-990.

Parslow, A. C. *et al.* (2016) «Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy», *Biomedicines*. Editado por M. A. Firer. doi: 10.3390/biomedicines4030014.

Passirani, C. *et al.* (1998) «Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system.», *Life sciences*. Netherlands, 62(8), pp. 775-785.

Q

Qazi, Y., Maddula, S. y Ambati, B. K. (2009) «Mediators of ocular angiogenesis.», *Journal of genetics*. India, 88(4), pp. 495-515.

R

Real, J. P. *et al.* (2011) «Tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Atención Farmacéutica.», *European Journal of Clinical Pharmacy*, 13(3), pp. 160-171.

Real, J. P. (2016) *Uso de Anticuerpos Monoclonales en la Terapia de la Degeneración Macular Asociada A La Edad: Estudio Farmacoeconómico*. Universidad Nacional de Córdoba.

Regueiro González, J. R. *et al.* (2006) «El complemento, sus ligandos y sus receptores.», en regueiro González, J. R. y López Larrea (eds.) *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. 3ª. Madrid: Editorial Médica Panamericana, pp. 21-27.

Rivera, J. C. *et al.* (2017) «Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies», *Journal of Neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), p. 165. doi: 10.1186/s12974-017-0943-1.

Robson, J. G. y Frishman, L. J. (2014) «The rod-driven a-wave of the dark-adapted mammalian electroretinogram.», *Progress in retinal and eye research*. England, 39, pp. 1-22. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.003.

Roger, E., Lagarce, F. y Benoit, J. P. (2011) «Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration.», *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Netherlands, 79(1), pp. 181-188. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.01.021.

Rosenfeld, P. J. (2006) «Intravitreal avastin: the low cost alternative to lucentis?», *American journal of ophthalmology*. United States, pp. 141-143. doi: 10.1016/j.ajo.2006.03.036.

S

Sabzevari, A., Adibkia, K., Hashemi, H., De Geest, B. G., *et al.* (2013) «Improved anti-inflammatory effects in rabbit eye model using biodegradable poly beta-amino ester nanoparticles of triamcinolone acetonide.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 54(8), pp. 5520-5526. doi: 10.1167/iovs.13-12296.

Sabzevari, A., Adibkia, K., Hashemi, H., Hedayatfar, A., *et al.* (2013) «Polymeric triamcinolone acetonide nanoparticles as a new alternative in the treatment of uveitis: in vitro and in vivo studies.», *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Netherlands, 84(1), pp. 63-71. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.12.010.

Sahoo, S. K., Dilnawaz, F. y Krishnakumar, S. (2008) «Nanotechnology in ocular drug delivery.», *Drug discovery today*. England, 13(3-4), pp. 144-151. doi: 10.1016/j.drudis.2007.10.021.

Saliou, B. *et al.* (2013) «Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide.», *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. Netherlands, 50(2), pp. 172-180. doi: 10.1016/j.ejps.2013.06.013.

Samtani, S. *et al.* (2009) «Doxycycline-mediated inhibition of choroidal neovascularization.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 50(11), pp. 5098-5106. doi: 10.1167/iovs.08-3174.

Sanchez, M. C. *et al.* (2006) «Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) expression in a rat model of oxygen-induced retinal neovascularization.», *Experimental eye research*. England, 83(6), pp. 1378-1385. doi: 10.1016/j.exer.2006.07.016.

Sanchez, M. C. *et al.* (2007) «Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy.», *Experimental eye research*.

England, 85(5), pp. 644-650. doi: 10.1016/j.exer.2007.07.018.

Sapadin, A. N. y Fleischmajer, R. (2006) «Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications.», *Journal of the American Academy of Dermatology*. United States, 54(2), pp. 258-265. doi: 10.1016/j.jaad.2005.10.004.

Saulnier, P., Benoit, J. P. y Anton, N. (2015) «Process for preparing lipid nanoparticles». United States.

Schill, M. a *et al.* (1998) «Biomechanical simulation of the vitreous humor in the eye using an enhanced chainmail algorithm», *Miccai'98*, Lecture No, pp. 679-687.

Scholer, N. *et al.* (2001) «Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 221(1-2), pp. 57-67.

Sehedic, D. *et al.* (2017) «Locoregional Confinement and Major Clinical Benefit of (188)Re-Loaded CXCR4-Targeted Nanocarriers in an Orthotopic Human to Mouse Model of Glioblastoma.», *Theranostics*. Australia, 7(18), pp. 4517-4536. doi: 10.7150/thno.19403.

Semeraro, F. *et al.* (2015) «Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease.», *Journal of diabetes research*. Egypt, 2015, p. 582060. doi: 10.1155/2015/582060.

Shen, S. *et al.* (2017) «High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects», *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp. 4085-4109. doi: 10.2147/IJN.S132780.

Shinoda, K. y Saito, H. (1969) «The Stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method», *Journal of Colloid and Interface Science*, 30(2), pp. 258-263. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(69\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(69)80012-3).

Skeie, J. M. y Mahajan, V. B. (2013) «Proteomic Interactions in the Mouse Vitreous-Retina Complex», *PLoS ONE*. Editado por R. Mohanraj. San Francisco, USA. doi: 10.1371/journal.pone.0082140.

Smith, B. J. *et al.* (2014) «Contribution of retinal ganglion cells to the mouse electroretinogram.», *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. Netherlands, 128(3), pp. 155-168. doi: 10.1007/s10633-014-9433-2.

Smith, L. E. *et al.* (1994) «Oxygen-induced retinopathy in the mouse.», *Investigative*

ophthalmology & visual science. United States, 35(1), pp. 101-111.

Smith, L. E. H. (2004) «Pathogenesis of retinopathy of prematurity.», *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. Scotland, 14 Suppl A, pp. S140-4. doi: 10.1016/j.ghir.2004.03.030.

Smith, V. A. y Cook, S. D. (2004) «Doxycycline—a role in ocular surface repair», *The British Journal of Ophthalmology*, pp. 619-625. doi: 10.1136/bjo.2003.025551.

Sobrin, L. *et al.* (2000) «Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 41(7), pp. 1703-1709.

Souto, E. B. *et al.* (2010) «Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs.», *Current eye research*. England, 35(7), pp. 537-552. doi: 10.3109/02713681003760168.

Srinivasan, A. R., Lakshmikuttyamma, A. y Shoyele, S. a. (2013) «Investigation of the stability and cellular uptake of self-associated monoclonal antibody (MAb) nanoparticles by non-small lung cancer cells», *Molecular Pharmaceutics*, 10(9), pp. 3275-3284. doi: 10.1021/mp3005935.

Steinbrook, R. (2006) «The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration.», *The New England journal of medicine*. United States, 355(14), pp. 1409-1412. doi: 10.1056/NEJMp068185.

Stevenson, W. *et al.* (2012) «Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs bevacizumab (Avastin)», *Ocular Surface*, 10(2), pp. 67-83. doi: 10.1016/j.jtos.2012.01.005.

Stjernschantz J, A. M. (1993) «Anatomy and physiology of the eye. Physiological Aspects of ocular drug therapy.», en CRC Press (ed.) *Biopharmaceutics of ocular drug delivery*. Florida, United States, pp. 1-25.

Su, W. *et al.* (2011) «Doxycycline enhances the inhibitory effects of bevacizumab on corneal neovascularization and prevents its side effects.», *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 52(12), pp. 9108-9115. doi: 10.1167/jovs.11-7255.

Su, W. *et al.* (2013) «Doxycycline-mediated inhibition of corneal angiogenesis: an MMP-independent mechanism.», *Investigative ophthalmology & visual science*.

United States, 54(1), pp. 783-788. doi: 10.1167/iovs.12-10323.

Suen, W.-L. L. y Chau, Y. (2013) «Specific uptake of folate-decorated triamcinolone-encapsulating nanoparticles by retinal pigment epithelium cells enhances and prolongs antiangiogenic activity.», *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. Netherlands, 167(1), pp. 21-28. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.01.004.

T

Torchilin, V. (2006) «Introduction. Nanocarriers for Drug Delivery: Needs and Requirements», en *Nanoparticulates as Drug Carriers*. PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., pp. 1-8. doi: doi:10.1142/9781860949074_0001.

Trinh, H. M. *et al.* (2017) «Clear, Aqueous Topical Drop of Triamcinolone Acetonide.», *AAPS PharmSciTech*. United States. doi: 10.1208/s12249-017-0714-4.

U

Ullio-Gamboa, G. (2014) *Estudio de preformulación y formulación de sistemas nanométricos para la administración de fármacos*. Universidad Nacional de Córdoba.

U

Valamanesh, F. *et al.* (2009) «Effects of triamcinolone acetonide on vessels of the posterior segment of the eye.», *Molecular vision*. United States, 15, pp. 2634-2648.

V

Varshochian, R. *et al.* (2013) «The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments», *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Elsevier B.V., 50(3-4), pp. 341-352. doi: 10.1016/j.ejps.2013.07.014.

Varshochian, R. *et al.* (2015) «Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment», *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, p. n/a-n/a. doi: 10.1002/jbm.a.35446.

Vonarbourg, A. *et al.* (2005) «Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface.», *Electrophoresis*. Germany, 26(11), pp. 2066-2075. doi: 10.1002/elps.200410145.

Vonarbourg, A. *et al.* (2006) «Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake.», *Journal of biomedical materials research. Part A*. United States, 78(3), pp. 620-628. doi: 10.1002/jbm.a.30711.

Vonarbourg, A. *et al.* (2009) «The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules.», *Biomaterials*. Netherlands, 30(18), pp. 3197-3204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.009.

W

Wakankar, A. A. *et al.* (2010) «Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes.», *Bioconjugate chemistry*. United States, 21(9), pp. 1588-1595. doi: 10.1021/bc900434c.

Wang, G. *et al.* (2015) «Advances in lipid-based drug delivery: enhancing efficiency for hydrophobic drugs.», *Expert opinion on drug delivery*. England, 12(9), pp. 1475-1499. doi: 10.1517/17425247.2015.1021681.

Wang, Y. *et al.* (2002) «Inhibitory effects of triamcinolone acetonide on bFGF-induced migration and tube formation in choroidal microvascular endothelial cells», *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 240(1), pp. 42-48. doi: 10.1007/s00417-001-0398-y.

Wang, Y.-F. *et al.* (2017) «Nanoparticle-based drug delivery systems: What can they really do in vivo?», *F1000Research*, 6(May), p. 681. doi: 10.12688/f1000research.9690.1.

Wiggins, B. *et al.* (2015) «Characterization of cysteine-linked conjugation profiles of

immunoglobulin G1 and immunoglobulin G2 antibody-drug conjugates.», *Journal of pharmaceutical sciences*. United States, 104(4), pp. 1362-1372. doi: 10.1002/jps.24338.

Woodle, M. C. y Lasic, D. D. (1992) «Sterically stabilized liposomes.», *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1113(2), pp. 171-199.

Woodle, M. C., Newman, M. S. y Cohen, J. A. (1994) «Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties.», *Journal of drug targeting*. England, 2(5), pp. 397-403. doi: 10.3109/10611869408996815.

Y

Yanai, R., Thanos, A. y Connor, K. M. (2012) «Complement involvement in neovascular ocular diseases.», *Advances in experimental medicine and biology*. United States, 946, pp. 161-183. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_10.

Yandrapu, S. K. *et al.* (2013) «Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab», *Molecular Pharmaceutics*, 10(12), pp. 4676-4686. doi: 10.1021/mp400487f.

Yeung, C. K. *et al.* (2004) «Cytotoxicity of triamcinolone on cultured human retinal pigment epithelial cells: comparison with dexamethasone and hydrocortisone.», *Japanese journal of ophthalmology*. Japan, 48(3), pp. 236-242. doi: 10.1007/s10384-003-0053-8.

Yu, D.-H. *et al.* (2010) «Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature.», *Biomaterials*. Netherlands, 31(8), pp. 2278-2292. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.047.

Yu, D.-H. *et al.* (2015) «IF7-Conjugated Nanoparticles Target Annexin 1 of Tumor Vasculature against P-gp Mediated Multidrug Resistance.», *Bioconjugate chemistry*. United States, 26(8), pp. 1702-1712. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00283.

Z

- Zaro, J. L. (2015) «Lipid-Based Drug Carriers for Prodrugs to Enhance Drug Delivery», *The AAPS Journal*. New York: Springer US, 17(1), pp. 83-92. doi: 10.1208/s12248-014-9670-z.
- Zhai, Y. *et al.* (2014) «Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: in vitro and in vivo evaluation.», *International journal of pharmaceutics*. Netherlands, 471(1-2), pp. 103-111. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.035.
- Zhang, J. *et al.* (2017) «pH-sensitive polymeric nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and curcumin to treat cancer via enhanced pro-apoptotic and anti-angiogenic activities.», *Acta biomaterialia*. England, 58, pp. 349-364. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.029.
- Zhang, J.-Z. *et al.* (2009) «BOL-303242-X, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, with full anti-inflammatory properties in human ocular cells.», *Molecular vision*. United States, 15, pp. 2606-2616.
- Zhang, X.-Y. *et al.* (2014) «Comparison of bevacizumab and ranibizumab in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis», *International Journal of Ophthalmology*, pp. 355-364. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.02.30.
- Zhao, P. y Astruc, D. (2012) «Docetaxel Nanotechnology in Anticancer Therapy», *ChemMedChem*, 7(6), pp. 952-972. doi: 10.1002/cmdc.201200052.
- Zhou, H. *et al.* (2012) «Downregulation of VEGF mRNA expression by triamcinolone acetonide acetate-loaded chitosan derivative nanoparticles in human retinal pigment epithelial cells», *International Journal of Nanomedicine*, pp. 4649-4660. doi: 10.2147/IJN.S29690.
- Zhou, Q. *et al.* (2017) «Let-7 contributes to diabetic retinopathy but represses pathological ocular angiogenesis.», *Molecular and cellular biology*, 37(16), pp. e00001-17. doi: 10.1128/MCB.00001-17.

ACTIVIDADES EN INVESTIGACIÓN RELACIONADAS A LA TESIS DOCTORAL

ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN

- “Nanocápsulas lipídicas como plataformas de liberación ocular de bevacizumab” . Université d'Angers - INSERM U1066 (MINT). IBS-CHU ANGERS, FRANCIA. Junio-Diciembre 2015.
- “Optimización de nanocápsulas lipídicas de bevacizumab” . Université d'Angers-INSERM U1066(MINT). IBS-CHU ANGERS, FRANCIA. Octubre-Diciembre 2016.
- “Detección de Acetónido de Triamcinolona mediante Espectroscopía Raman Confocal” . Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Junio 2017.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Preliminary studies in the development of triamcinolone acetonide lipid nanocapsules. Formica ML, Ullio Gamboa GV., Benoit JP, Allemandi DA, Palma SD. 3ra Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Septiembre 2014.
- Desarrollo de nanocápsulas lipídicas de acetónido de triamcinolona como plataformas de liberación ocular. Formica ML, Ullio Gamboa GV, Benoit JP, Allemandi DA, Luna Pinto J, Palma SD. X Congreso de Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología. Buenos Aires, Noviembre 2014. (Presentación oral)
- Development of triamcinolone acetonide based lipid nanocapsules as platforms for ocular drug delivery. Formica ML, Ullio Gamboa GV, Benoit JP, Allemandi DA, Luna Pinto J, Palma SD. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Denver Colorado, Mayo 2015.

- Evaluación de la incorporación de Triamcinolona Acetonido en Nanocápsulas Lipídicas. Formica ML, Ullio Gamboa GV., Benoit JP, Allemandi DA, Palma SD. XVI Encuentro de Superficies y Materiales. Buenos Aires, Argentina. Mayo 2016.
- Therapeutic efficacy and biocompatibility of triamcinolone acetonide-loaded lipid nanocapsules. Formica, María L.; Ullio Gamboa, Gabriela V.; Benoit, Jean P.; Allemandi, Daniel A.; Palma, Santiago D. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2017. Modalidad: Presentación oral. **MENCIÓN SAFE 2017.**
- “Estudios preliminares de obtención de nanocápsulas lipídicas funcionalizadas para la vehiculización de Bevacizumab” . Reunión Anual de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología. Córdoba, Argentina. Diciembre 2017.

PUBLICACIONES

- Obtención y caracterización de sistemas multiparticulados lipídicos basados en gelucire 50/02®. Alejandro Javier Paredes, María Lina Formica, Juan Manuel Llabot, Daniel Alberto Allemandi y Santiago Daniel Palma. Pharmaceutical Technology. 2013.
- Challenges and opportunities related to health promotion in community pharmacies: Obstacles and professional perspectives. J.P. Real, S.L. Gracia Vásquez, M.L. Formica and S.D. Palma. Pharmaceuticals Policy and Law 16 (2014) 313–320. 2014.
- POLYSACCHARIDE-BASED NANOCARRIERS FOR OCULAR DRUG DELIVERY. María Lina Formica, Javier Adrián Calles and Santiago Daniel Palma. Current Pharmaceutical Design, Volume 21, 42 Issues, 2015.

TRABAJOS EN REDACCIÓN

- Development and *in-vitro* therapeutic efficacy of triamcionolone acetonide lipid nanocapsules. Formica ML, Ullio Gamboa GV., Benoit JP, Allemandi DA, Palma SD.
- Development, characterization and *in-vitro* evaluation of a novel bevacizumab-loaded lipid nanocapsule formulation.

CURSOS DE DOCTORADO

- “Fundamentos Didácticos y Pedagógicos en la Enseñanza de la Química” . Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Coordinadora: Dra. Marina Masullo. 15 días. 60 horas. Aprobado. Agosto- Noviembre 2013.
- “Fisicoquímica de Sistemas Dispersos” . Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Directores: Dra. Carla Giacomelli y Dr. Osvaldo Cámara. 14 días. 38 horas. Calificación: 9/10, (nueve). Septiembre- Diciembre 2013.
- “Estabilidad de Fármacos y Medicamentos” . Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Directora: Dra. Marcela Longhi. 4 días. 32 horas. Calificación: 10/10, (diez). Marzo 2014.
- “Vectorización de Fármacos y Moléculas Bioactivas” . Directores: Dr. Santiago Palma y Dr. Alvaro Jimenez-Kairuz. 3 días. 20 hs. Calificación: 10/10, (diez). Septiembre 2014.
- “Escuela de Nanociencia y Nanotecnología” . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 25 horas. Calificación: 100/100. Mayo 2016. (Reconocimiento: RES HCD N° 773/2016)
- “Biotecnología de Anticuerpos Terapéuticos y otras formas de inmunoterapias” . Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Dr. Gualberto Gonzalez-Sapienza. 85 horas.

Calificación 7/12. Mayo-Junio 2016. (Reconocimiento: RES HCD N° 773/2016)

- "Ética en la Investigación en las Ciencias de la Salud" . Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Córdoba. Director: Eduardo Cuestas. 24hs. Abril-Julio 2017. Calificación: 10/10, (diez). (Reconocimiento RES HCD N° 1246/2017)
- Curso de Formación Superior: "Técnicas Básicas de Cultivos Celulares" . (Teórico-Práctico). Instituto de Virología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Dra. Brenda Konigheim y Dr. Pedro Gil. 36 horas. Calificación: 10/10. Marzo 2017.