

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA
Programa de doctorado en Farmacia**



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS Y BIOSIMILARES.
EMPLEO DE LA NANOTECNOLOGÍA PARA EL
DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO
CON NEUROGLOBINA PARA EL TRATAMIENTO
DEL ICTUS**

TESIS DOCTORAL

**SEBASTIÁN PERALTA GALISTEO
Granada, 2020**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sebastián Peralta Galisteo
ISBN: 978-84-1306-598-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63585>

“La transmisión del conocimiento y su entendimiento constituyen tanto el valor del mismo, como el del trabajo para obtenerlo”

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser los promotores de todos mis proyectos. Su amor, dedicación, paciencia y preocupación son únicos y son reflejo en mi vida. Por darme libertad y apoyo en todas mis elecciones. Por vuestro consejo y recomendación. Por ayudarme en situaciones de las que sólo no habría salido tan bien. Por compartir conmigo todo lo que habéis conseguido. Por ser ejemplo de unión ante las dificultades y demostrar el verdadero significado de ser una familia. Por vuestro amor, que os sacrifica hacia mi sin esperar reconocimiento.

A Rocío, por todo su entendimiento, comprensión y sacrificios, por ser un gran apoyo y haber elegido estar a mi lado.

A mis directoras por permitirme realizar este proyecto y aprender de ellas, su gran implicación y disponibilidad siempre, además de vuestro trato servicial y apoyo continuo, que hace que me sienta afortunado y orgulloso. A la Dra. M^a Adolfinia Ruiz por su dirección tanto en lo profesional como también ser guía y orientadora en lo personal. Por su gran afecto, adoptándome como a un hijo durante todo este tiempo. Por su total disponibilidad siempre. Por ser ejemplo de una trayectoria admirable. Por ser el gran nexo de unión entre todos. A la Dra. M^a Encarnación Morales, pues combinando sus deberes como madre y su actividad docente e investigadora es ejemplo de constancia y esfuerzo, que no pierde su actitud positiva y tiene siempre un hueco para su doctorando.

A la Universidad de Granada y a la Facultad de Farmacia, por hacer que este proyecto sea posible a la vez que lo dota de prestigio y de gran reconocimiento por parte de todos.

Al Sistema Nacional de Garantía Juvenil y del Programa Operativo de Empleo Juvenil para la contratación de joven personal investigador, del cual fui beneficiario durante parte del periodo de mi Tesis.

Al grupo de investigación CTS-205 y a todos los miembros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Siempre respetuosos, amables y serviciales. Mencionando especialmente a Dra. Margarita López-Viota, Dra. Herminia Castán, Dra. M^a Dolores Contreras y Gda. Elena Ortega a las que tengo y guardo un afecto especial. Sin dejar de mencionar a Dña. Isabel Morillas, por su gran atención y labor, por su confianza y su trato siempre cariñoso y servicial.

Al departamento de Biología Molecular de la Universidad de Jaén, que creyeron en este proyecto. Sus aportaciones y fuerte colaboración constituyen un pilar fundamental en la base experimental de este trabajo. Todo ello unido a un equipo humano increíble con

un trato excepcional, especial mención a la Dra. M^a Ángeles Peinado, responsable del grupo. Además de la concesión BFU2016-80316-R del Ministerio de Economía y Competitividad que da soporte económico al proyecto.

Al departamento de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia de la Jagiellonian University Medical College de Cracovia (Polonia) y en especial a la profesora Dra. Renata Jachowicz por permitirme realizar unas estancias con ellos y aprender de su grupo, a la vez que me acogieron como a un miembro más e hicieron de mi tiempo allí un crecimiento personal y profesional maravilloso.

A todos mis amigos, lo más hermoso de la vida es poder compartirla con gente que quieres y que te quiere. Gracias por vuestro apoyo.

A todos mis compañeros de laboratorio, no siempre es fácil compartir un espacio pequeño y muy limitados recursos.

ABREVIATURAS

AH: Ácido Hialurónico.

AIC: Criterio de Información Akaike.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

BMWP: Biological Medicina Working Party (división de la CHPM).

CE: Comisión Europea.

CHPM: Comité de Evaluación de Medicamentos de uso humano de la EMA.

CPEA: Centro para la Producción y Experimentación de la Universidad de Jaén.

DAPI: (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride).

DCLM: Diclorometano.

Dln: Dilución.

EMA: Agencia Europea del Medicamento.

EPAr: Informe Publico Europeo de Evaluación.

EU-RMP: Plan de Gestión de Riesgos Unión Europea.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FC: Farmacocinéticos.

FD: Farmacodinámicos.

FDA: Food and Drink Administration (Agencia Medicamentos USA).

GVP: Buenas prácticas de Farmacovigilancia.

HLB: Balance Hidrófilo – Lipófilo.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

HS: Hialuronato de sodio.

MCAO: Modelo de Oclusión de la Arteria Cerebral Media.

MTS: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).

NAM: N-acetilmurámico.

NAG: N-acetilglucosamina.

NGB: Neuroglobina.

Np(s): Nanopartícula(s).

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.

OMS: Organización Mundial Salud.

PAES: Estudios de eficacia posteriores a la autorización.

PASS: Estudios de seguridad posteriores a la autorización.

PPC: Péptidos de Penetración Celular.

RAM: Reacciones Adversas Medicamentos.

SA: Stearylamine, Octadecilamina.

SCAI: Servicio Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén.

SLN: Sistemas Lipídicos Nanoparticulares.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TAG: Triacilgliceroles.

UE: Unión Europea.

Resumen

Los medicamentos biológicos y especialmente los medicamentos biológicos similares 'biosimilares' ganan cada día más repercusión en multitud de áreas desde científica a política y social. Los medicamentos biológicos presentaron una nueva estrategia a la hora de tratar una enfermedad, diferente a la de los medicamentos químicos tradicionales, llegando a actuar dónde los químicos no podían hacerlo y ampliando a su vez el arsenal terapéutico. Los medicamentos 'biosimilares' tienen la virtud de conseguir que el tratamiento con medicamentos biológicos sea más accesible, a la vez que contribuye a la sostenibilidad de los sistemas sanitarios. En una primera parte de la Tesis Doctoral se ha analizado la importancia de los medicamentos biológicos desde la perspectiva y el estudio de los medicamentos biosimilares concluyendo en un análisis bibliométrico.

En una segunda parte, el trabajo experimental ha sido el diseño de un medicamento biológico para el tratamiento del ictus. El ictus es una enfermedad ampliamente extendida en el mundo desarrollado y cuyo tratamiento actual se basa en el restablecimiento de la reperfusión. Se ha comprobado que una proteína, concretamente neuroglobina, tiene un papel relevante en los accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. La neuroglobina es una proteína que interviene en el transporte y reserva de oxígeno en células neuronales, relacionándose su tarea con la homeostasis neuronal. Después de haber conseguido su síntesis mediante tecnología recombinante, la neuroglobina es incapaz 'per se' de llegar a las células objetivo neuronales, debido a la barrera hematoencefálica, que es una estructura de permeabilidad selectiva que impide su paso. Utilizando la nanotecnología se diseñan y elaboran diferentes tipos de nanopartículas que permitan encapsular la proteína y vehicularla a la vez que la protege y la hacen llegar a las células neuronales, liberándola y permitiendo realizar su función.

Las nanopartículas inyectadas en modelos de animales, manifestaron resultados exitosos de acuerdo a los objetivos planteados.

Se considera que todo el trabajo motivo de esta Tesis Doctoral nos permite poder afirmar que se pueden conseguir nanopartículas con neuroglobina encapsulada que podrían ser eficaces en el tratamiento del ictus. Sin duda, será necesario realizar más estudios que corroboren todos estos datos para que, en un futuro no muy lejano, se pueda disponer de un medicamento biológico elaborado con nanopartículas y neuroglobina.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	19
2.1 OBJETIVOS	20
2.2. PLAN DE TRABAJO	22
3. PARTE TEÓRICA	23
3.1. MEDICAMENTOS BIOSIMILARES	24
3.1.1. Descripción	24
3.1.2. Regulación y Legislación.....	26
3.1.2.1. Requerimientos para los datos de calidad.....	30
3.1.2.2. Requerimientos datos no clínicos.....	30
3.1.2.3. Requerimientos datos clínicos	31
3.1.2.4. La intercambiabilidad	33
3.1.2.5. Medicamentos biosimilares comercializados	34
3.1.3. Fabricación	38
3.1.4. Comparabilidad.....	40
3.1.5. Inmunogenicidad	42
3.1.6. Farmacovigilancia.....	42
3.1.7. Perfil económico.....	44
3.2. EL ICTUS Y LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.....	50
3.3. NANOTECNOLOGÍA.....	55
4. PARTE EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.1. MATERIALES	64
4.1.1. Neuroglobina	64
4.1.2 Lisozima.....	67
4.1.3. Polímeros (Hialuronato Sódico y Chitosán) y Glicerol Tripalmitina	69
4.1.4. Otros materiales utilizados.....	73
4.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	74
4.2.1. Síntesis de Nanopartículas.....	74
4.2.1.1. Técnica gelificación iónica	74
4.2.1.2. Técnica de emulsión-evaporación del disolvente	75
4.2.1.3. Métodos de síntesis.....	76
4.2.2. Espectrofotometría	78
4.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	78
4.2.4. Carga eléctrica superficial y tamaño	79
4.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)	79
4.2.6. Citotoxicidad	79
4.2.7. Liofilización de las muestras.....	80
4.2.8. Determinación eficiencia de encapsulación.....	80
4.2.9. Estudio de liberación de fármacos 'in vitro'	81
4.2.10. Cinética de liberación de fármacos 'in vitro'	81
4.2.11. Expresión y purificación de NGB recombinante	81

4.2.12. Preparación de antisuero contra NGB.....	82
4.2.13. Experimentos en animales.....	82
4.2.14. Modelo de ictus.....	83
4.2.15. Histología y microscopía.....	84
4.2.16. Cuantificación de fluorescencia en el parénquima cerebral.....	85
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
5.1. ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO SOBRE MEDICAMENTOS BIOSIMILARES.....	88
5.1.1. Estudio 'biosimilar'.....	88
5.1.2. Estudio sobre tratamientos para la artritis con medicamentos biológicos y biosimilares.....	92
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	101
5.2.1. Tamaño, Polidispersión y Potencial Zeta.....	101
5.2.2. Estudios microfotográficos: TEM y SEM.....	103
5.2.3. Estudio del pH.....	105
5.3. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD.....	107
5.3.1. Métodos 1 y 2.....	107
5.3.2. Método 3.....	111
5.4. ESTUDIO DE PENETRACIÓN DE NPS EN MODELOS ANIMALES.....	114
5.5. ESTUDIO DE LOS FÁRMACOS: LAS PROTEÍNAS LISOZIMA Y NGB.....	117
5.5.1. Lisozima.....	117
5.5.1.1. Valoración espectrofotométrica.....	117
5.5.1.2. Valoración por HPLC.....	119
5.5.2. Neuroglobina.....	120
5.5.2.1. Valoración espectrofotométrica.....	120
5.5.2.2. Valoración por HPLC.....	123
5.5.2.3. Estabilidad de NGB.....	124
5.6. ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN 'IN VITRO' DE LISOZIMA.....	126
5.6.1. Encapsulación Lisozima.....	126
5.6.2. Liberación de lisozima.....	128
5.6.2.1. Cinéticas de liberación.....	129
5.7. NANOPARTÍCULAS CON NGB.....	131
5.7.1. Caracterización de nanopartículas con NGB.....	131
5.7.2. Estudio de encapsulación.....	132
5.7.3. Estudio de Liberación 'in vitro'.....	133
5.7.3.1. Cinéticas de liberación.....	134
5.7.4. Estudio de estabilidad.....	134
5.7.5. Penetración en modelos animales.....	135
6. CONCLUSIONES.....	139
7. BIBLIOGRAFÍA.....	143

1.

INTRODUCCIÓN

El tema de la presente Tesis Doctoral trata sobre el complejo ámbito de los medicamentos biológicos. En concreto, nuestro trabajo parte de los medicamentos biosimilares debido a que son medicamentos recientes que afectan y afectarán en gran medida tanto a la comunidad científica como a la social, económica y política debido a su gran impacto sobre la salud. Es por esto que pretendemos mostrar una ilustración sobre la importancia que poseen los medicamentos biológicos. En los distintos apartados se analizarán dichos medicamentos desde una perspectiva general a modo de guía sobre los mismos, así como también profundizaremos en la raíz principal de su sentido, su idiosincrasia, así como la repercusión que tienen en la sociedad. Todo ese trabajo se basará en un amplio estudio bibliométrico que, tras la aplicación de métodos estadísticos, nos permitirán comprobar cómo evolucionan y el impacto que han tenido a lo largo del tiempo.

A grandes rasgos, un medicamento es toda sustancia que sirve para tratar, prevenir, diagnosticar, aliviar o curar enfermedades o dolencias (Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios) y que, en el caso del medicamento biológico, la particularidad viene dada en que se utiliza un organismo vivo o sus productos para elaborar dicho medicamento (Instituto Nacional del Cáncer de EEUU).

La complejidad de estos medicamentos respecto a los de síntesis química es superior en todos los casos y han sido necesarios conocimientos en muchos y variados campos científicos para su obtención, lo que también se ve reflejado en la actualidad que poseen.

De esta manera, si retrocedemos un poco en el tiempo, en un principio el uso de los medicamentos se centraba en el tratamiento y alivio de los síntomas que acompañaban a una enfermedad o incluso las manifestaciones de esta, por lo que no se ataca el origen de la dolencia ni se modificaba su evolución natural. Pero a partir del siglo XIX se produce un gran avance en la ciencia, que afectó a todos sus campos incluyendo las áreas de farmacia y medicina, pues en estos casos se empieza a estudiar y experimentar medicamentos que previnieran el padecimiento de una enfermedad. En estos momentos nacen los medicamentos biológicos, con la aparición de las vacunas (vacuna contra la viruela de Jenner) que, en un primer momento, fueron sustancias que procedían de organismos vivos y que cuando son administradas a una persona generaban una respuesta inmunitaria en contra de esos microorganismos nocivos.

Conforme fue avanzando el tiempo, el principio de las vacunas facilitó ideas para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades como el cáncer, la artritis, la enfermedad de Crohn, diabetes o tratamientos hormonales entre otros partiendo de la estrategia de lograr que el sistema inmunológico reconociese las sustancias o células malignas como los microorganismos nocivos, destruyendo de esta manera la raíz del problema (Medicamentos biológicos: del síntoma al origen de la enfermedad).

En la actualidad el proceso de síntesis de estos medicamentos es mucho más complicado, ya que se utilizan tecnologías altamente sofisticadas basadas en la manipulación genética de células vivas mediante técnicas de ADN recombinante o hibridación entre otras, que requieren tanto de instrumentos como de personal muy cualificado. Además, también es necesaria una gran investigación y desarrollo previo a su producción masiva.

Los medicamentos biológicos traen consigo una revolución en el concepto de la farmacia y de la medicina, pues van más allá del arsenal de medicamentos del cual disponemos y nos permiten atacar donde antes no era posible o donde ni siquiera existía el tratamiento.

Las diferencias respecto a los medicamentos de síntesis química son tan abismales que solo en su tamaño podemos hablar de unas docenas de átomos en estos medicamentos frente a los miles de millones de átomos de los medicamentos biológicos, lo que los hace muy complejos. Dicha complejidad se puede ver claramente representada por la inversión de recursos económicos que necesitan, desde que comienza su investigación hasta el requerimiento de las condiciones de distribución y almacenamiento, pasando por la construcción de plantas industriales especiales para su elaboración en las más estrictas condiciones de seguridad.

Sin embargo, este ambicioso salto de la ciencia presenta algunas particularidades que no lo hacen del todo favorable, ya que debido a los altos costos que presentan puede dificultar el acceso del paciente al tratamiento. Como es lógico, la industria tiene que recuperar la inversión realizada (dichos medicamentos están protegidos por una patente de exclusividad de aproximadamente 15 años) antes de la aparición de competidores, que sean más accesibles (los medicamentos biosimilares), al incurrir en menores costos de producción, pero con equivalencia similar en eficacia y seguridad.

Esto supone un gran reto mundial debido a que los sistemas sanitarios actualmente poseen dificultades para cubrir los costos de los medicamentos convencionales y más tendrán aún para cubrir los medicamentos biológicos innovadores u originales. Aquí nacen los medicamentos biosimilares, que son capaces de demostrar que son equivalentes a los medicamentos biológicos originales, pero con un coste inferior.

Contemplando la situación que se presenta, las autoridades sanitarias mundiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), entre otras, están preparando y lanzando normativas de seguridad y uso de los medicamentos biológicos y biosimilares, así como una serie de recomendaciones para acortar los trámites de registro con la finalidad principal de optimización de recursos económicos en cuanto a brindar al paciente el mejor tratamiento con la mayor brevedad posible.

La segunda parte de la Tesis se basó en un desarrollo experimental en el que un medicamento biológico o biosimilar fuera protagonista. En este sentido, hemos tenido la oportunidad de trabajar con una proteína, concretamente neuroglobina, con

potencial para el tratamiento del ictus isquémico gracias a un proyecto de investigación del Ministerio de Economía y competitividad (Ref: BFU2016-80316-R).

Se procedió dada la naturaleza de la misma, a diseñar y desarrollar un medicamento biológico, realizando los estudios necesarios para su utilización terapéutica en el tratamiento del ictus.

El ictus es la mayor causa de muerte e incapacidad en el mundo (Hacke y col., 2008). Ocurre cuando alguno de los vasos sanguíneos en el cerebro es bloqueado (isquemia) o bien se rompe provocando una hemorragia. El ictus isquémico es responsable del 87% de todos los casos y sus consecuencias son muerte neuronal, inflamación y daño en los vasos (Zhou Z. y col., 2018). De ahí, la trascendencia de la investigación que estamos llevando a cabo.

Partiendo de esta base, los conocimientos existentes y la experiencia de nuestro grupo de investigación, se inició nuestro proyecto de diseño y elaboración de un medicamento biológico con neuroglobina para el tratamiento del ictus. Para lo que se elaboraron diferentes métodos de preparación de nanopartículas (Nps) que fueron estudiados y reglados a cumplir unos estándares de tamaño, forma, carga superficial y citotoxicidad entre otros.

Respecto a los métodos de encapsulación estudiados, el polímero base utilizado fue el hialuronato de sodio, el cual fue empleado en dos diferentes técnicas para vehicular la proteína hasta su diana terapéutica. También se realizó una síntesis de Nps lipídicas sólidas para poder compararlas con las anteriores en lo que se refiere sobre todo a su eficiencia de encapsulación y capacidad de penetración a través de la BHE.

Por otro lado, se procede a la síntesis y estudio de las proteínas, con el fin de analizar su estabilidad. Durante el estudio también se utilizó el proceso de liofilización, pues el objetivo final es realizar una formulación extemporánea para administración parenteral, en la que la conservación y estabilidad en el tiempo es un pilar básico.

La síntesis de NGB resultó ser un proceso muy costoso, por lo que se realizaron los primeros estudios de eficiencia de encapsulación y liberación con otra proteína que consumiese menos recursos. La proteína elegida fue la lisozima debido a su peso molecular y características similares.

Una vez obtenidos todos los datos finales, se seleccionó el método que se consideró mejor en base a los resultados proporcionados en los diferentes estudios. Con dicho método se han elaborado las Nps definitivas con neuroglobina encapsulada y la definitiva forma farmacéutica. Estas Nps con NGB fueron inyectadas directamente en los animales y se estudió su llegada a su diana como la liberación de la proteína, hecho frente al cual los resultados fueron exitosos.

Todos estos factores analizados, han influido y han sido tenidos en cuenta, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, como iremos pormenorizando en los distintos apartados.

2.

**OBJETIVOS Y PLAN DE
TRABAJO**

2.1 OBJETIVOS

Uno de los objetivos fundamentales de la presente Tesis Doctoral es el estudio de los medicamentos biológicos, por ello, en un principio, se ha realizado una revisión bibliográfica sobre los medicamentos biosimilares, la situación que han experimentado desde su salida al mercado hasta el presente, sus perspectivas futuras, así como las consecuencias sociales que pueden derivarse de su empleo. Era y es un tema bastante atractivo debido a la novedad que representan y cómo van a influir para cambiar el mercado del medicamento actual, al ofrecer nuevas vías para el tratamiento de enfermedades ampliando y mejorando el arsenal del cual disponemos actualmente.

Los conocimientos aportados en esta primera parte, haciendo referencia al título de la Tesis, son fundamentales para poder trabajar, estudiar y diseñar un medicamento biológico y se sitúa no como un cambio de rumbo en nuestro estudio, sino como punto de partida. Así surge el segundo objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral, en concreto, el diseño y preparación de un medicamento biológico para el tratamiento del ictus isquémico.

Gracias a la colaboración establecida con el grupo de investigación Bio 0184 del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén, se nos planteó la posibilidad de trabajar con neuroglobina, proteína de gran interés en el tratamiento del ictus; habiendo demostrado su papel neuroprotector en el cerebro. Sin embargo, dado su tamaño y sus características fisicoquímicas dicha proteína es incapaz por sí misma de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Diseñar una forma farmacéutica capaz de solventar estas dificultades, supone un importante reto para la Tecnología Farmacéutica. Con esta intención nos planteamos la encapsulación de neuroglobina utilizando diferentes polímeros y tecnologías que permitan conseguir el objetivo deseado además de intentar mejorar su estabilidad en el tiempo.

Esta meta está plagada de ambición e ilusión ya que uno de los campos de estudio más importantes de los medicamentos biotecnológicos son los accidentes cerebrovasculares, pues son una de las causas de muerte y discapacidad más importantes a nivel mundial, sobre todo, si consideramos que, en España, cada 6 minutos se produce un ictus.

Por tanto, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es el estudio de los medicamentos biosimilares, así como el diseño y preparación de un medicamento, que conteniendo neuroglobina consiga vencer el obstáculo de la barrera hematoencefálica y producir el efecto neuroprotector que evidencia, ayudándonos de la nanoencapsulación para alcanzar los fines deseados.

Con esta finalidad, en este trabajo se pretenden alcanzar los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Realizar una amplia revisión bibliográfica acerca de los diferentes medicamentos biosimilares disponibles en la actualidad. Estudio de sus particularidades, repercusión económica y trascendencia clínica de dichos medicamentos.

- II. Estudiar las diferentes técnicas de nanoencapsulación adaptadas a proteínas.
 - Seleccionar y desarrollar un método de nanoencapsulación adecuado en función del tamaño medio de partícula requerida, propiedades físicas del agente encapsulante, mecanismo y lugar de liberación deseado, coste y aplicación de la neuroglobina.
 - Seleccionar polímeros compatibles con la proteína a encapsular y con la tecnología utilizada. Estos polímeros deben cumplir con una serie de requisitos como grado de protección, condiciones de liberación y estabilidad en las condiciones tecnológicas y durante su posterior almacenamiento y conservación.
 - Caracterizar las nanopartículas obtenidas con objeto de determinar su forma, tamaño y superficie, así como su estabilidad desde el punto de vista tecnológico.
 - Comprobar la estabilidad de la neuroglobina encapsulada a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de conservación, con la intención de determinar las condiciones de almacenamiento más apropiadas.
 - Estudiar la influencia de la liofilización tanto en la estabilidad de las nanopartículas como en la viabilidad de la proteína.
 - Valorar su inclusión en formas farmacéuticas secundarias.

- III. Estudiar la cinética de liberación del principio activo desde los sistemas nanoparticulares propuestos mediante ensayos 'in vitro' y su paso a través de la barrera hemoencefálica, llegando así al lugar de acción en modelos animales.

- IV. Dar un paso más en la investigación futura sobre el uso y desarrollo de nuevas formas de administración y nuevas indicaciones terapéuticas.

2.2. PLAN DE TRABAJO

La parte experimental del presente trabajo de investigación está compuesta por dos apartados fundamentales que dan respuesta a los dos objetivos fundamentales que nos marcamos inicialmente, explicados en el apartado anterior. Por un lado, la evaluación de los biosimilares en el mercado farmacéutico actual y por otro, el desarrollo y puesta a punto de una nueva forma farmacéutica con neuroglobina. Por ello, dicho trabajo se planificó del siguiente modo:

1. Búsqueda y revisión bibliográfica sobre los medicamentos biosimilares, desde lo que son, pasando por su legislación y fabricación hasta su razón económica, para acabar con una revisión bibliométrica sobre los mismos, dónde se evalúa su importancia e impacto entre otras.
2. Diseño y elaboración de nanopartículas, tanto nanopartículas poliméricas recubiertas como nanopartículas lipídicas sólidas.
3. Estudio tecnológico y caracterización de todos los métodos de síntesis de nanopartículas propuestos.
4. Ensayos 'in vivo' para testar la llegada de las diferentes nanopartículas a su diana y verificar la capacidad de penetración de las mismas a través de la barrera hematoencefálica.
5. Caracterización fisicoquímica de los principios activos, mediante determinaciones espectrofotométricas y cromatográficas.
6. Estudio de la estabilidad del principio activo a lo largo del tiempo y tras someterlo a liofilización.
7. Ensayos de encapsulación de los principios activos, a diferentes dosis y búsqueda de la eficiencia de encapsulación.
8. Liberación 'in vitro' de los principios activos desde las nanopartículas.
9. Selección del mejor método de síntesis de nanopartículas y elaboración de las nanopartículas definitivas con neuroglobina.
10. Estabilidad de las nanopartículas definitivas con principio activo tras su liofilización.
11. Se incluirán las conclusiones obtenidas, así como un apartado con la bibliografía más relevante

3.

PARTE TEÓRICA

3.1. MEDICAMENTOS BIOSIMILARES

En los últimos años, la biotecnología ha permitido el desarrollo de más de 650 fármacos biológicos innovadores para tratar diversas enfermedades como el cáncer y otras enfermedades graves neurológicas, reumatológicas o endocrinas.

En los años venideros, un alto porcentaje de los fármacos que saldrán al mercado serán medicamentos biológicos, que darán respuesta a pacientes que en este momento no tienen un tratamiento tan preciso para sus enfermedades.

Los fármacos biológicos son moléculas de gran tamaño formadas en su mayoría por proteínas, que son producidas por organismos vivos, como bacterias. Esto condiciona que las características y las propiedades de dichos fármacos se encuentren estrechamente ligadas a su proceso de producción.

A medida que pasa el tiempo, la patente de los medicamentos biológicos vence, el arsenal terapéutico se va ampliando con el desarrollo de los fármacos biosimilares, que son moléculas similares, pero en ningún caso idénticas, al fármaco biológico original, ya que provienen de líneas celulares distintas y de procesos de fabricación que también pueden ser diferentes.

3.1.1. Descripción

Así, un biosimilar (o medicamento biológico similar) es un medicamento biológico equivalente en calidad, eficacia y seguridad a un medicamento biológico innovador u original, llamado producto de referencia. La posología y vía de administración deben ser las mismas, además de esto el biosimilar es autorizado para todas, o algunas de las indicaciones aprobadas para el biológico de referencia, nunca para otras indicaciones diferentes.

El *biosimilar* contiene una versión del principio activo del producto de referencia. A la hora de establecer la equivalencia con este, debe establecerse mediante un exhaustivo "*ejercicio de comparabilidad*". El objetivo es demostrar que las leves diferencias fisicoquímicas existentes entre ambos productos no inciden significativamente en el perfil beneficio/riesgo, lo cual permite sustentar que el principio activo de ambos medicamentos es en esencia el mismo. Una vez acreditada la equivalencia y su correspondiente autorización, el biosimilar es un medicamento biológico más. La variabilidad fisicoquímica sin trascendencia terapéutica es inherente a productos de naturaleza biológica, e identificable en ocasiones entre lotes de determinados *medicamentos biológicos* sometidos a cambios en el proceso productivo. Lo cual puede exigir incluso la ejecución de un "*ejercicio de comparabilidad*" a la medida entre dos o más lotes de un mismo medicamento biológico, original o biosimilar, con el fin de comprobar su equivalencia.

Como características más destacables respecto a su naturaleza biológica podemos decir que tienen un gran tamaño en comparación a las moléculas de síntesis química (figura 1). Además, se pueden producir a partir de células microbianas o cultivos de células vegetales en biorreactores (figura 2) y en líneas celulares de mamíferos.

	Medicamento de Molécula Pequeña	Producto Biológico de pequeño tamaño (no es qco grande)	Producto Biológico de gran tamaño
Tamaño	Aspirina 21 átomos 	Hormona Humana del Crecimiento (hGH) ~ 3.000 átomos 	Anticuerpo IgG ~ 25.000 átomos 
Complejidad	Bicicleta ~ 20 lbs 	Auto ~ 3,000 lbs 	Jet comercial ~ 30.000 lbs (sin combustible) 

Figura 1. Comparaciones entre un medicamento biológico y de síntesis.

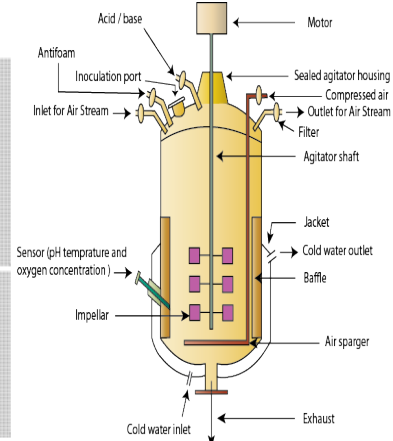


Figura 2. Biorreactor con descripciones.

Para representar mejor esta diferencia entre los medicamentos de síntesis química frente a los biológicos, el esquema de la figura 3 recoge de forma abreviada y esquemática las diferencias entre un medicamento químico y un biotecnológico.

Comparación entre los dos tipos de fármacos

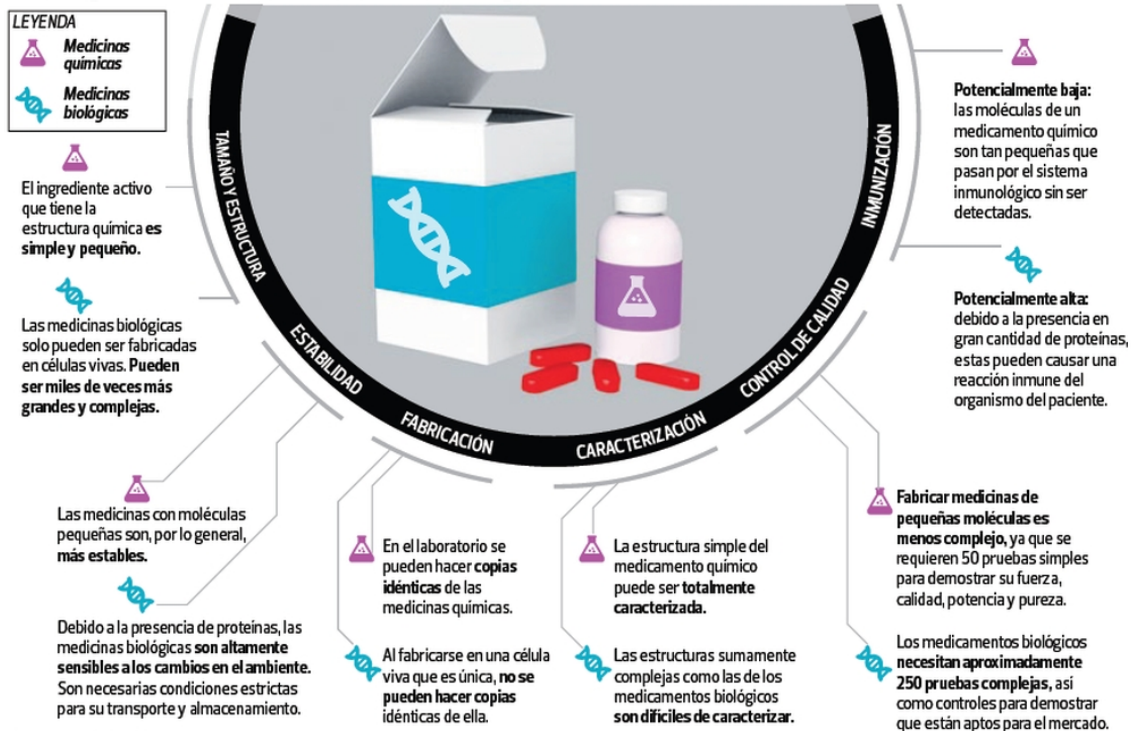


Figura 3. Comparaciones entre medicamentos de síntesis química y biológicos

De dicho esquema cabe destacar cómo características más destacadas el tamaño y por tanto la complejidad de los medicamentos biológicos frente a los químicos. Así, por ejemplo, un medicamento de síntesis química está compuesto por unas docenas de átomos frente a un medicamento biológico que incluye millones de los mismos. Además, esto conlleva unas consecuencias directas sobre el proceso de fabricación, imposibilitando la creación de copias completamente idénticas como se verá con detalle más adelante.

3.1.2. Regulación y Legislación

Podemos indicar que toda la legislación sobre estos productos biológicos es relativamente reciente y en muchos países aún no se encuentra muy desarrollada.

Teniendo en cuenta las exigencias regulatorias existentes en la industria farmacéutica, los fabricantes de productos biológicos deben cumplir con un amplio y exigente conjunto de normas para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los productos biológicos. La Unión Europea fue la primera en elaborar un marco regulatorio para los biosimilares, y de esta forma, definió el concepto de medicamento biológico similar en 2004 (Directiva 2001/83/CE, enmendada por la Directiva 2003/63/CE y la Directiva 2004/27/EC), que entró en vigor en 2005. En 2006 se aprobó el primer medicamento biosimilar. Desde esa fecha hasta enero de 2019, en la UE, hay 53 medicamentos biosimilares de 16 principios activos (adalimumab, bevacizumab, enoxaparina sódica, epoetina alfa, epoetina zeta, etanercept, filgrastim, folitropina alfa, infliximab, insulina glargina, insulina lispro, pegfilgrastim, rituximab, somatropina, teriparatida y trastuzumab) aprobados por la Comisión Europea (CE) mediante procedimiento centralizado (EMA, 2019).

Otros países como Australia, Croacia, Canadá, Japón, Malasia, Turquía, Suiza, Israel y Corea del Sur han seguido los pasos tomados por la Unión Europea. Además, otros países de Asia, Oriente y América Latina están desarrollando marcos similares. En USA, la FDA es la encargada del desarrollo de una guía regulatoria y a nivel de la OMS tiene guías publicadas basadas en el enfoque de la UE para uso a nivel mundial (figuras 4 y 5), pero se encuentran menos avanzadas. Así a modo de ejemplo, la aprobación del primer medicamento biosimilar por parte de la Agencia de Medicamentos de Estados Unidos (FDA) fue el 6 de marzo 2015. Dicho biosimilar fue Zarxio®, de Sandoz, que tiene como producto de referencia a Neupogen® (filgrastim), está aprobado para las mismas indicaciones que el medicamento de referencia. Esta aprobación fue otro hito importante para los pacientes después de la puesta en marcha a nivel europeo del primer anticuerpo monoclonal biosimilar, el infliximab.

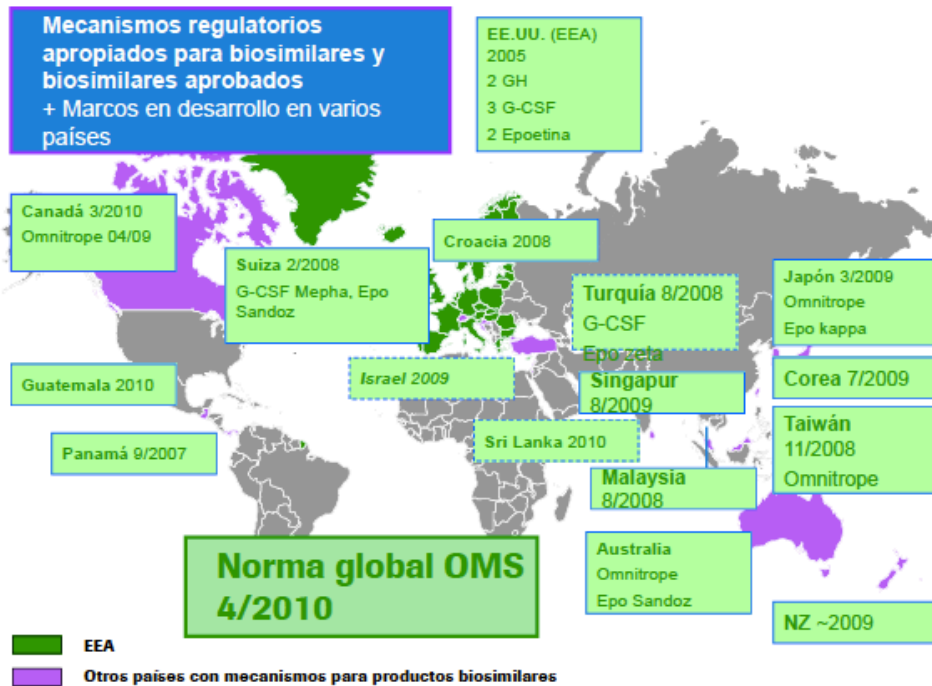


Figura 4. Perspectiva global de marcos regulatorios.

Desarrollo mundial de las directrices/regulaciones de biosimilares

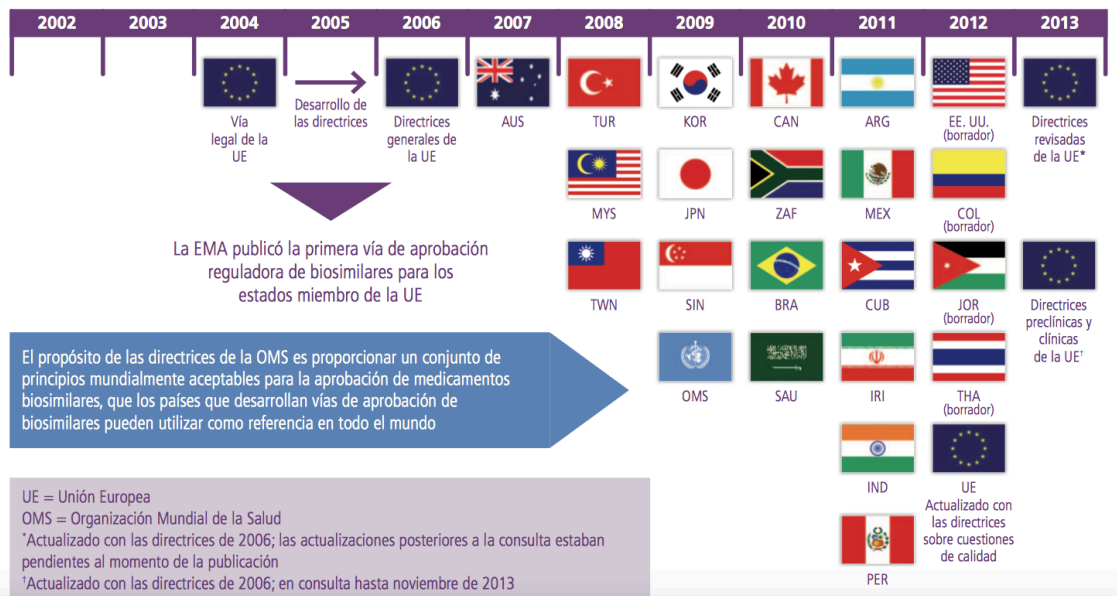


Figura 5. Imagen resumen de la International Alliance of Patients' Organization sobre las regulaciones/directrices de biosimilares.

En 2012 la EMA incluyó una definición del término “biosimilar” en uno de sus documentos de directrices sobre procedimientos en los siguientes términos:
“Un medicamento biológico similar, conocido como ‘Biosimilar’, es un producto similar a un medicamento biológico que ya ha sido autorizado llamado “medicamento de referencia”. El principio activo de un medicamento biosimilar es un principio activo biológico conocido, y similar al del medicamento de referencia. A un producto biológico similar y a su correspondiente medicamento de referencia se les presupone el mismo perfil de eficacia y

seguridad, y son generalmente utilizados como tratamiento en las mismas condiciones". El medicamento de referencia al que la solicitud de autorización de comercialización del medicamento biosimilar se refiere, "es un medicamento que ha obtenido una autorización de comercialización por parte de un Estado miembro o de la Comisión Europea basándose en el expediente completo (es decir, previa presentación de los datos preclínicos, clínicos y de seguridad)" conforme a las disposiciones aplicables a los medicamentos originales (Véase la página 8/33: EMA Procedural advice for users of the centralised procedure for similar biological medicinal products applications_EMA/940451/2011_March 2013).

A la hora de registro, los medicamentos biosimilares derivados de la biotecnología se someten al mismo proceso de registro centralizado que los medicamentos biotecnológicos de referencia, los cuales, son evaluados por los mismos expertos europeos que evalúan los productos innovadores.

El primer requisito es que el medicamento de referencia debe haber sido autorizado en la UE, después el solicitante debe justificar las indicaciones para las cuales solicita autorización respecto al producto de referencia, ya que puede tener todas o parte, pero nunca más. A continuación, el Comité de Evaluación de Medicamentos de Uso Humano de la EMA (CHMP) emite una opinión científica sobre la aprobación del dossier. La Comisión Europea toma la decisión final sobre la autorización de comercialización en la UE. Si se comercializa será válido en todos los estados miembros.

Aparte para el tema de colaboración con las partes interesadas y para redactar las guías de medicamentos biológicos y mantener el marco regulatorio para los productos biosimilares existe, el BMWP (Biological Medicina Working Party), un grupo de trabajo creado por el CHMP (Lo que debe saber sobre los medicamentos biosimilares, 2013) (CHMP, 2014; CHMP, 2010).

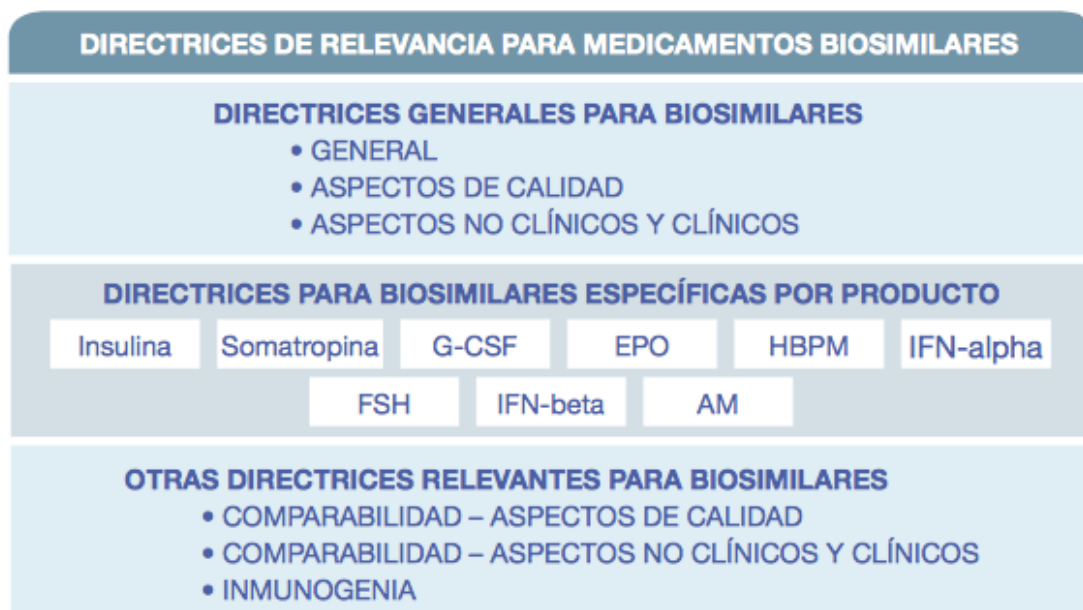


Figura 6. Esquema de las directrices de relevancia sobre biosimilares a realizar para su registro y comercialización.

Para tomar la decisión sobre la autorización del medicamento, éste ha de someterse a una serie de pruebas donde demostrará con los datos que arroje para cada una de ellas que es válido para comercializarse. En la figura 6 se esquematizan los dosieres con las guías que consta cada uno con los datos que han de aportar para la aprobación del medicamento biosimilar (Consensus Information Paper European Commission, 2013).

REQUERIMIENTOS PARA LA APROBACIÓN DEL MEDICAMENTO BIOSIMILAR

Como base para su aprobación y puesta en el mercado el medicamento biosimilar, debe cumplir una serie de requisitos como son:

- Que se emplee el mismo medicamento de referencia para todas las partes del dossier para demostrar que el medicamento biosimilar y el de referencia tienen perfiles similares en términos de calidad, seguridad y eficacia.
- Que la secuencia de aminoácidos primarios de la proteína biosimilar sea idéntica a la secuencia de aminoácidos del producto de referencia.
- La compañía de medicamentos biosimilares debe justificar cada paso del desarrollo.
- Es necesaria la parte completa de calidad y evaluación comparativa físico-química y biológica con el producto de referencia.
- Son necesarios estudios toxicológicos y farmacológicos pre-clínicos y comparativos, pero posiblemente abreviados.
- Son necesarios estudios de farmacocinética y farmacodinamia comparativos en humanos, pero posiblemente pueden ser abreviados.
- Son necesarios estudios comparativos de eficacia y seguridad en humanos, pero posiblemente abreviados, que incluyan inmunogenicidad.
- Es necesario un Plan de Gestión de Riesgos, que incluya la farmacovigilancia.

Si analizamos estas premisas que deben cumplir los biosimilares, nos damos cuenta que se realiza un fuerte hincapié en que los medicamentos biosimilares sean lo más similares posible a los originales, yendo paso por paso en todos los aspectos que incumben el proceso de fabricación del biosimilar y posteriores comprobaciones, lo que no ocurre con los medicamentos de síntesis química. También decir, que llama la atención la posibilidad de abreviar ciertos estudios, los cuales incluyen principalmente comprobaciones a posteriori de la fabricación de que la molécula sea apta a los requerimientos.

Añadir en último lugar, que las evaluaciones de "Similitud" se refieren a las pruebas comparativas de calidad, preclínicas y clínicas de un medicamento biológico producido por un diferente e independiente proceso de fabricación, estableciendo una similitud con el medicamento biológico de referencia original. A continuación, vamos a ver estos puntos con más detalle.

3.1.2.1. Requerimientos para los datos de calidad

- Que se cumplan las buenas prácticas de fabricación y control del proceso: El proceso debe desarrollarse y optimizarse, considerando los avances tecnológicos actualmente disponibles en el proceso de fabricación. Los medicamentos biosimilares se fabrican conforme a la tecnología de última generación más actualizada, lo que garantiza los más altos parámetros de calidad disponibles y por lo general los medicamentos biosimilares están mejor caracterizados de lo que lo estuvieron sus productos de referencia al momento de su aprobación, 10 o 20 años antes.
- Los estudios de formulación deben demostrar la conveniencia de la formulación propuesta con respecto a la estabilidad, compatibilidad e integridad de la sustancia activa.
- Estudios comparativos directos con el medicamento de referencia para los aspectos de calidad:
 - Las diferencias en los perfiles de impurezas y las diferencias significativas en las sustancias relacionadas con el producto o el proceso pueden tener consecuencias en lo que respecta a la cantidad de datos pre-clínicos y clínicos que se puedan requerir.
 - Las comparaciones realizadas, por ejemplo, con monografías de farmacopea u otros datos científicos publicados, no son apropiados para demostrar la similitud en términos de calidad.

Estos apartados nos están indicando que dichos medicamentos biosimilares, requieren un alto nivel de calidad y presentan unos altos requisitos para que se cumplan, y en ningún momento esté por debajo del medicamento biológico de referencia. La diferencia se hace más evidente sobre todo si los comparamos con los medicamentos de síntesis química y sus genéricos.

3.1.2.2. Requerimientos datos no clínicos

- El desarrollo pre-clínico de un medicamento biosimilar puede ser abreviado.
 - Las características del producto y los resultados de los estudios comparativos de caracterización de la calidad deben tomarse en consideración al diseñar el programa preclínico.
 - Se aconseja proceder caso a caso en las normas específicas para cada clase de producto.

- Los estudios pre-clínicos deben ser de naturaleza comparativa y deben ser diseñados con el objetivo de detectar diferencias en las respuestas entre el producto similar y el producto de referencia.
- Los estudios pre-clínicos incluyen:
 - Estudios comparativos de farmacodinámica in vitro.
 - Estudios comparativos de farmacodinámica in vivo en modelo(s) de animal(es) pertinente(s).
 - Estudio(s) comparativo(s) pre-clínico(s) de toxicidad repetida en especies pertinentes.
 - Estudios comparativos para la toxicocinética y la inmunogenicidad animal, y en caso de que correspondiese tolerancia local.
 - En el caso de los productos biosimilares no necesariamente se requieren estudios de farmacología de seguridad, toxicología de reproducción, mutagenicidad y carcinogenicidad.

3.1.2.3. Requerimientos datos clínicos

- Al igual que el anterior, el desarrollo clínico de un medicamento biosimilar puede ser abreviado, como por ejemplo el enfoque para demostrar la similitud, no la eficacia per se.
- Estudios comparativos:
 - Modelo(s) de prueba sensible(s) para detectar posibles diferencias.
 - Programa determinado caso a caso en base a la clase de producto. Para el diseño del programa clínico se deben tomar en consideración los resultados de los estudios comparativos no clínicos de calidad.
- El desarrollo clínico de un medicamento biosimilar también es un procedimiento paso a paso que debe empezar con los estudios farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD) comparativos, seguidos por ensayo(s) comparativo(s) clínico(s) de eficacia y seguridad, y un programa de gestión de riesgos posterior a la aprobación.
- Se requieren estudios FC/FD comparativos.
- Estudios comparativos de eficacia.
 - No se requieren estudios para descubrir la dosis, ya que viene definida por el innovador.
 - Demostración de eficacia "equivalente".
 - Los márgenes de equivalencia deben representar la mayor diferencia clínicamente aceptable.

- Datos comparativos previos a la autorización para evaluar el perfil de seguridad, incluida la inmunogenicidad, dado el tamaño de la molécula y su posible interacción con el sistema inmunológico.
- Los datos de los estudios clínicos previos a la autorización no son suficientes para identificar todas las posibles diferencias de seguridad, entre otras razones, dadas las variaciones que se pueden producir entre los distintos lotes que se fabriquen, es por todo ello, que estaría justificado un plan de farmacovigilancia completo.
- En casos específicos y justificados (como el de la insulina), los estudios FC/FD comparativos confirmatorios pueden ser adecuados para demostrar la eficacia similar, pero siempre se necesitan datos de inmunogenicidad en humanos en poblaciones relevantes. Las condiciones se definen en las normas pre-clínicas y clínicas, que a continuación se exponen en el siguiente punto.
- Norma para medicamentos biosimilares sobre aspectos pre-clínicos y clínicos (EMA/CHMAP/BMWP/42832/2005)
 “En caso que el medicamento original autorizado tenga más de una indicación, se debe justificar la eficacia y la seguridad del producto que declara ser similar o, si es necesario, demostrar por separado cada indicación declarada. En algunos casos, es posible extrapolar la similitud demostrada en una indicación a otras indicaciones del medicamento de referencia. La justificación dependerá, por ejemplo, de la experiencia clínica, los datos bibliográficos disponibles, o si están o no involucrados los mismos mecanismos de acción o el(los) mismo(s) receptor(es) en todas las indicaciones. También deben abordarse los posibles aspectos de seguridad en las diferentes subpoblaciones. En cualquier caso, la compañía debe justificar el enfoque adoptado durante el desarrollo del producto (...)”

De estos conceptos, se puede de nuevo comprobar como en la Agencia Europea del Medicamento (EMA), la preocupación por el empleo de biosimilares está justificada y basada en la necesidad del aporte de datos procedentes de los diferentes ensayos exigidos, dado tanto por la novedad existente en estos medicamentos y ser pioneros en la regulación de ellos, y por otro lado el potencial que tienen estos medicamentos al ser grandes moléculas capaces en algunos casos de interaccionar con distintos sistemas del organismo, tales como el inmunológico. Por lo que el objetivo principal de la valoración de un producto biosimilar no es la caracterización del perfil de riesgos/beneficios del producto como tal, sino la evaluación cualitativa y cuantitativa de la comparabilidad (similitud) del producto con respecto al producto de referencia (EMA, 2019).

El Marco regulatorio completo, se encuentra disponible en:

(http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&mi).

Finalmente, cabe destacar que los productos innovadores están protegidos durante unos diez años aproximadamente, (8 de exclusividad de datos y dos adicionales de exclusividad comercial) que puede extenderse un año más. En la siguiente tabla (figura 7) podemos ver los medicamentos innovadores próximos a caducar su patente o ya caducados, junto a los laboratorios que los fabrican y las ventas aproximadas que tuvieron durante el año 2011 (Consensus Information Paper European Commission, 2013).

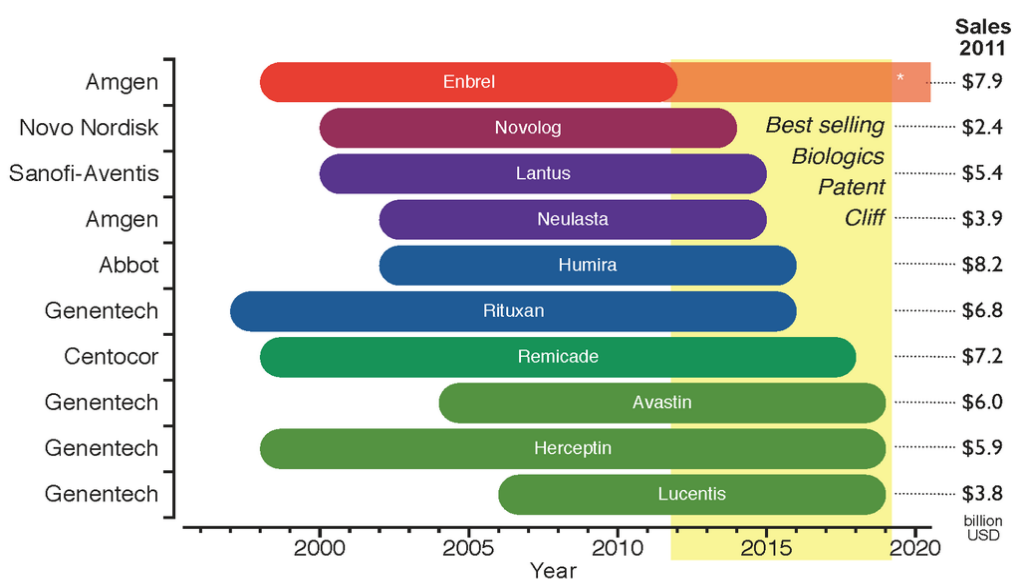


Figura 7. Ilustración medicamentos biológicos, junto a las fechas de pérdida de sus patentes y los volúmenes de ventas para el año 2011.

3.1.2.4. La intercambiabilidad

La intercambiabilidad hace referencia a la práctica médica de cambiar un medicamento por otro equivalente, en un entorno clínico dado, a iniciativa o con el consentimiento del prescriptor. Se considera que un medicamento es intercambiable si se puede administrar o dispensar en lugar de otro producto clínicamente equivalente. Los datos científicos regulatorios, publicados a través del EPAR (informe público europeo de evaluación), deberán guiar las decisiones de los prescriptores con respecto a la intercambiabilidad.

En el contexto de intercambiabilidad, debe destacarse que, si una compañía originadora modifica el proceso de fabricación de un producto existente, se acepta la intercambiabilidad entre los productos pre y post modificación a condición de que la modificación esté respaldada por un conjunto de datos de comparabilidad que revise el producto pre y post modificación. En el caso de los medicamentos biosimilares, se debe

adoptar el mismo abordaje sobre la base de los datos de comparabilidad con un producto de referencia.

Es importante reiterar que los medicamentos biosimilares concuerdan con su producto de referencia en términos de calidad, eficacia y seguridad. Por lo general se requiere una demostración de equivalencia terapéutica a fin de adoptar la posología (recomendaciones de administración) del producto de referencia.

Los datos de comparabilidad y también los datos post comercialización, demostrarán así que es seguro y eficaz cambiar dosis por dosis, del producto de referencia al medicamento biosimilar.

Igualmente es interesante señalar que la sustitución de un producto innovador por un biosimilar se legisla a nivel particular de cada país y no a nivel europeo. En el caso particular de España, recae en los gobiernos de las comunidades autónomas.

3.1.2.5. Medicamentos biosimilares comercializados

La siguiente tabla (tabla 1) a fecha de mayo de 2019 recoge todos los medicamentos biosimilares autorizados por la EMA tanto por el nombre comercial, el principio activo que contienen y laboratorio, acompañado por la fecha de autorización.

Medicamentos Biosimilares autorizados por la Agencia Europea de Medicamentos

Principio Activo	Medicamento de Referencia	Indicación	Medicamento Biosimilar	Laboratorio	Fecha autorización
Adalimumab	Humira®	Artritis, psoriasis, enfermedad de Crohn, Hidradenitis supurativa	Amgevita®	Amgen	26 Enero 2107
			Solymbic®	Amgen	26 Enero 2017
			Imraldi®	Samsung Bioepis UK Limited	24 Agosto 2017
			Cyltezo®	Boehringer Ingelheim International GmbH	10 Noviembre 2017
			Halimatoz®	Sandoz GmbH	26 Julio 2018
			Hefiya®	Sandoz GmbH	26 Julio 2018
			Hyrimoz®	Sandoz GmbH	26 Julio 2018
			Hulio®	Mylan S.A.S	17 Septiembre 2018
			Idacio®	Fresenius Kabi	2 Abril 2019
Kromeya®	Fresenius Kabi	9 Abril 2019			
Enoxaparina sódica	Clexane®	Enfermedad tromboembólica, prevención formación coágulos	Inhixa®	Techdow Europe AB	15 Septiembre 2016
			Thorinane®	Pharmathen S.A.	15 Septiembre 2016
Epoetina Alfa	Eprex®	Anemia sintomática	Abseamed®	Medice Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG	28 Agosto 2007
			Binocrit®	Sandoz GmbH	28 Agosto 2007
			Epoetina Alfa Hexal®	Hexal AG	28 Agosto 2007
Epoetina Zeta	Eprex®	Anemia sintomática	Retacrit®	Hospira UK Limited	18 Diciembre 2007
			Silapo®	Stada Arzneimittel AG	18 Diciembre 2007
Etanercept	Enbrel®	Artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis	Benapali®	Samsung Bioepis UK Limited (SBUK)	14 Enero 2016
			Erelzi®	Sandoz GmbH	7 Julio 2017
Filgrastim	Neupogen®	Neutropenia febril	Accofil®	Accord Healthcare Ltd.	18 Septiembre 2014

			Biograstim®	AbZ-Pharma GmbH	15 Septiembre 2008 (anulado a petición del titular)
			Filgrastim Hexal®	Hexal AG	6 Febrero 2009
			Grastofil®	Apotex Europe BV	18 Octubre 2013
			Nivestim®	Hospira UK Ltd	8 Junio 2010
			Ratiograstim®	Ratiopharm GmbH	15 Septiembre 2008
			Tevagrastim®	Teva GmbH	15 Septiembre 2008
			Zarzio®	Sandoz GmbH	6 Febrero 2009
Folitropina Alfa (hormona folículo estimulante)	Gonal F®	Anovulación	Bemfol®	Finox Biotech AG	27 Marzo 2014
			Ovaleap®	Teva Pharma B.V.	27 Septiembre 2013
Infliximab	Remicade®	Enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis, colitis ulcerosa	Flixabi®	Samsung Bioepis UK Limited	26 Mayo 2016
			Inflectra®	Hospira UK Limited	10 Septiembre 2013
			Remsima®	Celtrion Healthcare Hungary Kft.	10 Septiembre 2013
			Zessly®	Sandoz GmbH	18 Mayo 2018
Insulina Glargina	Lantus®	Diabetes mellitus	Abasaglar® (antes Abasria)	Eli Lilly Regional Operations GmbH	9 Septiembre 2014
			Lusduna®	Merck Sharp & Dohme Limited	4 Enero 2017
			Semglee®	Mylan S.A.S	23 Marzo 2018
Rituximab	MabThera®	Linfoma no Hodgkin, Leucemia, artritis	Truxima®	Celltrion Healthcare Hungary Kft.	22 Enero 2017
			Rixathon®	Sandoz GmbH	15 Junio 2017
			Riximyo®	Sandoz GmbH	15 Junio 2017
			Blitzima®	Celltrion Healthcare Hungary Kft.	13 Julio 2017

			Ritemvia®	Celltrion Healthcare Hungary Kft.	13 Julio 2017
			Rituzena®	Celltrion Healthcare Hungary Kft.	13 Julio 2017
Somatotropina de (Hormona crecimiento)	Genotonorm®	Alteraciones crecimiento	Omnitrope®	Sandoz GmbH	12 Abril 2006
Teriparatida	Forsteo®	Osteoporosis	Terrosa®	Gedeon Richter Pic.	4 Enero 2017
			Movymia®	STADA Arzneimittel AG	11 Enero 2017
Insulin lispro	Humalog®	Diabetes mellitus	Insulin lispro Sanofi®	sanofi-aventis groupe	19 Julio 2017
Bevacizumab	Avastin®	Cáncer	Mvasi®	Amgen Europe B.V.	15 Enero 2018
			Zirabev®		14 Febrero 2019
Trastuzumab	Herceptin®	Cáncer mama	Kanjinti®	Amgen Europe B.V., Breda	16 Mayo 2018
			Herzuma®	Celltrion Healthcare Hungary Kft.	9 Febrero 2018
			Trazimera®	Pfizer Europe MA EEIG	26 Julio 2018
			Ogivri®	Mylan S.A.S	12 Diciembre 2018
Pegfilgrastim	Neulasta®	Neutropenia	Pelgraz®	Accord Healthcare Ltd	20 Septiembre 2018
			Udenyca®	ERA Consulting GmbH	20 Septiembre 2018
			Fulphila®	Mylan S.A.S	20 Noviembre 2018
			Pelmeg®	Cinfa Biotech S.L.	20 Noviembre 2018
			Ziextenzo®	Sandoz GmbH	12 Diciembre 2018
			Grasustek®	Juta Pharma GmbH	26 Abril 2019

Tabla 1. Enumeración completa sobre medicamentos biosimilares autorizados por la EMA a Mayo de 2019.

3.1.3. Fabricación

El proceso de desarrollo de un medicamento biosimilar, a grandes rasgos, consiste en producir la línea celular, definir el proceso de fabricación, la fórmula, comprobar la similaridad y desarrollar los análisis pre-clínicos y clínicos que se requieren, con anterioridad al registro como hemos explicado anteriormente.

Se trata de un proceso que se desarrolla a través de varias fases:

En primer lugar, hay que definir los límites de la biosimilaridad. Esto se realiza con el análisis de varios lotes del producto de referencia. Este proceso nos proporciona los criterios de aceptación de calidad que el producto biosimilar debe cumplir.

Una vez se dispone de dichos criterios, se puede proceder al DESARROLLO DEL PRODUCTO. Esta fase, a su vez, se subdivide en otras siete fases que se describen a continuación:

- a) **Elección y transfección de la célula huésped.** Este proceso, por técnico que parezca, consiste esencialmente en la introducción del material genético deseado en una célula.
- b) **Selección del clon.** Las células que ya contienen el material genético correspondiente a la proteína deseada, se cultivan. A partir de ahí, se selecciona la línea celular que produzca la proteína deseada con la mejor calidad. Este paso puede suponer hasta un año y medio de investigación.
- c) **Creación de los bancos celulares.** Se toma una cantidad suficiente de células con la que poder fabricar el biosimilar durante toda la comercialización del producto (figura 8).

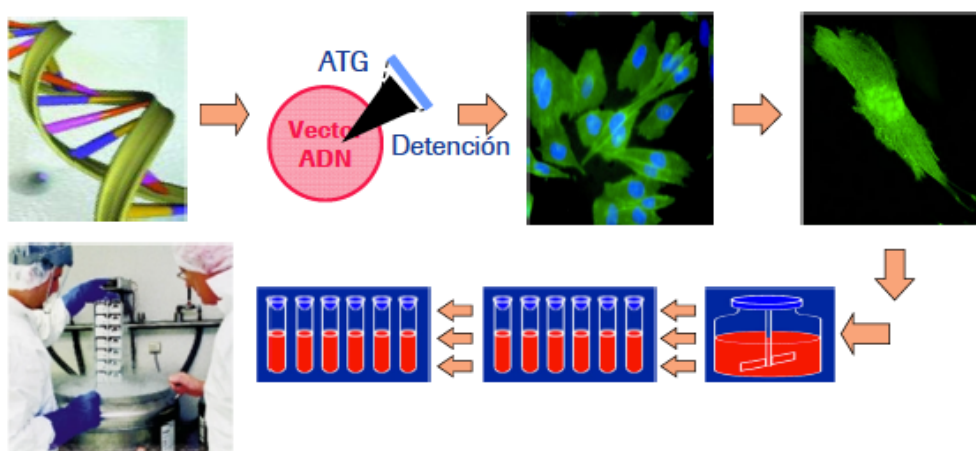


Figura 8. Tres primeros pasos del proceso de fabricación (a, b y c).

- d) **Desarrollo del proceso de fabricación:** En este apartado, se procede en primer lugar a realizar, la expansión celular y producción de la proteína, para ello se descongela una parte del banco celular y las células que contienen se ponen en un medio de cultivo para que se reproduzcan y así aumentar su número. Posteriormente, se procede a la purificación de la proteína, para ello, se somete a un proceso de eliminación de impurezas y otras sustancias que no son de interés.
- e) **Formulación:** Una vez purificada, debe elegirse una formulación en la que la proteína sea más estable. Dicha formulación contendrá, por lo general, uno o varios compuestos que actúan como buffer y que mantienen un valor de pH estable que asegura la estabilidad de la proteína en solución durante toda su vida útil. La estabilidad y el mantenimiento de la estructura de la proteína es fundamental para su efecto por ello la gran importancia de los excipientes que acompañan al biosimilar.
- f) Por último, la proteína **se dosifica** en viales mediante un proceso de llenado. Con este procedimiento se obtiene el medicamento deseado. Tras el análisis de control de calidad el producto queda listo para su uso (figura 9).

Ejercicio de similitud, para ello, se analiza el medicamento biosimilar obtenido con el proceso de fabricación diseñado comparativamente con el medicamento de referencia del mercado en una serie de análisis fisicoquímicos y de bio-actividad para confirmar la similitud del producto al medicamento de referencia y proceder al desarrollo preclínico del producto. El medicamento obtenido en la fase anterior, se estudia en animales comparativamente con el innovador, para demostrar que se comportan de la misma manera.

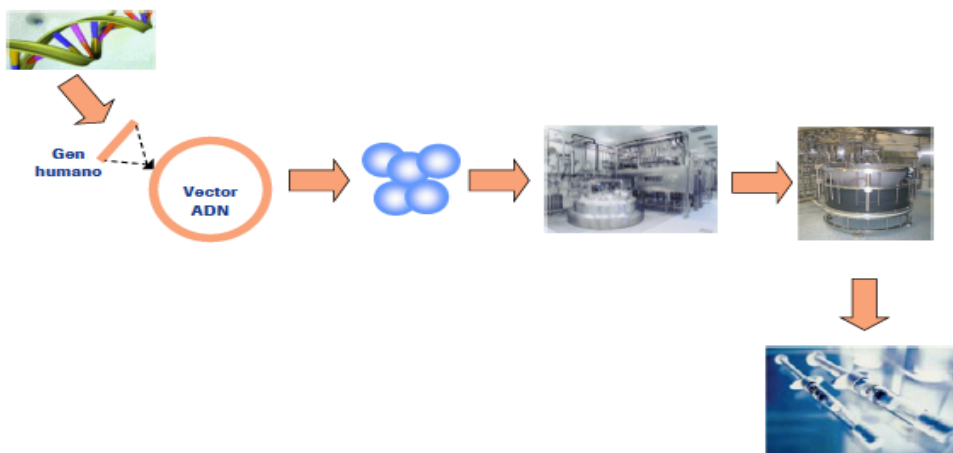


Figura 9. Resumen proceso para la elaboración del biosimilar.

A continuación, sigue el **desarrollo clínico** del producto, mediante el cual, el medicamento se estudia también en humanos comparativamente con el innovador. Todos los datos obtenidos durante el desarrollo del producto se plasman siguiendo un formato determinado en lo que se llama **dossier de registro**: una compilación de toda la información del desarrollo del producto.

Posteriormente, el dossier de registro se presenta a las autoridades sanitarias para su evaluación y aprobación si procede, usando las guías y las vías regulatorias de biosimilares disponibles en cada país, tal y como se ha descrito en puntos anteriores.

3.1.4. Comparabilidad

Una evaluación de “comparabilidad” depende del historial de producción establecido en relación con la experiencia preclínica y clínica. Esto se aplica sólo en el caso de los medicamentos biológicos producidos por el mismo fabricante.

La comparabilidad entre el medicamento de referencia y el medicamento biosimilar es el principio central que guía el desarrollo de los biosimilares y su concepto científico está bien establecido. Aunque los principios científicos que subyacen al ejercicio de comparabilidad, necesario para efectuar cambios en el proceso de fabricación de un determinado medicamento biológico y para el desarrollo de un medicamento biosimilar son los mismos, los requisitos de datos para los medicamentos biosimilares son más elevados cuando se evalúa un cambio de proceso para el mismo producto. (Lo que debe saber sobre los medicamentos biosimilares, 2013).

“...Es preciso recordar que, de realizarse cambios en el proceso de fabricación de los medicamentos biológicos originales, se requerirá también un ejercicio de comparabilidad. Ciertamente dichos cambios suelen introducirse por medio de un ciclo de vida del producto (por ejemplo, para mejorar la calidad o para incrementar el rendimiento del producto). En consecuencia, el perfil de calidad del producto biológico podría evolucionar a lo largo de su ciclo de vida, pero aún así seguiría considerándose comparable al producto antes de aplicarse los cambios, siempre que pueda excluirse con suficiente seguridad la probabilidad de que se produzca un impacto significativo en la seguridad o eficacia. Los principios científicos que subyacen al ejercicio de comparabilidad necesario en el proceso de fabricación de un determinado producto biológico y para el desarrollo de un producto biosimilar son los mismos. Pero incluso en el segundo caso, los requisitos son mayores y, al menos en la UE, incluyen siempre estudios clínicos porque, puesto que se utilizan procesos de fabricación completamente independientes, pueden esperarse algunas diferencias entre el producto biosimilar y el producto de referencia, y el impacto potencial de estas diferencias en la seguridad y la eficacia no puede predecirse a partir únicamente de la evaluación analítica...”

(Consensus Information Paper European Commission, 2013).

Se sabe que los fabricantes realizan cambios en los procesos de fabricación por muchas razones entre las que podemos incluir: el aumento en la escala de producción o cambios

en el lugar de fabricación, las mejoras en la calidad o estabilidad del producto o cambios para cumplir con nuevos requerimientos regulatorios.

Por eso, en conclusión, dado que son producidos mediante diferentes procesos, un biosimilar respecto al original nunca puede ser idéntico debido a las características de fabricación. Ello implica la evaluación de la comparabilidad que consiste en hacer referencia a una historia de fabricación establecida, que guarde relación con experiencias clínicas y preclínicas que se aplican sólo a medicamentos biológicos producidos por el fabricante original. Las evaluaciones de 'similitud' o 'biosimilitud' se refieren a un medicamento biológico producido mediante un proceso de fabricación independiente diferente (a menudo, por una compañía diferente al fabricante original). La evaluación persigue establecer la similitud con el medicamento biológico, mediante pruebas sólidas preclínicas, clínicas y de calidad.

En la siguiente tabla (tabla 2) se enumeran las diferentes categorías de comparabilidad con respecto a las pruebas a realizar.

Categoría	Componentes
A	Pruebas analíticas
B	Pruebas funcionales aplicadas <i>in vitro</i>
C	Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos (FC/FD) en animales
D	Estudio clínico (FC)
E	Se requieren datos clínicos (FC/FD) y/o seguridad

Tabla 2. Categorías respecto a los distintos componentes de las pruebas de comparabilidad.

Posteriormente, los estudios que habrá que realizar dependiendo de los cambios que se produzcan en el proceso de fabricación serán los representados en la tabla 3.

Cambio en el proceso	Requisitos de Comparabilidad
Cambio de lugar , sin cambios en las características	A (+B)
Cambios en el cultivo celular o en el proceso de purificación , sin cambios en las características	A (+B)
Cambios en el cultivo celular o cambios de recuperación , con cambios en la distribución de la carga	A + B + C
Cambios en la formulación: nuevos excipientes, o cambio de configuración	A + B + C + D
Nueva línea celular , desde una nueva trasfección o amplificación o huésped	A + B + C + E

Tabla 3. Requisitos de comparabilidad respecto a cada cambio que se produzca en el proceso de fabricación a posteriori de la comercialización.

3.1.5. Inmunogenicidad

Se define inmunogenicidad como la capacidad que tiene el sistema inmunitario de reaccionar frente a un antígeno, un estímulo bioquímico de naturaleza generalmente proteica. Cuando la inmunogenicidad es parte de la actividad farmacológica esperada, como en las vacunas, esta respuesta no se considera un efecto adverso. Sin embargo, cuando dicha inmunogenicidad no es parte de las propiedades farmacológicas del compuesto, pueden aparecer reacciones inmunotóxicas que afecten, tanto a la eficacia como a la seguridad del medicamento.

Los productos biológicos pueden ser inmunógenos y existe gran preocupación respecto a los medicamentos biosimilares, ya que están aumentando al terminar las patentes de las proteínas recombinantes, por lo que la protección contra la inmunogenicidad debe ser prioritaria para la aprobación de los medicamentos biosimilares.

Existen dos tipos de reacciones inmunes:

- Reacciones antígeno-anticuerpo: es una reacción inmune protectora contra antígenos exógenos.
- Reacciones autoinmunes: Reacción inmune adversa contra las propias proteínas y homólogos humanos administrados.

Finalmente, con el fin de demostrar la seguridad y eficacia de un medicamento biosimilar, las autoridades regulatorias y los expertos coinciden en que se necesitan datos de pre-autorización:

- Datos pre-clínicos.
- Datos clínicos (que incluyen pruebas de inmunogenicidad).

Para ello, el riesgo debe evaluarse con un número adecuado de pacientes y estudios clínicos de duración apropiada. Sin embargo, actualmente la inmunogenicidad sigue estando rodeada de incertidumbre, debido fundamentalmente a que los medicamentos pueden tener un alto porcentaje de no humano y pueden estimular las reacciones inmunes en el organismo. El proceso sería que la administración del producto recombinante hiciera que las células T activasen a las B reconociendo la proteína endógena como parte de la exógena ocasionando la rotura de la tolerancia de la célula B, activándose y secretando anticuerpos que se unan al producto exógeno y endógeno.

3.1.6. Farmacovigilancia

Toda empresa farmacéutica debe tener implantado un sistema de farmacovigilancia que pueda usar el titular de la autorización de comercialización, para controlar la seguridad de los medicamentos autorizados y para detectar cualquier cambio en su balance beneficio/riesgo. Este sistema de farmacovigilancia está sujeto a inspecciones

por parte de las autoridades reguladoras. Cada empresa debe presentar un Plan de Gestión de Riesgos protocolizado (EU-RMP) junto con la solicitud de autorización de comercialización. El EU-RMP describe el sistema de gestión de riesgos que la empresa incorporará al medicamento en cuestión, una vez que este pueda comercializarse. El EU-RMP describe el perfil de seguridad del medicamento, y además el modo en que el fabricante podrá seguir controlándolo y solventar cualquier deficiencia de conocimiento en lo relativo a su seguridad y eficacia. El EU-RMP describe también las medidas que el solicitante tiene previsto incorporar, con el fin de evitar o de reducir al mínimo los riesgos potenciales de usar el medicamento, incluida la medición de su eficacia en la práctica clínica.

En virtud de la nueva legislación de la UE en materia de farmacovigilancia, se puede conceder una autorización de comercialización a condición de que se realicen estudios de seguridad (PASS) y estudios de eficacia (PAES) posautorización (Directiva 2010/84/UE, Reg. (UE) 1235/2010). Estos estudios serán parte del plan de farmacovigilancia del EU-RMP. El objetivo de un estudio PASS consiste en identificar, caracterizar o cuantificar el riesgo para la seguridad, en confirmar el perfil de seguridad del medicamento o en medir la eficacia de las medidas de gestión de riesgos, durante su vida útil.

La inmunogenicidad es una de las principales cuestiones de interés de cualquier medicamento biológico, que debe abordarse en el informe EU-RMP. Un PAES será necesario, por ejemplo, cuando existan preocupaciones relativas a determinados aspectos de eficacia de un medicamento, que solo puedan resolverse una vez que este se haya comercializado. La Comisión Europea, por medio de otras leyes subordinadas independientes, se encargará de definir las situaciones en las que podría ser necesaria la realización de estudios PAES.

El EU-RMP de un medicamento biosimilar es específico del producto, y debe ser aprobado por las autoridades competentes, antes de que el producto pueda comercializarse. Todos los medicamentos biosimilares del mercado disponen de un EU-RMP con información sobre el Plan de Gestión de Riesgos (RMP), incluidos en el informe de evaluación publicado en el sitio web de la EMA. El EU-RMP de un medicamento biosimilar debe considerar el perfil de seguridad conocido del medicamento de referencia.

Para todos los medicamentos, el resumen de características del producto y el prospecto deberán incluir un texto estándar en el que se inste a los profesionales de la atención sanitaria y a los pacientes, a notificar cualquier sospecha de reacción adversa, de conformidad con los sistemas de notificación espontánea de cada país (que deben contemplar distintas vías de notificación, incluida la notificación electrónica por medio de formularios web). Para la notificación de reacciones adversas (RAM) relativas a cualquier medicamento biológico, incluidos los biosimilares, es de vital importancia identificar claramente el medicamento de que se trata. Así, la legislación europea obliga a que toda notificación de una reacción adversa de un medicamento biológico vaya acompañada del nombre aprobado del medicamento y del número de lote. Por el mismo motivo, tal y como dispone la nueva legislación de la UE en materia de

farmacovigilancia, “los Estados miembros garantizarán, mediante métodos de recogida de información, y, en su caso, seguimiento de las notificaciones de sospechas de reacciones adversas, la adopción de todas las medidas oportunas para identificar cualquier medicamento biológico prescrito, dispensado o vendido en su territorio objeto de una notificación de sospechas de reacciones adversas, teniendo debidamente en cuenta el nombre del medicamento, y del lote. La nueva legislación de la UE en materia de farmacovigilancia, incorpora asimismo un nuevo enfoque que consiste en publicar una lista de medicamentos sujetos a un control adicional, durante un periodo de tiempo determinado. La EMA y los Estados Miembros trabajarán conjuntamente en esta lista, y durante 2012 se tomaron más medidas en esta dirección. Así, se desarrollaron y adoptaron un conjunto completo de directrices sobre Buenas Prácticas de Farmacovigilancia (GVP).

Los medicamentos sujetos a control adicional deben ir identificados como tales por medio de un símbolo de color negro (▼). Este medicamento está sujeto a seguimiento adicional, y se añadirá una declaración explicativa al resumen de características del producto y al prospecto del producto. Como resultado, la implantación de la nueva legislación de la UE ha reforzado la farmacovigilancia de todos los medicamentos y se ha incrementado la transparencia, comunicación y confianza (Consensus Information Paper European Commission, 2013).

3.1.7. Perfil económico

Los medicamentos biológicos son hoy en día una parte indispensable del arsenal médico actual para el tratamiento de diversas enfermedades graves y debilitantes. Por lo general, los medicamentos biológicos tienen un precio más elevado que los medicamentos de síntesis química, y gestionar su uso supone todo un reto para las distintas administraciones. Cuando nos referimos a las copias de los medicamentos originales de referencia, los medicamentos biosimilares suelen ser más difíciles y costosos de desarrollar que los medicamentos genéricos de molécula pequeña, repercutiendo en su precio.

Las implicaciones presupuestarias de los medicamentos biológicos han ido creciendo con el paso de los años, por lo que gestionar correctamente su uso es un objetivo cada vez más importante para las administraciones. Los medicamentos biosimilares pueden ofrecer una alternativa más económica a los medicamentos biológicos existentes que hayan perdido sus derechos de exclusividad (por ejemplo, patentes, protección de datos, etc) y favorecer la competencia. Como resultado, la disponibilidad de los medicamentos biosimilares podría mejorar el acceso de un mayor número de pacientes a los medicamentos biológicos, y a la vez contribuir a la sostenibilidad financiera de los sistemas sanitarios. De esta manera, su disponibilidad ofrece ventajas económicas potenciales para los sistemas sanitarios, mientras se aborda la cuestión de las nuevas

alternativas de tratamiento que plantean los avances realizados en el campo de la medicina.

Una vez aprobados y autorizados para su venta, los medicamentos biosimilares introducen un elemento importante para la actual competencia de precios en el mercado de la UE. Debe reconocerse, en todo caso, que la diferencia de precios entre los medicamentos biosimilares y sus correspondientes medicamentos de referencia, al menos de momento, no ha sido tan sustancial como la experimentada en el mercado clásico de los medicamentos genéricos de síntesis química y todavía está por ver cómo evolucionará el mercado en el futuro; aunque, es de prever que en los próximos años acaben aprobándose y comercializándose en Europa un mayor número de medicamentos biosimilares (The Global Use of Medicines, 2017).

En casi todos los mercados de la UE se han lanzado medicamentos biosimilares autorizados por la UE que ahora ofrecen nuevas opciones de tratamiento tanto a médicos como a pacientes. Como resultado, la incorporación de medicamentos biosimilares se ha traducido en una mayor competencia de mercado. De hecho, los datos de mercado desde mediados de 2011 apuntan a que todos los medicamentos biosimilares han experimentado un crecimiento en términos de ventas y, al mismo tiempo, han reducido el coste de tratar a los pacientes con dichos medicamentos. El crecimiento de las ventas varía según los mercados de la UE y las clases de producto, lo que indica que la dinámica de mercado no es la misma para cada caso. En términos generales, los medicamentos biosimilares están empezando a proporcionar los beneficios esperados, ofreciendo a médicos y pacientes otras opciones de tratamiento y haciendo posible que los pagadores puedan acceder a una gama más amplia de herramientas para gestionar mejor el gasto sanitario.

Por otro lado, aunque los medicamentos biosimilares representaban un segmento relativamente reducido del mercado farmacéutico de la UE, actualmente están experimentando un fuerte crecimiento anual. El motivo es que, además de los medicamentos biosimilares, de sus productos de referencia y de los denominados productos “no de referencia”, en ocasiones suele existir otra clase adicional de productos que es necesario tener en consideración. Esta clase incluiría los medicamentos biológicos de acción prolongada protegidos por patentes que tratan la misma enfermedad que los productos de acción corta. Estos medicamentos de acción prolongada, también constituyen una alternativa potencial a los medicamentos biosimilares y a sus medicamentos de referencia, para el tratamiento de enfermedades similares. Se espera con toda seguridad que, una vez que estos medicamentos vean expirar sus derechos de exclusividad, también ellos deberán hacer frente a la competencia directa de los biosimilares. Como se había previsto para 2017, el coste de los productos biológicos supone aproximadamente el 20 % del gasto farmacéutico total a nivel mundial del tratamiento médico. Los medicamentos biosimilares pueden ayudar

a reducir el gasto total previsto de estos tratamientos biológicos tan necesarios y, por tanto, aumentar su accesibilidad para los pacientes. Los biosimilares ofrecen una nueva posibilidad de aportar valor en el sistema sanitario a nivel mundial, pues posiblemente produzcan los suficientes beneficios, para poder ayudar con ello a las innovaciones médicas que vayan surgiendo (de Mora, 2015; Arganda, 2016).

Es importante recordar que la incorporación al mercado de los biosimilares ha sido posible a pesar del hecho de que la sustitución entre el producto biosimilar y su medicamento de referencia no se practica al nivel de farmacia para ellos. La decisión de sustituir o no un medicamento biológico, no está dentro de las competencias de la EMA/CHMP, sino que es responsabilidad de las autoridades competentes de cada Estado miembro de la UE. De esta manera, por ejemplo, en Alemania, en virtud del marco de sustitución "aut idem" (sustitución por equivalentes idénticos), los farmacéuticos pueden sustituir entre sí productos fabricados biotecnológicamente que:

- a) se hayan aprobado por referencia a un mismo producto de referencia y que
- b) hayan sido fabricados por el mismo fabricante y proceso de fabricación.

La única diferencia entre dichos productos sustituibles sería su nombre comercial. En la actualidad, ningún país ha autorizado expresamente la sustitución de productos biológicos de distintos fabricantes, y algunos Estados miembros de la UE han implantado disposiciones legales, normativas y políticas con el fin de prevenir esta práctica. En España la competencia recae en los gobiernos de las comunidades autónomas. (Consensus Information Paper European Commission, 2013).

La experiencia general hasta la fecha sugiere, por tanto, que las condiciones más importantes para la incorporación al mercado de los medicamentos biosimilares son propiciadas por factores relativos al mercado comercial. Las diferencias en los distintos Estados miembros de la UE en cuanto a sistemas nacionales de salud, estructuras y procesos afectan por tanto a la adquisición de mercado de dichos medicamentos. Estas diferencias pueden incluir todas o algunas de las siguientes:

- Percepción de los medicamentos biosimilares por parte de la comunidad médica.
- Aceptación de los medicamentos biosimilares por parte de los pacientes.
- Normativa local sobre fijación de precios y reembolso.
- Políticas y condiciones de suministro.

Por lo tanto, es fundamental que los médicos y los pacientes compartan un profundo conocimiento de los medicamentos biológicos, incluidos los biosimilares, y que manifiesten confianza en el uso de cualquiera de las terapias o tratamientos. Esto puede lograrse con un marco normativo sólido y una gestión de riesgos eficaz, con transparencia en lo que se refiere a los medicamentos biológicos y con una formación

continúa en materia de medicamentos biológicos, incluidos los biosimilares, y por supuesto sin olvidar el apartado de farmacovigilancia exigible (Petalanda, 2018). Para entender mejor la importancia de los biosimilares, consideramos fundamental focalizarnos en sus inicios y el rápido posicionamiento que adquieren en el mercado. Desde muy temprano, los medicamentos biosimilares empezaron a cumplir las expectativas que se les fijaban entre sus objetivos, experimentando un crecimiento estable y así en 2011 representaban ya un 11% del total de ventas de productos biológicos en la UE, cifra que se ha duplicado en 2018 y tiende a seguir creciendo en 2019.

Como también hemos comentado con anterioridad, el otro gran hito de los medicamentos biosimilares se refería a la contención de los costes sanitarios, al provocar un incremento en la competencia del mercado. Los resultados de este incremento en el número de biosimilares no significan en ningún caso que los medicamentos de referencia hayan disminuido. Los medicamentos de referencia han mantenido su volumen, pero su valor ha disminuido (EGA, 2016).

Después del análisis anterior y la perspectiva sobre el inicio de los medicamentos biosimilares, queda la gran importancia económica que suponen y que nos lleva al presente preguntándonos:

¿Cuánto podemos ahorrar con el uso de medicamentos biosimilares?

El presupuesto sanitario para la factura farmacéutica de los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) tiene un crecimiento cada vez mayor. La razón la contribuyen los medicamentos biológicos de dispensación fundamentalmente en hospitales. Así, 9 de los 15 fármacos más vendidos en la última década son biológicos, con ventas globales que superan los mil millones de dólares anuales. Como ejemplos basta citar las ventas mundiales de Remicade® (infiximab) superaron los 7.500 millones de dólares, y las de Avastin® (bevacizumab), los 6.000 millones (mAbxience blog 1, 2016).

Aproximadamente en el conjunto de los países de la OCDE, si se incluyen los medicamentos hospitalarios la factura asciende al 20% del gasto sanitario, y en el caso de España, hasta el 25%. Además, los fármacos biológicos suponen hoy en día aproximadamente el 50% de la factura farmacéutica hospitalaria (mAbxience blog 2, 2016).

Como hemos comentado anteriormente el fuerte y creciente impacto económico de los medicamentos biológicos hospitalarios en la factura farmacéutica se debe a su elevado coste de investigación, desarrollo y fabricación. Esta cifra está lejos de reducirse, IMS Health y otras organizaciones prevén un incremento superior en los próximos años. IMS

estima que las ventas totales de biológicos representaron a lo largo de 2017 un total de 166.000 millones de dólares, lo que supondrá el 15% del mercado farmacéutico mundial en gran medida atribuible al uso generalizado de anticuerpos monoclonales (The Global Use of Medicines, 2017).

Los datos que arrojan las previsiones es que tendrán un impacto presupuestario creciente para los sistemas nacionales de salud, que tendrán muy serias dificultades para asumirlo. Sin embargo, el acceso de los pacientes a medicamentos biológicos debe garantizarse, disminuyendo los efectos económicos perjudiciales que traen consigo y aquí cobran su mayor importancia los medicamentos biosimilares: satisfacer la demanda de medicamentos biológicos, conforme van desapareciendo sus patentes.

Los medicamentos biosimilares disminuyen los gastos a la vez que mantienen la calidad y esto es muy positivo tanto para los sistemas sanitarios como para los pacientes.

De una manera aproximada el biosimilar posee un descuento de entre un 20 y un 35% respecto al producto de referencia. Un informe estimó que sólo en la Unión Europea la sustitución de biológicos originales por biosimilares asumiendo un ahorro promedio de hasta un 35%, permitiría liberar entre 11.800 y 33.400 millones de euros entre 2007 y 2020 en ocho países de la UE entre los que se encuentra España. Este dinero, que de facto podría contabilizarse como ahorro, puede luego destinarse a la adquisición de medicamentos innovadores u otros recursos sanitarios para beneficio de los pacientes (Biosim blog, 2016).

Por todo ello, podemos asegurar que el biosimilar se erige como una opción a recomendar ante la necesidad terapéutica de un biológico.

En el caso particular de España, el mercado de los biosimilares es aún incipiente. Por ejemplo, la penetración de biosimilares como eritropoyetina, folitropina alfa, somatropina, filgrastim e infliximab en Valencia en 2015 alcanzó el 17,61% del sector hospitalario (Arganda, 2016). Esta cifra, sin embargo, es muy desigual dependiendo del fármaco en cuestión, aunque los valores sólo han aumentado desde entonces. Según la opinión de expertos españoles, uno de los mayores desafíos en el sector de los biosimilares es el conocimiento y la confianza en ellos por parte de los profesionales sanitarios. Aunque cada vez su conocimiento esta más extendido, en un estudio de 2016 el 58% de los médicos españoles no describe adecuadamente lo que es un biosimilar (Diego, 2016). Además, los profesionales no son suficientemente conscientes de la calidad, la eficacia y la seguridad de estos fármacos. Con eso en mente, es difícil generar una buena opinión por parte del paciente. Guías para profesionales por parte de los organismos públicos, intentan cubrir esta deficiencia. Una mejor comunicación entre las administraciones sanitarias, las agencias regulatorias, los médicos y los pacientes, sin duda mejorará la opinión sobre los biosimilares, en lugar de considerarles exclusivamente como el resultado de una imposición por razones económicas.

Finalmente, a finales de 2019, medidas como el 'precio dinámico' para los biosimilares en función del volumen de ventas o subastas para estimular el descuento, son las últimas propuestas del Ministerio de Sanidad para estimular estos medicamentos. (Arganda, 2019; Redacción médica, 2019).

Una vez analizado el importante papel de los medicamentos biosimilares vamos a describir brevemente la patología a la cual va a ir el medicamento objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, -ictus-.

3.2. EL ICTUS Y LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

El término ictus proviene del latín golpe y describe las consecuencias de la repentina interrupción del flujo sanguíneo a una determinada parte del cerebro (isquemia) siendo el mayor número de casos presentados (85%), o de la rotura de una arteria o vena cerebral (hemorragia) que representan el 15%.

Como consecuencia del ictus pueden verse afectadas de manera transitoria o permanente las funciones cerebrales correspondientes a la zona afectada, al privarse a la misma del suministro de oxígeno por parte de la sangre.

El ictus se encuentra ampliamente extendido, de esta manera:

- Es la segunda causa de muerte más frecuente en el mundo.
- Es la principal causa de discapacidad física en personas adultas y segunda de deterioro cognitivo.
- 1 de cada 6 personas sufrirá un ictus a lo largo de su vida.
- Cada 6 minutos se produce un ictus en España.
- Cada 14 minutos muere un paciente por ictus en España.
- En España es la principal causa de muerte en mujeres.
- En el caso de la morbilidad, algunos datos destacados respecto a esta enfermedad son que el 32,3 % requiere rehabilitación, el 27,4 % presenta discapacidad para alguna actividad básica de la vida diaria, el 17,7 % de los pacientes que han sufrido un ictus son dependientes a los seis meses, el 12,5 % sufre depresión en los tres primeros meses y el 10 % evoluciona a demencia en los tres meses siguientes (FEI, 2015; Hospital Clínic Universitario, 2018).

Estas estadísticas constituyen una importante perspectiva del impacto que tiene esta enfermedad en la sociedad y la importancia de trabajar en nuevos tratamientos sobre la misma.

Además, las expectativas que se presentan según el estudio PREVICTUS es que casi dos millones de personas en nuestro país, presentan un alto riesgo de padecer un ictus en los próximos 10 años y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2050 casi el 50% de la población podría sufrir un ictus.

Esta situación hace plantear la creación de estrategias focalizadas en prevenir el ictus (Feigin y col., 2015), mejorar su atención en la fase aguda (Álvarez-Sabín y col., 2011) y fomentar las terapias y programas de neuroreparación y rehabilitación que permitan minimizar las secuelas tras el evento agudo (Álvarez-Sabín y col., 2006).

En definitiva, el ictus constituye una de las enfermedades del sistema nervioso central más destacables y que repercute en consecuencias nefastas en las áreas personales, sanitarias y económicas. Sin dejar de lado como afecta a la calidad de vida del paciente

y sus familiares, la enfermedad conlleva una inversión económica en lo que respecta a grado de dependencia que adquiera el paciente, instituciones públicas o privadas que puedan costearlo y a la posible pérdida de vida laboral que adquieran los supervivientes (Díez-Tejedor, 2004). Vistas las dimensiones de la enfermedad, el hecho de mejorar el arsenal terapéutico, así como la prevención del ictus constituyen el proyecto de la presente Tesis Doctoral. Para el tratamiento del ictus, es necesario que el fármaco a utilizar alcance el sistema nervioso central (SNC) y para ello encuentra el gran obstáculo que supone la BHE, barrera biológica que impide el paso al lugar de acción y que necesitamos superar para que el tratamiento del ictus sea efectivo.

La BHE es una red de vasos sanguíneos y tejido que se compone de células unidas estrechamente y cuya finalidad es evitar que penetren sustancias que comprometan el encéfalo, como podrían ser bacterias o muchas sustancias medicamentosas. De la misma manera permite que ciertas sustancias como son el agua, el oxígeno y dióxido de carbono además de otras como los anestésicos generales alcancen el encéfalo.

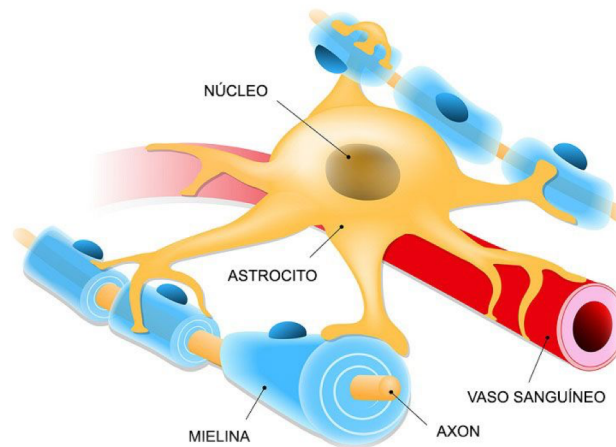


Figura 10. Esquema de la Barrera Hematoencefálica.

Su función se hace patente cuando intentamos administrar un tratamiento para tratar alguna patología que afecte al SNC. Nos encontramos ante la ausencia de un efecto, pues el fármaco no alcanza su diana (Ribatti y col., 2006). Esto ocurre por ejemplo con tratamientos de dopamina para la enfermedad de Parkinson, antibióticos para la meningitis o citostáticos para la lucha de tumores primarios del SNC (Begley, 2004). Sin embargo, también se considera la principal diana para el suministro de fármacos al cerebro, ya que proporciona una gran interfaz (20 m^2) entre la sangre circulante y el parénquima cerebral (Rip y col., 2009; Chen y Liu, 2012).

Debido a su importancia fisiológica y terapéutica la BHE es muy investigada. Está constituida por una monocapa de células endoteliales, así como por los pies de los astrocitos, neuronas perivasculares y pericitos (figura 10) (Bhowmik y col, 2015; Betsholtz, 2014; Chen y Liu, 2012; Hawkins y Davis, 2005; Bickel y Marsch, 2001). En esta composición, el elemento clave que determina la propiedad barrera son las células

endoteliales (Alyautdin y col., 2014; Correale y Villa, 2009; Daneman y Rescigno, 2009). Estas células de los vasos del encéfalo y la médula espinal comparten una serie de características morfológicas y funcionales que las diferencian de los endotelios del resto de los vasos y que explican el aislamiento sanguíneo del tejido nervioso. En primer lugar, debemos resaltar, en comparación con las células endoteliales "normales" que recubren los vasos sanguíneos en el resto del cuerpo, la existencia de un sellado intercelular del endotelio por medio exclusivamente de uniones estrechas (tight junctions), consideradas de mayor complejidad respecto al resto de los epitelios (Dermietzel y Krause, 1991; Lane y col., 1992). De este modo, se encuentran estrechamente unidas existiendo zonas o bandas, denominadas ocludens, que cierran herméticamente el espacio intercelular impidiendo cualquier comunicación con el espacio extravascular (figura 11). Esto se debe a la intercalación de proteínas transmembrales (occludinas y claudinas) con otras proteínas citoplásmicas. Las uniones estrechas y la filtración de estas uniones, se regulan de forma activa y cercana por los astrocitos circundantes, pericitos, microglia, neuronas y matriz extracelular (Pascual-Garvi y col., 2004; Arthur y col., 1987; Neuthaus y col., 1991).

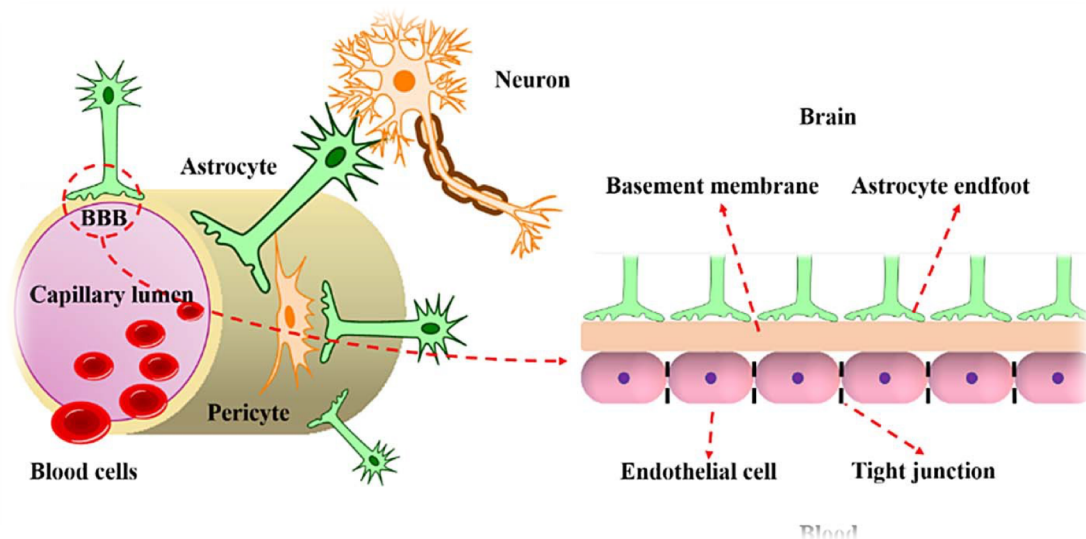


Figura 11. Representación esquemática de la BHE y de las uniones intercelulares (Zhou Y. y col., 2018)

Además, la BHE se caracteriza por la carencia de poros intracelulares y vesículas de endocitosis intraendoteliales, en comparación con el elevado número de vesículas observables en el endotelio de otros órganos (Steward y Coomber, 1986; Wolburg y Risau, 1995). Mediante dichas vesículas, la mayoría de las células internalizan moléculas solubles a partir de una invaginación de la membrana celular, en la denominada endocitosis en fase fluida. En el endotelio con BHE, esta vía de comunicación directa transcelular entre los espacios intra y extracelulares está muy limitada, predominando la endocitosis mediada por receptores (Kandel y col., 2000). Por tanto, se puede afirmar que las células endoteliales del cerebro se encuentran altamente polarizadas y

muestran una baja actividad pinocítica, aunque presentan diferentes mecanismos de transporte activo que aseguran la homeostasis en el cerebro.

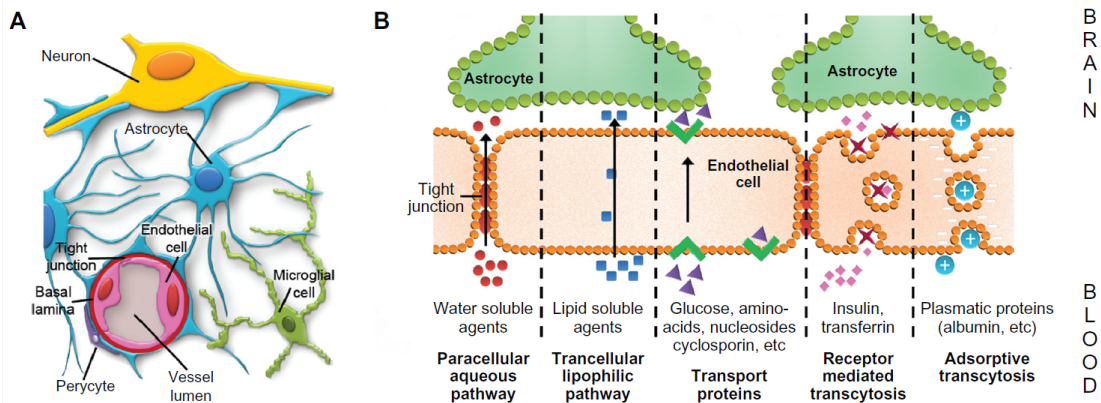


Figure 1 (A) Structure of the blood-brain barrier, established by the endothelial cells of blood capillaries and their tight junctions (B) Different mechanisms for the transporting of substances across the blood-brain barrier. Adapted from *Mol Med Today*, 2, Abbott NJ, Romero IA, Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. 06-113. Copyright (1996), with permission from Elsevier.⁴

Figura 12. Representación esquemática de la BHE y varios tipos de transporte a través de la misma (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

No obstante, recientemente, sí se ha identificado una vía transcelular para las proteínas de mayor peso molecular. En este sentido, el elevado número relativo de mitocondrias por célula endotelial indica una actividad metabólica superior a la de otros endotelios, probablemente relacionada con el mayor número y actividad de los sistemas de transporte activo transmembrana (Villegas y Broadwell, 1993).

Por último, existe una lámina basal simple que rellena el estrecho espacio pericapilar entre el endotelio y los pies gliales o astrocitos (Pascual-Garvi y col., 2004).

Como se observa en la figura 12, existen diferentes mecanismos de transporte para que las moléculas puedan acceder al cerebro, destacando:

- Difusión pasiva siguiendo una ruta transcelular. Este mecanismo está reservado para pequeñas moléculas lipófilas de pequeño tamaño molecular (<400 -500 Da) (Boer y Gaillar, 2007), como el oxígeno, dióxido de carbono y nicotina. No obstante, es importante tener en cuenta que el paso de moléculas lipófilas de gran tamaño hacia el cerebro también se ve obstaculizado por el hecho de que estas células endoteliales contienen altas concentraciones de p-glicoproteínas, proteínas ATP-dependientes que mediante un mecanismo de e-flujo devuelven fármacos lipófilos de elevado peso molecular a la sangre.

- Difusión paracelular utilizada por moléculas de naturaleza hidrófila, de pequeño tamaño molecular y que puedan difundir a través de las uniones estrechas de las células endoteliales (Ballabh y col, 2004).

- ✚ Transcitosis mediada por portador es un tipo de transporte específico facilitado, lo aprovechan pequeñas moléculas como glucosa, bases púricas o aminoácidos esenciales. Estos transportadores forman parte de la membrana de las células endoteliales y son altamente específicos.

- ✚ Transcitosis mediada por receptor. Se trata de una endocitosis mediada por receptor en la que se produce la inclusión del complejo ligando-receptor. Es el único mecanismo que permite el paso de moléculas de gran tamaño como anticuerpos y proteínas, utilizado, por ejemplo, por la leptina, transferrina o insulina. Tiene el inconveniente, además, de ser saturable (Pardridge, 2015).

- ✚ Transporte por adsorción. La membrana de las células endoteliales cerebrales está cargada negativamente a pH fisiológico debido a la presencia de proteoglicanos, mucopolisacáridos, glucolípidos y glucoproteínas que contienen sulfatos y ácidos siálicos. El transporte por adsorción se produce como resultado de una interacción electrostática entre la molécula cargada positivamente y la región de la membrana plasmática cargada negativamente. Este transporte es saturable y no específico y se produce a nivel muy pequeño en situaciones de alteración fisiológica (Loch-Neckel y Koepp, 2010).

No obstante, en algunas afecciones patológicas, incluidos los tumores cerebrales, los accidentes cerebrovasculares, la enfermedad de Parkinson y la inflamación, la BHE puede perder su integridad y funcionalidad, aumentando de este modo su permeabilidad (Davies, 2002).

Por tanto, nuestro objetivo es el diseño de fármacos que sean capaces de atravesar la BHE, y para ello vamos a intentar utilizar la nanotecnología para conseguir sistemas de liberación de fármacos capaces de atravesar esta barrera.

3.3. NANOTECNOLOGÍA

Por lo general los principios activos no son adecuados para su administración al organismo sin que sean incluidos en una forma galénica. Es por esta razón por la que la farmacia ha desarrollado las formas farmacéuticas adaptadas a las diferentes vías de administración durante su historia. Es a partir de los años 60 cuando los conocimientos de Biofarmacia y Farmacocinética provocan una transformación en la Farmacia Galénica, pasando a tener un papel primordial en la formulación y desarrollo de las formas de dosificación, que tradicionalmente habían consistido en llevar una sustancia activa a su diana terapéutica adjudicándola a un transportador como la sangre, y por lo tanto no se elegía destino. En ese momento, despierta un rol importante, la vectorización, que pasa por unir el fármaco a estructuras, que utilizando la sangre como transporte les permita llegar a un destino de manera más precisa o alcanzar lugares que anteriormente no eran posibles. Este se ha convertido en uno de los temas más interesantes hoy en día, gracias a una disciplina: la nanotecnología (Vila, 2006).

La nanotecnología es una ciencia muy reciente, que se origina a finales del siglo XX, y que consiste en la utilización de estructuras que poseen al menos una de sus dimensiones dentro de la escala manométrica (nanoestructuras) en torno a las 0,1 milésimas de milímetro y pueden transportar sustancias en su interior o exterior, proporcionando una mejor interacción con los sistemas biológicos diana (Lin y col., 2012).

La tabla 4 representa el tamaño aproximado de algunos objetos en nanómetros (nm), y en la figura 13 se observan los distintos tamaños y la escala nano y micro que tienen diferentes elementos.

OBJETO	TAMAÑO (nm)
Diámetro de un cabello	50.000
Glóbulo rojo	7.000
Bacteria	1.000
Virus	100
Diámetro del DNA	2,5
Molécula de AAS	1

Tabla 4. El tamaño aproximado de diferentes elementos.

El comienzo del empleo de la nanotecnología en farmacia, se debe al intento de solubilizar fármacos que son poco solubles tanto en agua como en lípidos. Las primeras nanopartículas terapéuticas fueron elaboradas por primera vez por Speiser y colaboradores durante la década de los 70, pensando en desarrollarlas como medio de liberación de moléculas activas y vacunas (Kreuter, 2004).

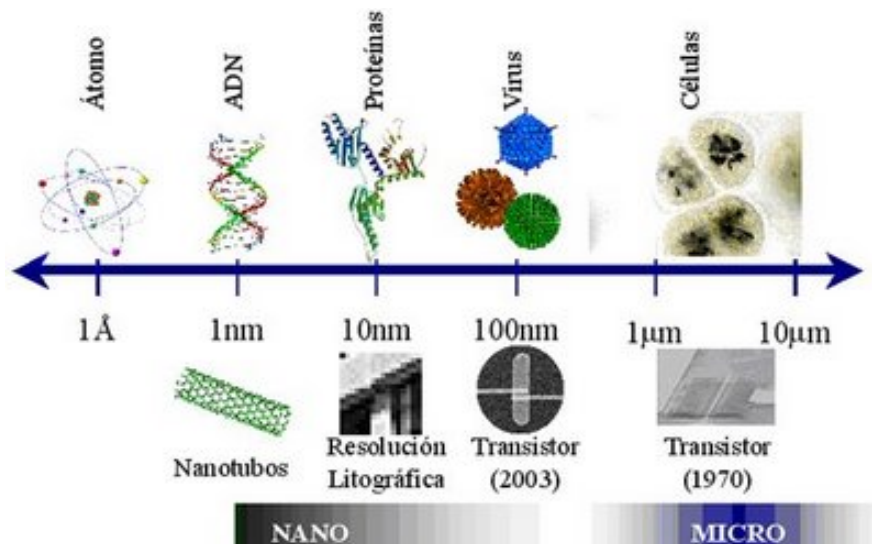


Figura 13. Línea de tamaños desde el átomo hasta las células.

El objetivo de la reducción del tamaño al nivel de nanoescala aumenta la velocidad de disolución y el límite de saturación de la solubilidad, lo cual permite un mejor efecto del fármaco *in vivo* (Kharb y col., 2006).

De esta manera, entre las ventajas de usar fármacos nanoparticulados se encuentran una mejor biodisponibilidad, una disminución de la variabilidad en la respuesta obtenida entre los estados de ayuno y no-ayuno y una rápida instalación del efecto terapéutico en la administración. La utilización de fármacos nanoparticulados, permite alcanzar niveles de sobresaturación que solo podrían ser logrados, cuando se pasa de un fármaco cristalino a uno amorfo.

Además, el tamaño de partícula juega un papel importante en la velocidad de disolución de los fármacos como hemos comentado, pues la reducción del tamaño de partícula puede aumentar la velocidad de disolución y con esto dar una mayor biodisponibilidad. Un ejemplo de ello es la biodisponibilidad absoluta del fármaco donazol, que en forma de nanopartículas fue de $82,3 \pm 10,1\%$, y en suspensión convencional fue del $5,1 \pm 1,9\%$ (Shah y col., 2006).

Otro punto importante es la biodistribución de fármacos y es que no está únicamente influenciada por la hidrofobicidad, sino que dicho tamaño y su carga superficial juegan un papel decisivo, pues de otra manera al tratarse de partículas extrañas podrían sufrir un aclaramiento inmediato por parte de los macrófagos del hígado y riñón siendo osonizadas y eliminadas del torrente circulatorio, antes de que puedan llegar a cumplir su misión. Por esta razón estos parámetros son tan decisivos, ya que una de las propiedades fundamentales en los nanosistemas es poseer una elevada semivida plasmática, pues elevados tiempos de permanencia en la circulación son fundamentales para mantener el efecto adecuado y sostenido para que agregados macromoleculares, como son las proteínas, se puedan acumular en zonas de elevada permeabilidad vascular. Hay otros factores propios del individuo como el flujo de sangre general, la

adhesión a paredes capilares, el flujo en tejidos que van a condicionar tanto su efecto farmacológico, como las concentraciones encontradas en biofase.

Las nanopartículas como vehículo o transporte de fármacos se preparan a partir de materiales diversos, como polímeros, lípidos o cristales de distintos minerales.

En nuestro caso particular se han utilizado polisacáridos, polímeros naturales de gran versatilidad debido al amplio espectro de propiedades fisicoquímicas y funcionales que realizan en los seres vivos: como estructurales, almacenamiento de energía o más especializadas como señalización, reconocimiento celular, formación de biopelículas entre muchas otras. Todas estas propiedades funcionales hacen que ciertas familias de polisacáridos sean usadas en sectores industriales como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es muy relevante la capacidad de algunos polímeros de ser capaces de formar sistemas tipo nanoparticulares lo que los hacen muy atractivos en nuestro trabajo.

Por otro lado, hay que destacar el papel que tienen los lípidos en este campo, donde alcanzan gran importancia al descubrirse en los años 60 su capacidad de formar estructuras membranosas artificiales, cuando están en un medio en presencia de exceso de agua. Los primeros sistemas empleados fueron los liposomas (figura 14), compuestos por paredes formadas por bicapas lipídicas concéntricas separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso. Aunque en un primer lugar fueron un modelo de membranas biológicas, pronto se tuvieron en cuenta para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y moléculas bioactivas debido a su carácter biodegradable y biocompatible. Pero, sobre todo, la versatilidad de los liposomas se refleja en que son capaces de incorporar a su estructura moléculas tanto hidrofílicas como hidrófobas a la vez que tienen carácter anfifílico. Además, propiedades tales como su carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared son fácilmente modulables (Fenske y col., 2008).

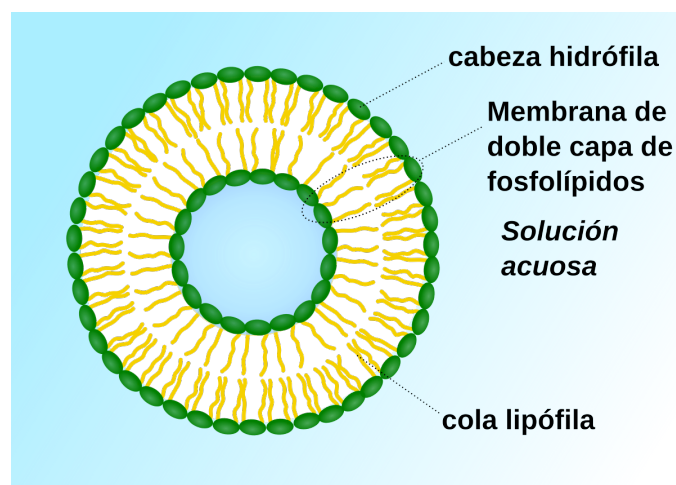


Figura 14. Liposoma y sus componentes.

Más adelante, a principios de los 90, fueron desarrolladas nanopartículas lipídicas, las cuales son parecidas a los liposomas en cuanto a su naturaleza lipídica y a las nanopartículas poliméricas en cuanto a su estructura matricial sólida, pero que mejoraban algunas propiedades como la estabilidad de los liposomas o la toxicidad de algunos polímeros y disolventes utilizados en su elaboración. En definitiva, las nanopartículas lipídicas están constituidas por lípidos biodegradables (bien tolerados) y agentes emulsificantes tanto lipofílicos como hidrofílicos, que permiten una amplia gama de vías de administración y que constituyen uno de los vehículos más estudiados actualmente para transporte y liberación de principios activos (Gasco, 2007).

Por último, en este apartado, puntualizar que el método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso que lo posea, también influyen en su funcionalidad y efectividad. Es más, hay que considerar que las nanopartículas tienen propiedades y efectos diferentes al que poseen los mismos materiales en tamaños convencionales, incluyendo alteraciones en las propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas, una mayor integridad estructural o alteraciones en sus propiedades químicas y de actividad biológica. Se considera que debido a tales alteraciones en las propiedades de los materiales en la nanoescala estos pueden repercutir en temas de seguridad, y es por ello que se está intentando estudiar las posibles interacciones que pueden ocasionar tanto en los seres vivos, como el impacto negativo a nivel ambiental al que pueden dar lugar.

En nuestros días, la aplicación de la nanotecnología ofrece un amplio abanico de posibilidades, ya sea con fines alimentarios (transporte de nutrientes), diagnósticos o terapéuticos (transporte de vacunas, genes, fármacos...) e incluso en sectores como la información y las comunicaciones, que tienen gran repercusión para la sociedad.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, surgió el concepto de nanofarmacia, es decir, el uso de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y pequeñas lesiones, con el fin de mejorar la salud. Las aplicaciones de la nanofarmacia irían desde el desarrollo y diseño de nuevos fármacos, sistemas de liberación (tanto con direccionamiento o localización específica, como sin ella), además de la creación de chips que desarrollen determinadas funciones como implantes y plataformas para tejidos.

De esta manera dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas destacan (De Jong y Borm, 2008):

- Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos.
- Aumentar la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad.

- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.
- Otorgar protección de la molécula encapsulada, por ejemplo, contra la degradación enzimática, química o inmunológica.

En nuestro caso particular, las interacciones con biofluidos y el acceso al fluido intersticial constituyen las barreras extracelulares con las que nuestros nanosistemas farmacéuticos administrados se enfrentan y son determinantes en su distribución y efecto (Monografía XXVIII).

Tanto en la actualidad como en el futuro, la nanofarmacia y su desarrollo requiere el aumento de los conocimientos acerca de los procesos de fabricación de las nanopartículas, así como de las características de los materiales con la finalidad de asegurar su reproducibilidad, su calidad y control de calidad, así como la eficiencia en costos.

Finalmente, el futuro de la farmacia en este área, con respecto al desarrollo de productos terapéuticos y sistemas de suministro de fármacos, estaría ligado a:

- ✚ El diseño de materiales estructurados, multifuncionales, capaces de atacar enfermedades específicas.
- ✚ El diseño de materiales conteniendo funciones que permitan el transporte a través de las barreras biológicas.
- ✚ El diseño de plataformas nanoestructuradas para la ingeniería de tejidos.
- ✚ El diseño de dispositivos sensibles a estímulos para la liberación de fármacos.
- ✚ El diseño de tratamientos orientados físicamente para la administración local de productos terapéuticos (vía pulmonar, ocular, transdérmica, etc).
- ✚ A un mayor suministro intracelular de productos terapéuticos macromoleculares; el diseño de sistemas autorregulados que incluyan nanoestructuras inteligentes como los biosensores, acopladas a sistemas de suministro de fármacos.

Además, podemos incluir varias líneas de investigación entre las cuales se cuentan:

- | | |
|--|---|
| ✚ Transportadores de fármacos y sistemas de liberación de genes. | ✚ Conjugados de polímero-fármaco. |
| ✚ Nanopartículas y nanocápsulas. | ✚ Conjugados de polímero-proteína y anticuerpo. |
| ✚ Tecnologías de anticuerpos. | |

- ✚ Nanoprecipitación y nanocristales.
- ✚ Tecnologías de emulsificación.
- ✚ Tecnología de los liposomas.
- ✚ Polimerización in situ.
- ✚ Ingeniería de tejidos.
- ✚ Tecnologías con dendrímeros.
- ✚ Impresión molecular.

A pesar de ello, las técnicas tradicionales como el desarrollo de formas de dosificación, validación de métodos analíticos y los estudios de estabilidad seguirán siendo requeridas, aunque con nuevos argumentos y actualizaciones (Gómez-Gaete, 2014).

Un área particular de la nanotecnología es la nanobiotecnología, la cual trata con nanomateriales y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Esto es como se viene comentando, aplicaciones en nanoescala para productos terapéuticos, para sistemas de suministro de fármacos y para plataformas o soportes para la reconstrucción de tejidos. La investigación de la nanotecnología farmacéutica se orienta al desarrollo de nuevos métodos para el suministro de los fármacos, pero también de otras moléculas más complejas como proteínas, ARN, ADN (National Nanotechnology Initiative) y por lo tanto es una extensión a lo que clásicamente ha sido la tecnología farmacéutica, de ahí la denominación de nanotecnología farmacéutica.

Una de las aplicaciones de la nanofarmacia o nanotecnología farmacéutica con mejores perspectivas de futuro, es la encapsulación de fármacos dirigidos a un lugar concreto del organismo, ya que en muchos tratamientos se requiere obtener cantidades efectivas del fármaco en un tejido en particular, dentro del organismo, mientras se mantienen los efectos sistémicos en un nivel bajo. Las nanopartículas conteniendo el fármaco se podrían recubrir con anticuerpos o receptores de la superficie celular que se unen a ciertas células para liberar su carga de fármacos al contacto con ellas.

Por lo tanto, se considera que la nanotecnología es un medio adecuado para la creación o diseño de sistemas que puedan suministrar mejor los fármacos en áreas específicas del organismo. El suministro de fármacos mediado por la nanotecnología haría factible la permeación a través de las membranas celulares, lo cual es crítico para impulsar el desarrollo de la medicina genética.

Las estructuras en nano-dimensiones podrán promover la generación de nuevos mecanismos de suministro de fármacos. Tendrían la ventaja de ser capaces de evitar el sistema inmune y de atravesar algunas barreras que el cuerpo utiliza, para evitar la penetración de sustancias extrañas o no deseadas: barreras como la hematoencefálica y la pared del tracto gastrointestinal. Se considera que los compuestos farmacéuticos reformulados como nanopartículas también podrían ser biológicamente más activos, debido a su mayor área superficiales que podría aumentar su biodisponibilidad. De hecho, en este trabajo se van a utilizar tanto los compuestos como las técnicas mas precisas para conseguir los objetivos planteados.

Las nanopartículas además de poder ser dotadas de funciones específicas (funcionalizadas) para adherirse o unirse a ciertas partes del organismo, podrían diseñarse de tal manera que fueran activadas por un disparador externo, por ejemplo, un pulso magnético o ultrasonido. Estos sistemas farmacéuticos dotados de ciertas funciones particulares (funcionalizados) se han denominado “sistemas farmacéuticos inteligentes” (Nanomedicine; Villafuerte-Robles, 2009).

Finalmente, y centrándonos en el tema de medicamentos biológicos, desde que a principios de los años 80 se incorporara la insulina y la hormona de crecimiento recombinantes, cientos de nuevos medicamentos se han introducido en el arsenal terapéutico. De hecho, el crecimiento de la ciencia actual pasa por la producción de muchos de estos medicamentos entre los que se incluyen péptidos, proteínas, ADN, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos... entre otros que son altamente eficientes para el tratamiento de enfermedades o sus síntomas, pero que sin embargo poseen propiedades que limitan su utilización terapéutica, al requerir administración intravenosa, ya que por su naturaleza presentan baja biodistribución y elevado aclaramiento (Steinberg y Raso, 1998). Es más, no siempre es posible administrar dicho tratamiento por problemas de hidrofobicidad, o de estabilidad en el caso de las proteínas, ya que además de la temperatura, pH, iones, son numerosas las enzimas que las destruyen (Zhang y col, 2018). Con la encapsulación el fármaco o proteína de interés está en el interior de estructuras poliméricas o lipídicas, esta estructura protege el encapsulado de las condiciones adversas (Loh y col., 2011).

Además, las proteínas presentan un elevado coste de producción y la cantidad elaborada para poder disponer de un efecto farmacológico, se podría reducir si logramos concentrarlas en su lugar concreto de acción, repercutiendo en una menor cantidad de proteína necesaria.

Al encapsular se producirán nanopartículas con un tamaño minúsculo, que promoverá su administración en diferentes áreas del cuerpo durante un período prolongado (Hans y Lowman, 2002). Muchos fármacos altamente tóxicos y moléculas bioactivas han demostrado una mejor biodisponibilidad, control del suministro y bioactividad tras una encapsulación exitosa, haciéndolos mucho más superiores que su homólogo tradicional. Esto es especialmente así en lo que respecta a su lanzamiento de control, impacto terapéutico y entrega dirigida. Las moléculas o proteínas encapsuladas se pueden transportar en la dosificación óptima durante un período prolongado de tiempo, lo que aumenta su eficacia (Farokhzad y Lager, 2006).

La capacidad de las nanopartículas para llegar a su objetivo como comentamos con anterioridad está influenciada por la carga superficial, hidrofobicidad, tamaño de partícula y modificación de la superficie. Las barreras, el tamaño y su distribución finalmente afectarán sus interacciones con la membrana celular junto a que condicionarán su capacidad de penetración y la liberación de la sustancia encapsulada,

que dependerá del tejido, la circulación y la idiosincrasia del sitio diana (Brannon-Peppas y Blanchette, 2012). Por todo ello es necesario un diseño cuidadoso de la encapsulación con respecto al objetivo y la vía de administración para maximizar la eficacia de la proteína. Debido a esto, se han desarrollado diversas técnicas de encapsulación presentándose la nanotecnología como una solución a estos problemas, pues siendo relativamente recientes ambas disciplinas, actualmente presentan un largo camino por recorrer en el cual las expectativas son ilusionantes y las posibilidades muy amplias (Ye y Chi, 2018).

Dados los argumentos presentados la presente Tesis Doctoral se enfocará en la elaboración de nanopartículas capaces de encapsular una proteína -neuroglobina- de la manera más eficiente posible. Además, estas nanopartículas deberían de poder ser administradas vía parenteral, como ocurre en la mayoría de medicamentos biológicos. Una vez en el torrente sanguíneo las nanopartículas cargadas con NGB deberán alcanzar su diana terapéutica en células neuronales y liberar allí el fármaco, para ello deben atravesar la BHE y ese será uno de los objetivos principales a desarrollar en este trabajo.

4.

PARTE EXPERIMENTAL:

MATERIALES Y

MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Neuroglobina

Hasta el año 2000, se pensaba que la hemoglobina y la mioglobina eran los únicos miembros de la familia de las globinas en los seres vertebrados. En dicho año se descubre un tercer tipo de globina, ubicada principalmente en el sistema nervioso, de lo que deriva su nombre. Las hipótesis sobre ella fueron varias, desde un destoxicador de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, a una cadena de transducción de señales del estado redox de la célula inhibiendo la apoptosis. Pero de lo que no hay duda, es de la función esencial que desempeña, protectora y conservadora para las neuronas (Forrellat y Henandez, 2011).

La producción mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP) es fundamental para la vida, ya que en el proceso de demanda de oxígeno se ve satisfecho gracias a la capacidad de las globinas de captarlo y suministrarlo a las células.

Las globinas están presentes en todos los reinos de organismos vivos y las más conocidas y estudiadas debido a su alta concentración son la hemoglobina que se encarga del transporte de oxígeno por la sangre y la mioglobina, que se encuentra en el músculo estriado y cardíaco y que funciona como reserva temporal de oxígeno facilitando su difusión (Burmester y Hankeln, 2014).

Aparte hay dos recientes miembros de esta familia, la histoglobina, presente en casi todos los tejidos, principalmente conectivo y retina y la neuroglobina (NGB). Ambas implicadas en neuroprotección (Schmidt y col., 2004). La figura 15 resume los diferentes tipos de globinas existentes.

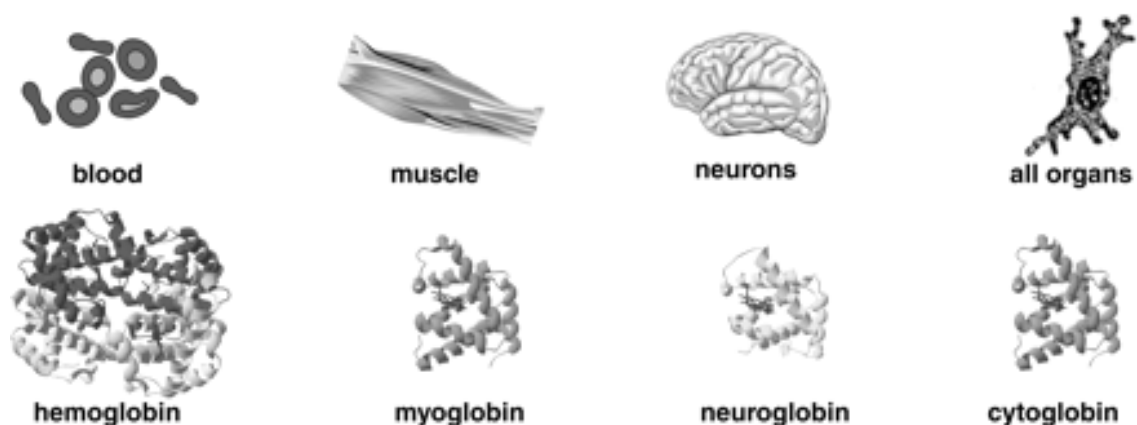


Figura 15. Distribución por tejidos de las globinas de vertebrados (Burmester y Hankeln, 2004).

La neuroglobina, es un monómero de 150 aminoácidos con una masa molecular de 17 kDa. Tiene la propiedad de poderse unir a varios ligandos gaseosos como oxígeno,

monóxido de carbono y óxido nítrico. Las diferencias respecto a la hemoglobina o mioglobina se observan principalmente en ausencia de ligando, pues estas proteínas son conocidas como globinas pentacoordinadas, ya que el hierro (Fe^{2+}) es unido por los 4 átomos de nitrógeno del anillo porfirina y la histidina proximal de la hélice F (HisF8). Sin embargo, en la NGB es una globina hexacoordinada, lo que quiere decir que en el estado desoxi, la histidina distal de la hélice E (HisE7) está unida a la sexta posición de coordinación del Fe^{2+} , por lo que cualquier ligando externo tiene que competir con la HisE7 para la unión del Fe^{2+} de lo que derivan sus particularidades y propiedades (Dewilde y col., 2001).

Aunque en el sistema nervioso central la NGB es expresada en todas o casi todas las neuronas, podemos encontrar diferencias cuantitativas entre las diferentes poblaciones neuronales. De esta manera, en el caso de ratones la concentración total de la proteína en el cerebro es más baja (menos de $1 \mu\text{mol/L}$) que el nivel en las neuronas de la retina, que requieren grandes cantidades de oxígeno, de 50 a 100 veces superior (Burmester y col., 2000). En el caso de la NGB humana, se encuentra en concentraciones altas en células altamente metabólicas o especializadas como las neuronas de hipotálamo y células de la retina, donde su concentración es aproximadamente de $100 \mu\text{M}$ (Schmidt y col., 2003). Además de esto simulaciones numéricas predicen que zonas de la retina como las regiones del segmento interno de los fotorreceptores y capa plexiforme interior, la NGB tiene el potencial de prevenir la hipoxia aumentando la absorción de oxígeno entre un 30-40% (Roberts y col., 2016). La NGB se produce en otras partes del sistema nervioso central, pero a concentraciones relativamente bajas ($\sim 1 \mu\text{M}$) (Bentmann y col., 2005).

La NGB tiene una importancia vital para la salud del cerebro que envejece, por su participación en la homeostasis del oxígeno celular y en la protección de las células del cerebro en casos de hipoxia o isquemia, después de un accidente cerebrovascular. Además, en casos de accidente cerebrovascular isquémico hay un aumento de la expresión de NGB en la corteza cerebral periinfarto, en comparación con el tejido cerebral adyacente normal y el sitio isquémico. La observación concluye que la expresión de NGB es inducida por la hipoxia y la isquemia (Haines y col., 2012).

El significado del aumento de la expresión de NGB en el infarto clínico no está completamente claro, pero en roedores, su sobreexpresión se asocia con la reducción del tamaño del infarto y con su resolución clínica. En concordancia, la NGB podría tener una función neuroprotectora similar en los humanos (Wang y col. 2008).

La función neuroprotectora no solo tiene un papel importante en casos como los de un ictus, sino que también se han asociado bajos niveles de neuroglobina en las neuronas del cerebro con mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer. Distintos estudios han asegurado que la neuroglobina protege a las células mediante el mantenimiento de la

función de las mitocondrias y la regulación de la concentración de las sustancias químicas importantes en la célula. En las mitocondrias celulares se llevan a cabo la mayor parte de los procesos que la célula utiliza para producir su energía. Las mitocondrias también juegan un papel importante en la comunicación dentro de y entre las células y los aspectos importantes de la diferenciación celular y el crecimiento. Una célula muere rápidamente cuando sus mitocondrias dejan de funcionar. Hay varios tipos de estrés, tales como la falta de oxígeno, los niveles bajos de nutrientes, aumento de los niveles de calcio o la presencia de sustancias tóxicas que pueden causar que las mitocondrias se rompan y emitan citocromo C. El citocromo C se une con otras moléculas fuera de las mitocondrias para formar una proteína llamada un apoptosoma y provocar la muerte celular. La NGB actuaría neutralizando esta molécula, previniendo en muchos casos la muerte celular por estrés oxidativo asociado a un funcionamiento normal, aumentando la expresión de la NGB. Células neuronales pueden sobrevivir al daño mitocondrial si los apoptosomas no se forman (Raychaudhuri y col., 2010).

En nuestro estudio nos centramos en el efecto de la NGB en el tratamiento del ictus isquémico, el cual constituye el 80-85% de los casos de accidentes cerebrovasculares frente al ictus hemorrágico, derrame o hemorragia cerebral que constituye el 15-20% de los casos.

Actualmente, el tratamiento para el ictus, se centra en el restablecimiento de la circulación en la zona afectada, no existiendo nada para su prevención y reparación de daños adicionales asociados a la exposición oxidativa y a la inflamación (Di Domenico y col., 2012).

La NGB va a constituir para nosotros el principio activo del medicamento a diseñar, debido a las propiedades que presenta en la situación de ictus. Por su propia idiosincrasia de proteína, es lábil y en el organismo al enfrentarse a circunstancias adversas para ella (pH, otras proteínas, temperatura...) se vería altamente comprometido su efecto. Además, presenta una dificultad más y es que es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Nuestro objetivo es solventar estos problemas que le impiden realizar el efecto positivo en el organismo cuando se produce un ictus y de conseguirla hacer llegar a su objetivo diana para ejercer su mecanismo de acción.

La NGB utilizada en este trabajo, es suministrada por el grupo de investigación del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén. Una vez obtenida, se mantiene a -80°C en un medio formado por:

- Tris - ClH, 20mM
- 0,1 M NaCl
- pH de 8 y con una concentración comprendida entre 1 a 3 mg/mL.

En este trabajo, las principales técnicas que se utilizarán para la valoración de la proteína serán: La espectrofotometría, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4.1.2. Lisozima

La lisozima o muramidasa (Nacetil muramidaglicano hidrolasa), fue descubierta en el año 1922 por Alexander Fleming, siendo la primera proteína de la que se dispuso de su secuencia por cristalografía de rayos-X y la primera enzima de la que se determinó su mecanismo enzimático gracias a David Phillis en 1966 (Jollés y Jollés, 1984).

Por estas razones, tiene un papel muy importante en los modelos enzimáticos y en aspectos de la biología moderna como la química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), inmunología o el plegamiento de proteínas (Chantal y col., 2007).

La lisozima está presente en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos además de ser producida en multitud de tejidos y fluidos, tales como huevos de aves, leche humana, lágrimas y saliva, siendo incluso secretada por leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba y Ogawa, 2005).

En los humanos, tiene un rol destacado en la defensa frente a las infecciones al destruir las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas, por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular. El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis.

La lisozima es casi inactiva frente a microorganismos Gram-negativos por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa. También es importante destacar que en las bacterias Gram positivas el peptidoglicano representa alrededor del 90% de la pared celular, mientras que en las Gram negativas apenas llega al 10% (Carrillo, 2013). En las lágrimas se encuentra en cantidades comprendidas entre 3.000 y 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protegiendo frente a bacterias y virus (Lesnierowski y col., 2004). Sobre la lisozima de huevo se han descrito otras actividades como la actividad antioxidante (Liu y col., 2006), actividad antiheparínica (Mega y Hase, 1994), actividad antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim y col., 2001). También se ha descrito el papel que la lisozima humana ejerce como inmunomodulante, de ahí su importancia en el mecanismo de defensa natural (Koslov y col., 2000; Cho y col., 2005).

En el plano internacional, organismos como la FAO/OMS y muchos países como Alemania, Austria, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Italia, Japón y Reino Unido tienen reconocida a la lisozima de clara de huevo como una proteína no

tóxica y por ello es utilizada para fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos, estimándose que más de 100 toneladas de lisozima son usados anualmente para estos propósitos (Mine y col, 2004). La FDA considera a la lisozima como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) para el uso en la industria quesera, y reconocida como aditivo de uso alimentario con el código E-1105.

Estructuralmente la lisozima de clara de huevo se clasifica en seis tipos: lisozima de gallina (tipo-C) entre ellas se encuentran lisozima de estómago y lisozima de unión a calcio, lisozima de ganso (tipo-G), lisozima de plantas, lisozima bacteriana, lisozima del fago T4 y lisozima de invertebrados (tipo-I). Cuatro de estas lisozimas: tipo-C, tipo-I, tipo-G y lisozima T4 tienen la estructura tridimensional muy parecida (Thammasirirak y col., 2010).

Entre todas, la lisozima de huevo de gallina ha sido la más estudiada, por encontrarse en una concentración alta (1-3 g/L de clara de huevo), su fácil manejo y la posibilidad de purificación por cristalización en NaCl al 5% a pH 9,5.

La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,4% de las proteínas de la clara de huevo. Su masa molecular es 14.307 Da y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. Es una proteína muy catiónica, con un elevado punto isoeléctrico ($pI = 10,7$), con 19 aminoácidos en su secuencia cargados positivamente. Se ha observado que la lisozima sufre autoasociación en función del pH de la disolución, así a pH inferiores a 4 sólo existe la forma monomérica, en el rango de pH comprendido entre 4 y 6,5 hay una aparición de especies asociadas que coexisten con los monómeros y a partir de pH 6,5 la proporción entre monómeros y especies asociadas no varía siendo una proteína estable en soluciones ácidas (Lesnierowski y col., 2004).

La estructura de la lisozima se compone de dos dominios o lóbulos, el dominio α con los residuos (1-40 y 90-129) y el β dominio con los residuos (41-89), unidos por una larga α -hélice donde se encuentra el sitio activo. Posee cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las ocho cisteínas presentes en la molécula (You y col., 2010).

Se han desarrollado muchos métodos de aislamiento para la lisozima de clara de huevo de gallina desde cromatografía de intercambio catiónico o ultrafiltración hasta llegar a métodos como cromatografía de intercambio iónico con columnas y membranas microporosas (Chiu y col., 2007; Jiang y col., 2001). La característica más llamativa de la molécula de la lisozima es una hendidura prominente, el sitio de fijación del sustrato, que atraviesa una cara de la molécula.

El sitio catalítico de la lisozima se encuentra dividido en seis zonas: A, B, C, D, E y F que a su vez se unen a seis azúcares. En el sitio catalítico se encuentran dos aminoácidos que son los necesarios para que ocurra la catálisis que son (Glu 35 y Asp 52) siendo invariables en la familia de la lisozima (Carrillo, 2013).

4.1.3. Polímeros (Hialuronato Sódico y Chitosán) y Glicerol Tripalmitina

Para este trabajo se han seleccionado polímeros biodegradables para la elaboración de las nanopartículas, debido a su escasa o nula toxicidad, a su estabilidad, a su reproducibilidad, y a la facilidad con la que se puede actuar en su superficie para conseguir las propiedades deseadas, referidas fundamentalmente al control deseado para conseguir que lleguen al lugar de acción.

Las nanopartículas se pueden diseñar para controlar tanto la velocidad de liberación de los fármacos, así como para controlar su localización en algún lugar específico del organismo. La modulación de sus características se logra a través de las características del polímero y de la composición química de la superficie de las mismas.

Los objetivos perseguidos se consiguen en gran medida mediante el uso de polímeros. De esta manera se pueden realizar modificaciones tanto en la carga como en la solubilidad. También modificaciones basadas en la unión a distintos radicales, a anticuerpos que pueden permitir conseguir un nanotransportador “inteligente”, que conoce, o le hemos facilitado que conozca, el lugar a donde debe ir y ejercer su efecto.

HIALURONATO SÓDICO. Fagron (Barcelona - España).

Es este polímero el que se ha seleccionado como fundamental para la preparación de las nanopartículas, debido a sus excelentes propiedades, como se constatará a continuación.

En 1934 Karl Meyer y John Palmer aislaron por primera vez el ácido hialurónico (AH) del humor vítreo de los ojos de las vacas. En un principio creyeron que era un componente universal del espacio extracelular, pues sus múltiples propiedades le permiten constituir una matriz y dar soporte al funcionamiento de las células y tejidos. Además, declararon que esta sustancia contenía dos restos de azúcar, uno de los cuales era el ácido urónico.

Endre Balazs, lo usó como supletorio de la clara de huevo en el área de la pastelería y llevó a cabo la mayor parte de los descubrimientos del AH durante los últimos 50 años, en años sucesivos fue ampliándose su uso, siendo hoy en día uno de los polímeros que mayores prestaciones tiene, en diferentes campos, destacando fundamentalmente sus aplicaciones en el área de la medicina (Oksala y col., 1995).

En este trabajo, el polímero utilizado para la elaboración de las nanopartículas (Nps) es el hialuronato sódico, sal del ácido hialurónico (AH), un heteropolisacárido (glucosaminoglucano lineal) de elevado peso molecular constituido por unidades de ácido D-glucurónico unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ o-glucosídicos y por residuos 2-

acetamido-2deoxi- β -D-glucosa enlazadas de acuerdo a un patrón β (1 \rightarrow 3) (Fraser y col., 1997). Dentro del grupo de los glucosaminoglucanos, el único no sulfatado es el AH, al no formar enlaces covalentes con otras moléculas de la matriz extracelular. Es sintetizado extracelularmente por enzimas localizadas en la superficie celular denominadas ácido hialurónico-sintetasas (HAS), de las cuales existen tres isoenzimas: HAS1, HAS2 y HAS3 (Junqueira y Carneiro, 2015; Alberts y col., 2011).

Químicamente, las unidades de azúcares que lo componen son hidrofílicas y su propiedad física más importante es la capacidad de almacenar agua, aumentando más de 50 veces su peso, lo que les proporciona un alto grado de elasticidad que favorece el intercambio de gases y de moléculas pequeñas y actúa de barrera al paso de macromoléculas y cuerpos extraños. Estas propiedades se consiguen gracias al número de grupos OH⁻ y las cargas negativas que posee. Por tanto, es altamente hidrosoluble (Cortivo y col., 1986; Necas y col., 2008).

En el organismo debido a la hidratación la matriz extracelular se comporta como un gel, lo que permite a los tejidos en los que se encuentra, resistir fuertes presiones mecánicas a la vez que favorece una alta tasa de difusión de sustancias entre las células, siendo fundamental estas propiedades en el desarrollo o lugares con alta proliferación celular (Junqueira y Carneiro, 2015). Se suele asociar el ácido hialurónico con las moléculas de colágeno o a proteoglucanos, confiriendo a la matriz extracelular elasticidad, resistencia y lubricación.

Su papel fisiológico es el de mantener la estructura orgánica y tisular a través de la adhesión célula-célula y célula-matriz, constituyendo un puente de unión para las proteínas centrales (hialurocadherinas), como es la proteína de unión al cartílago, el agrecano y el versicano. El ácido hialurónico sirve de eje o estructura para los grandes complejos proteoglucanos y se adhiere a los receptores de la superficie que regulan la proliferación y migración celular, como el CD44. El CD44 es un receptor del AH que actúa como molécula de adhesión y se expresa en leucocitos, células epiteliales, fibroblastos y células musculares (Sanguineti y Rodríguez-Tafur, 1999). Isoformas del receptor CD44 están implicadas en la unión inicial de los leucocitos a las células endoteliales activadas por procesos inflamatorios. Se ha comprobado que la unión del AH con el receptor CD44 media la adhesión inicial de las células inflamatorias al vaso que permite la extravasación en el lugar de la inflamación y constitución de una ruta de recaptación para degradación lisosomal (Cortivo y col., 1986).

Otros proteoglicanos que se unen al HS son del tipo TSG6 (del inglés tumor necrosis factor-stimulated gene 6), como CTRL1 (proteínas de unión a los tejidos cartilaginosos) y otras que funcionan como moléculas de adhesión celular cuya activación induce la quimiotaxis. Entre las enzimas que degradan específicamente el HS se encuentran las hialuronidasas o hialuronoglucosaminidasas (HYAL), conservadas filogenéticamente

desde las bacterias (Necas y col., 2008; Gregory y col., 2005). Farmacocinéticamente cabe tener en cuenta la vida media del HS, de dos a tres días (Schiraldi y col., 2010).

Biológicamente, el HS cumple un papel fundamental en la génesis, mantenimiento y resolución del proceso inflamatorio (Badylak, 2005; Toole, 2001) al disminuir el tipo de prostaglandinas y mejorar la disposición del colágeno, favoreciendo la diferenciación celular y repercutiendo en una mejor cicatrización y reparación de los tejidos (Weckx y col., 2009; Engström y col., 2001). Además, es estabilizador de la matriz extracelular, por medio de un complejo proteico denominado interalfa-inhibidor (Fries y Kaczmarczyk, 2003). Si no existieran concentraciones adecuadas de HS, la cicatrización sería anormal con retracción y estenosis (Pimentel y col., 2007).

Entre las actividades específicas que realiza el HS se encuentran la migración de fibroblastos y la fibrogénesis, la regulación del nivel de proliferación y grosor de la epidermis, así como la proliferación de queratinocitos (Gregory y col., 2005; Wang y col., 2004). También incrementa la formación de hueso estimulando los osteoblastos 'in vitro', a través del aumento de la migración de células mesenquimales y su diferenciación (Turley y col., 2002). Es componente del líquido sinovial, del humor vítreo y es esencial en los procesos de fertilización, pues los distintos fluidos del tracto genital femenino son ricos en él (Fries y Kaczmarczyk, 2003).

En definitiva, HS es un polímero de origen endógeno (matriz extracelular y tejido conectivo de vertebrados), lo que lo convierte en un polímero altamente biocompatible para su uso farmacológico (Al-Qadi y col., 2011).

La unión de los distintos monómeros para obtener el polímero, HS, da lugar a que se puedan conseguir HS de diferentes pesos moleculares, dependiendo del número de monómeros que se unan. La variación de estos pesos afecta de manera directa a la formación de estructuras y, por lo tanto, los resultados son diferentes a la hora de obtener las nanopartículas, además del papel muy importante de su tamaño en las posibles interacciones de las nanopartículas con el sistema inmunológico (Zolni y col., 2010). En este trabajo de investigación se ha utilizado un HS de un peso de 1.0 - 1.5 MDa.

CHITOSÁN. Sigma Aldrich (Madrid - España).

Descubierto en 1859, el Chitosano o quitosano, (del griego χιτών "coraza" debido a su origen en el exoesqueleto de crustáceos e insectos), es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada)(Hsu y col., 2013).

Este polímero muestra una alta biocompatibilidad, presentando buenas propiedades antimicrobianas. Así, se demostró que las soluciones que contienen chitosán inhiben el crecimiento de *E. coli* y matan a *S. aureus* (Felt y col., 2000). Además, el chitosán a

concentraciones del 0,5% cuando se agrega a las formulaciones mejora significativamente el tiempo de retención en la superficie precorneal y retrasa significativamente la eliminación de estas formulaciones del área precorneal (Felt y col., 1999).

El chitosán también se describe como un potenciador de la administración de fármacos transmucosos. Varios estudios con la línea celular Caco-2 intestinal (Dodane y col., 1999) o co-cultivos de células intestinales y epiteliales (HT-29 / B6) (Smith y col., 2004) indicaron que el chitosán aumenta la permeabilidad celular al afectar las vías paracelulares e intracelulares de las células epiteliales, de manera reversible. Estos resultados sugieren que la apertura de la barrera de la unión estrecha es causada por la unión del chitosán cargado positivamente a la membrana celular, activando así el intercambiador de cloruro-bicarbonato que aumenta la permeabilidad para moléculas de hasta 10 kDa (Rosenthal y col., 2012).

La captación 'in vitro' y la biocompatibilidad del chitosán se han estudiado en células A546, una línea celular de carcinoma de pulmón humano, y se encontró que era independiente de su peso molecular (10kDa – 213kDa) sin un impacto significativo en la viabilidad celular por debajo de una concentración de 0,741 mg/mL (Huang y col., 2004). Las células HEK 293 mostraron captación de chitosán en medios acidificados y ausencia de suero. Esta capacidad de penetrar en las células hace que el chitosán sea un buen candidato como potenciador de la captación de fármacos (Schuerer y col., 2018).

GLICEROL TRIPALMITINA. Sigma Aldrich (Madrid - España).

Los triacilgliceroles (TAG) son los principales componentes de las grasas y aceites. Están formados por tres ácidos grasos unidos a un triéster de glicerol, cuyos tres hidroxilos (OH⁻) se unen a los radicales carboxílicos (-COOH) de los ácidos grasos con la liberación de tres moléculas de agua (Da Silva y col., 2016).

Los triacilgliceroles junto a los ácidos grasos y los alcoholes grasos, juegan un papel importante en las aplicaciones industriales para producir recubrimientos, plásticos, productos de limpieza y pinturas. Los compuestos de alcoholes grasos se utilizan para producir cosméticos y algunos productos farmacéuticos, así como en industrias alimentarias como agentes tensioactivos y co-tensioactivos, agentes gelificantes y recubrimientos. Los TAG se utilizan en todas las aplicaciones citadas anteriormente, además de representar los principales componentes utilizados en la industria alimentaria empleados para producir crema, margarina y grasas de confitería (Maximo y col., 2014).

Glicerol tripalmitina es el glicerol esterificado con 3 ácidos grasos de ácido palmítico. Es lípido fisiológico, y se usará para la obtención de la matriz lipídica o núcleo y también de recubrimiento para las nanopartículas.

4.1.4. Otros materiales utilizados

Además de los ya comentados y descritos como fundamentales en nuestro trabajo, se utilizaron otros materiales que se citan a continuación:

ACEITE DE PEPITA DE UVA: Sigma Aldrich (Madrid - España).

TWEEN 80: Emulgente. Guinama (Valencia - España).

CLORURO CÁLCICO: Sigma Aldrich (Madrid - España).

ÁCIDO ACÉTICO: Sigma Aldrich (Madrid - España).

DICLOROMETANO: Disolvente halogenado. VWR (Barcelona - España).

OCTADECILAMINA: Sigma Aldrich (Madrid - España).

TALON™ metal affinity column: Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Francia).

FREUND'S ADJUVANT: Guinama (Valencia - España)

FORMALIN, DNASE I, NORMAL GOAT SERUM, DAPI, TRITON X-100 AND LB MEDIUM: Sigma: Aldrich (Madrid - España).

AMPICILLIN: VWR (Barcelona - España).

KETAMINE (Imalgene 100 mg/mL): Merial Laboratorios S.A. (Sant Cugat del Vallès - España),

XYLACINE (Rompun®): Bayer (Sant Joan Despí - España).

URANYL ACETATE: Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

SEVOFLURANE: Abbot Laboratories (Madrid - España).

O.C.T MEDIUM: Sakura (Alphen aan den Rijn- Países Bajos).

CY2-LINKED GOAT ANTI-RABBIT IGG: Pierce (Rockford, IL, USA).

IPTG: Canvax Biotech (Córdoba - España).

AGUA BIDESTILADA fue preparada con el sistema Millipore (Billerica, MA, USA).

4.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

Las distintas técnicas utilizadas en esta Tesis Doctoral tanto para la valoración de principios activos, como caracterización de las nanopartículas, se describen a continuación.

4.2.1. Síntesis de Nanopartículas

Partiendo de la experiencia de nuestro grupo de investigación se han seleccionado dos técnicas de preparación de Nps, en las cuales se profundizará, optimizándolas para cumplir el objetivo deseado. Las dos técnicas utilizadas son la gelificación iónica y la emulsión-evaporación del disolvente. Seguidamente se exponen los fundamentos de ambas, así como los métodos de preparación.

4.2.1.1. Técnica gelificación iónica

El proceso se inicia mediante un intercambio iónico que provoca la transición de un estado sol a gel del polímero utilizado como material de recubrimiento. Con esta intención, las cadenas de HS con tensioactivo son expuestas a cationes divalentes. En nuestro caso, seleccionamos el calcio procedente del CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible y bajo coste. De esta manera, el Ca^{+2} (catión divalente) solubilizado en agua sustituye al Na^+ proveniente de la sal (HS), desplazándolo de las cadenas de hialuronato estableciendo enlaces cruzados entre grupos hidroxilo y carboxilo de las distintas cadenas implicadas y dando lugar a una red intermolecular estilo matricial, enlazando las cadenas (Lupo y col., 2012). Esta gelificación es considerada de tipo externo, pues la formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio. Obviamente la concentración de calcio y la composición del polímero son factores a tener en cuenta en el control de la transición sol-gel y la correcta formación de Nps.

De acuerdo con este método de síntesis, hemos realizado dos variantes. En la primera, el proceso se produce en medio acuoso y en presencia de un tensioactivo (método 1), quiere decir que el agua actúa como medio predominante en la reacción de los componentes. En la segunda (método 2), provocamos la gelificación en el seno de una emulsión, mediante una agitación forzamos una emulsión del agua con el aceite y en este medio tiene lugar el proceso de gelificación. En dicho caso se produce en el seno de una emulsión O/A. Señalar que durante su preparación se ensayaron distintos tipos de aceites (oliva y soja), pero que ninguno alcanzó una emulsión estable, que sí fue conseguida con el aceite de pepita de uva, probablemente debido al HLB (balance hidrófilo-lipofílico) y al porcentaje de tensioactivo utilizado, del cual ya se tiene

experiencia por trabajos previos en nuestro grupo de investigación y que además presenta interesantes propiedades (Ng y col., 2016).

4.2.1.2. Técnica de emulsión- evaporación del disolvente

Este método es muy utilizado para la síntesis de nanopartículas desde la descripción y aplicación del mismo, en el año 1992 por Sjostrom y col., (1993). En nuestro caso (método 3), el lípido o los lípidos como el resto de componentes lipofílicos se solubilizan en un disolvente orgánico apolar, como puede ser el diclorometano o el ciclohexano. Por otro lado, se preparan los componentes hidrófilos en la fase acuosa. Ambas fases se mezclan y emulsionan junto al tensioactivo mediante agitación mecánica o ultrasonidos y tras la posterior evaporación del solvente, se obtiene la dispersión de nanopartículas por precipitación del lípido en el medio acuoso. La incorporación de principios activos liposolubles se realiza mediante su solubilización en el disolvente orgánico apolar. Sin embargo, puede ser utilizada para la encapsulación de fármacos hidrofílicos como pueden ser los antígenos o péptidos aumentando la eficiencia de su encapsulación a través de la técnica de doble emulsión A/O/A.

La relación entre la cantidad de lípido y disolvente es un parámetro fundamental para el tamaño de estas Nps, ya que si se aumenta la cantidad de lípido la viscosidad de la fase dispersa se ve incrementada repercutiendo en mayores tamaños de partículas. También el emulsionante elegido tiene un papel importante en el aumento del tamaño de partícula.

Seguidamente se detallan los tres métodos utilizados, su composición y la preparación de las Nps.

Los dos primeros métodos utilizan el Hialuronato de Sodio (HS) como polímero principal en la síntesis (gelificación iónica externa).

En el tercer método, se elaboran Sistemas Lipídicos Nanoparticulares (SLN), utilizando una sonda de ultrasonidos y una homogenización a alta velocidad de agitación para la formación de la emulsión.

4.2.1.3. Métodos de síntesis

Método 1

Composición

COMPUESTO	MÉTODO 1
Hialuronato de Sodio (HS)	0,02 %
Tween® 80	0,5 %
Cloruro Cálculo (CaCl ₂)	0,25 %
Agua	100 mL

Tabla 5. Composición Nps método 1

Preparación

La técnica de preparación consiste en dispersar en 100 mL de agua 0,02 % (m/v) de HS y 0,5% (m/v) de Tween® 80 y agitar a una velocidad de 1200 rpm hasta lograr una dispersión homogénea (10 minutos). Posteriormente, se adiciona cloruro cálcico 0,25% (m/v) a una velocidad de 1600 rpm durante otros 10 minutos. Seguidamente, se disminuye la velocidad a 1200 rpm y se mantiene en estas condiciones 2 horas.

Método 2

Composición

COMPUESTO	MÉTODO 2
Hialuronato de Sodio (HS)	0,055 %
Tween® 80	0,55 %
Cloruro Cálculo (CaCl ₂)	3,45 %
Aceite de pepita de uva	100 mL
Agua	45 mL

Tabla 6. Composición Nps método 2.

Preparación

En el segundo método, se lleva a cabo una gelificación iónica externa en el seno de una emulsión O/A. En la fase oleosa utilizada se han ensayado distintos tipos de aceites como oliva y soja, pero el que mejores resultados nos proporcionó como ya se explicó en el apartado 4.2.1.1. fue el aceite de pepita de uva. Por lo que es este aceite el seleccionado para la preparación de las Nps.

En primer lugar, se prepara la fase acuosa, para ello, se dispersan en 40 mL de agua, 0,08g de HS y 0,8g de Tween 80 utilizando agitación magnética y aplicando calor, a una temperatura de 40°C para facilitar la dispersión. Aparte, se prepara la fase oleosa

calentando a 40°C 100 mL de aceite de pepita de uva y se procede a adicionar la fase acuosa sobre la oleosa, con una velocidad de agitación de 1200 rpm durante 10 min. A continuación, se procede a la incorporación progresiva de 0,25g de CaCl₂ disueltos en 5 mL de agua, a una velocidad de 1600 rpm durante unos 10 minutos mantenemos la velocidad de agitación para posteriormente disminuir a 1200 rpm y mantener esas condiciones durante 2 horas.

RECUBRIMIENTOS

Una vez elaboradas las Nps por ambos métodos y con la finalidad de mejorar sus propiedades a la hora de conseguir nuestro objetivo en su paso a través de la barrera hematoencefálica, las Nps tanto las obtenidas por el método 1, como por el 2, son sometidas a los mismos recubrimientos. En primer lugar, ambas son recubiertas con chitosán, para lo que se utiliza una solución acuosa de ácido acético glacial (99:1) al 1% de chitosán. Esta solución se mezcla a partes iguales con la dispersión de Nps y se somete a agitación magnética durante 2 horas.

Una vez se ha realizado el recubrimiento con chitosán, se procede a eliminar el sobrante del recubrimiento y limpiar la dispersión de Nps. Para ello se someten a centrifugación las muestras a una velocidad de 11000 rpm. durante 50 minutos. Después de este proceso las Nps precipitan y el sobrenadante es fácilmente eliminable, sustituyéndolo por agua bidestilada y concentrando la solución.

Una vez lavadas las Nps se someten a un recubrimiento lipídico con glicerol tripalmitina, un triglicérido biocompatible y presente en la grasa del cuerpo humano. 7,5mg de glicerol tripalmitina se disuelven en 1 mL de diclorometano y se adiciona a 10 mL de la dispersión coloidal de Nps previamente recubiertas de chitosán y se mantiene en agitación magnética, aproximadamente 2 horas, hasta la completa evaporación del disolvente halogenado.

Método 3

Composición

COMPUESTO	MÉTODO 3
Tween® 80	0,1 %
Chitosán	0,025 %
Glicerol Tripalmitina	0,167 %
Octadecilamina (SA)	0,067 %
Diclorometano	1 mL
Agua	15 mL

Tabla 7. Composición Nps método 3.

Preparación

Se preparan por separado las dos fases:

La fase acuosa está constituida por 7,5mL de solución acuosa de Tween® 80 al 0,2%, y 7,5mL de solución de Chitosán 0,05%.

Para la fase oleosa se toman 0,025g tripalmitina y 0,01g octadecilamina que se diluyen en 1mL de diclorometano (DCLM).

Ambas fases se homogenizan utilizando una sonda de ultrasonidos Branson Sonifier 450 en Duty cycle 20-30 y Out control 3 durante 6 minutos. Posteriormente, se agita en un homogeneizador Silent Crusher M a 5,5 (x 1000) rpm durante 10 minutos.

De acuerdo con los tres métodos propuestos, las Nps obtenidas seguirán la siguiente denominación a lo largo de la presente Tesis Doctoral:

- 1: Nanopartículas de HS obtenidas según el método 1.
- 2: Nanopartículas de HS obtenidas según el método 2.
- 1A: Nanopartículas de HS (1) con recubrimiento de chitosán.
- 2A: Nanopartículas de HS (2) con recubrimiento de chitosán.
- 1B: Nanopartículas de HS (1A) con recubrimiento lipídico.
- 2B: Nanopartículas de HS (2A) con recubrimiento lipídico.
- 3: Nanopartículas sólidas lipídicas obtenidas según el método 3.

4.2.2. Espectrofotometría

Se utilizó un espectrofotómetro PerkinElmer® Lambda 25. El equipo siempre fue calibrado con agua bidestilada como blanco en todas las medidas realizadas.

Se utilizaron cubetas de High Precision Cell hechas de Quartz SUPRASIL® de 10mm de la marca Hellma® Analytics.

4.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En este caso, se utilizó el aparato Acquity UPLC System (Waters Technologies Corporation) equipado con inyector automático, controlador de temperatura de columna, DAD, bomba cuaternaria y desgasificador en línea. Se usó un Waters UPLC™ termostatzado a 25°C, para las separaciones cromatográficas. Se utilizó una columna Waters UPPLC™ Protein BEH C4 2.1x50 mm, 1.7 µm. La fase móvil fue agua (A) y acetonitrilo (B). El programa de elución en gradiente fue: 5% B, T5: 95% B, T6: 100% B, T6.1: 5% B. El caudal fue de 0,2 mL/min y la longitud de onda de detección fue de 290 nm. El volumen de inyección fue de 10 µL y cada ejecución fue seguida por un período de equilibrio de 1.9 min. El tiempo total de ejecución fue de 8 min.

4.2.4. Carga eléctrica superficial y tamaño

La distribución del tamaño y la carga eléctrica superficial de las Nps se determinaron mediante un dispositivo Malvern Zetasizer Nano ZS®; (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido), a 25°C ±0,5°C.

El tamaño, medido en nanómetros (nm), fue obtenido mediante la medida de la dispersión dinámica de la luz con retrodispersión no invasiva óptica (NIBS), después de dispersarlos en agua. Para la carga eléctrica superficial, expresada en milivoltios (mV), los valores son obtenidos utilizando dispersión de luz electroforética y un analizador de peso molecular con dispersión de luz estática.

En ambos casos, se utilizó el software Malvern Instruments; Este software se adapta automáticamente a la atenuación de la dispersión. Tres medidas de cada muestra fueron realizadas. Estas tres medidas son el promedio entre 10 y 15 repeticiones dependiendo de la muestra.

4.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

Las dispersiones de Nps se diluyeron para su correcta visualización en microscopía. La dilución fue diferente para cada muestra y fue considerada correcta cuando la turbidez alcanzó un tono leve.

Los dispositivos utilizados para este estudio han sido el microscopio electrónico de transmisión (TEM): CARL. ZEISS LEO 906E y microscopio electrónico de barrido (SEM): GEMINI (FESEM) CARL ZEISS. Las medidas, se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada (España).

Para TEM, la muestra se preparó mediante tinción negativa. La dispersión se incubó en una rejilla con película de soporte de carbono durante 5 minutos dentro de una placa Petri y se contrastó con acetato de uranilo al 1% en solución acuosa.

Para SEM, se depositó una gota de la dispersión coloidal de Nps en un soporte correspondiente para FESEM permitiendo que se seque a temperatura ambiente. Posteriormente, se metalizaron con Carbon Coater (Polaron CC7650).

4.2.6. Citotoxicidad

El estudio de citotoxicidad es llevado a cabo con células de riñón de embrión humano (HEK 293). Referencia N°: ECACC N°: 85120602 (lote CB2737). Suministrado por el banco de células del CIC de la Universidad de Granada.

El medio de cultivo utilizado fue EMEM (EBSS) + 2 mM GLUTAMINA + 1% de aminoácidos no esenciales + 1mM Piruvato sódico + 10% Suero bovino fetal.

El procedimiento de subcultivo seguido fue: se dividen los cultivos subconfluentes en 1:3 a 1:6 sembrando de 2-4x10000 células/mL empleando tripsina al 0,25% o

tripsina/EDTA. Se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Durante los subcultivos rutinarios las células deben siempre subcultivarse antes de alcanzar la confluencia. Estas células se despegan a temperatura ambiente. Pueden tardar hasta 7 días en adherirse. Cuando se descongelan, deben sembrarse en altas concentraciones.

Las muestras son centrifugadas para eliminar todo el sobrenadante y ser diluidas en 0,1 mL de medio de cultivo. A continuación, se le agrega MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) con la finalidad de medir la viabilidad de las células mediante espectrofotometría.

Este estudio se realizó para tres concentraciones diferentes. La de partida que es la concentración de síntesis, 1/5 y 1/10 de la misma. Los tiempos elegidos de incubación son de 4, 24 y 48 horas. Para que el tiempo de medida no afecte a la incubación realizamos 3 placas, cada una de ellas, será medida en su correspondiente tiempo.

Al no poder proceder a un proceso de fabricación estéril de las nanopartículas, adicionamos antibiótico al medio de cultivo para evitar proliferación de microorganismos que alteren el estudio.

El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos (ThermoFischer Scientific-Nunclon 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol Catalog No.: 269620/269787/439454/442404/475094) con una concentración de 10.000 células por pocillo. 24 horas después se le adicionan los productos. Finalmente, en cada pocillo se realizan 9 medidas, en 9 zonas distintas.

Mediante un lector de microplacas se mide la absorbancia que se produce en cada muestra y en función de los datos de absorbancia se determina la toxicidad celular de las nanopartículas. El sistema utilizado para la medida fue Infinitemanoqua®.

En el estudio se utilizan un total de 3 placas. Cada una de las placas corresponde con un tiempo de medida (4, 24 y 48 horas). Las absorbancias obtenidas son relacionadas mediante el cociente de la obtenida en la muestra entre las absorbancias medias de los controles, expresando los datos en % de viabilidad.

4.2.7. Liofilización de las muestras

El proceso de liofilización fue llevado a cabo en un liofilizador Telstar Cryodos 50. La NGB fue introducida congelada a -80°C. Los viales fueron sometidos a vacío (por debajo de los 500 mbar) durante 24 horas.

4.2.8. Determinación eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de la encapsulación de las Nps, la dispersión se centrifugó a 10000 rpm (Eppendorf AG 5804; Hamburgo, Alemania) durante 20 minutos hasta que se obtuvo un precipitado sólido. El contenido de proteína en el sobrenadante se analizó por HPLC en las condiciones descritas anteriormente, y la encapsulación se determinó usando la siguiente fórmula:

Porcentaje encapsulado = (contenido real del fármaco / contenido teórico del fármaco) x 100.

4.2.9. Estudio de liberación de fármacos 'in vitro'

El estudio de liberación de NGB "in vitro" se realizó utilizando una membrana de diálisis (corte de peso molecular de 50 kDa Spectra/Por® 6) sumergida en 25 mL de tampón fosfato pH 7,4 como medio de liberación. Se colocaron 1,6 mL de la dispersión de Nps en la membrana de diálisis y ambos extremos se sellaron con cierres magnéticos (Spectra / Por Clousures®; Sigma, Madrid, España). El ensayo se llevó a cabo a 37±0,5°C y bajo una agitación de 100 rpm durante 72 horas. A intervalos de tiempo regulares, se retiraron 0,8 mL de muestra y se reemplazaron con tampón fosfato pH 7,4. El contenido de proteína en las muestras se analizó por HPLC en las condiciones descritas anteriormente.

4.2.10. Cinética de liberación de fármacos 'in vitro'

Se probaron diferentes modelos matemáticos para elegir el que pudiera explicar mejor la cinética de liberación. Los datos obtenidos del análisis de liberación 'in vitro' del fármaco se ajustaron a los criterios de orden cero, orden uno, Higuchi y de Hixon-Crowell utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) junto con el valor de R² obtenido tras el correspondiente ajuste lineal a cada uno de los modelos anteriormente citados para determinar el que mejor se ajuste a los datos obtenidos. El AIC es uno de los métodos más utilizados para la determinación del modelo que mejor explica el proceso de difusión (Doménech y col., 2013); por lo tanto, AIC permite encontrar la función que se ajusta con mayor precisión al proceso de liberación del fármaco. El criterio identifica el modelo que mejor se ajusta a los datos como el que tiene el valor mínimo de AIC, y se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p$$

n: número de pares de valores experimentales

Ln: logaritmo neperiano

SSQ: suma de cuadrados residuales

p: número de parámetros de la función de ajuste

4.2.11. Expresión y purificación de NGB recombinante

El vector de expresión pET15b/NGB fue construido por Genscript Biotech Corp. La secuencia de referencia NCBI NM_033359.3 que codifica la neuroglobina de rata se

insertó entre los sitios Nde I y BamH I del plásmido pET15b. La *E. coli* BL21 (DE3) transformada con la construcción pET15b/NGB se inoculó en medio LB que contenía 0,1 mg de ampicilina/mL y se cultivó a 37°C hasta $A_{600} = 0,8$. Luego, la expresión de la proteína recombinante fue inducida por la adición de 0,5 mM de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG), y el crecimiento continuó a 37°C durante 4 horas. Las células se recogieron por centrifugación y se suspendieron en Tris-HCl 20 mM, pH 8; NaCl 0,1 M (tampón Tris) que contiene 0,5 mg de lisozima/mL y 1 μ g de DNasa I/mL. Luego, las células se lisaron por sonicación y el homogeneizado se aclaró por centrifugación a 10000 x g durante 30 minutos. El extracto libre de células se filtró y se cargó en una columna de afinidad metálica TALON™ equilibrada con tampón Tris. La columna se lavó con este mismo tampón que contenía imidazol 5 mM y la proteína NGB etiquetada con His recombinante se eluyó con imidazol 100 mM. Para separar la etiqueta His de la proteína NGB, se añadió 1 unidad de trombina/mL a la proteína recombinante purificada, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se dializó contra el tampón Tris. Finalmente, la muestra se pasó a través de la columna TALON™ Metal Affinity equilibrada con tampón Tris, y se recogió el flujo que contenía la proteína NGB. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el coeficiente de extinción molar a 280 nm para NGB ($22500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.12. Preparación de antisuero contra NGB

El antisuero policlonal NGB se produjo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (SAEX) utilizando conejos de Nueva Zelanda. Para la producción de anticuerpos, los conejos fueron inyectados semanalmente por vía subcutánea en múltiples sitios con NGB recombinante. Se mezclaron 250 μ g de proteína con adyuvante completo de Freund para la inmunización primaria y 125 μ g en adyuvante incompleto de Freund para las inmunizaciones posteriores. Se extrajo sangre de los animales inmunizados y se centrifugó a 20000 x g durante 30 min. El sobrenadante se calentó a 56°C para inactivar las proteínas del complemento y el suero resultante se usó como sonda policlonal para inmunoensayos. El suero extraído antes de la inmunización también se obtuvo como control negativo.

4.2.13. Experimentos en animales

Los procedimientos experimentales para evaluar la penetración cerebral in vivo de las diferentes Nps elaboradas se han llevado a cabo en ratas Wistar macho adultas (Charles River). Todos los procedimientos se han llevado a cabo en el Centro para la Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Jaén (CPEA) y han sido aprobados previamente por el Comité local de cuidado animal y se han realizado de conformidad con la legislación española y de acuerdo con la Directiva de la UE 2010/63/UE (2010). Los animales se distribuyeron en dos grupos experimentales: animales sometidos a un modelo de accidente cerebrovascular por oclusión transitoria de la arteria cerebral

media (grupo tMCAO), y animales que se sometieron a los mismos procedimientos quirúrgicos sin oclusión de filamentos de la arteria (grupo control). Este diseño experimental se realizó con el fin de identificar posibles diferencias en la capacidad de las Nps para alcanzar el parénquima cerebral, tanto en animales control como en accidentes cerebrovasculares, dado que el último grupo podría presentar la barrera hematoencefálica interrumpida (Kassner y Merali, 2015). Los animales se sacrificaron a las 2 horas o 24 horas después del inicio de la reperfusión. Todos los animales fueron inyectados por vía intravenosa (1 mL/kg de peso corporal) en la vena radial de la cola inmediatamente después de tMCAO. En el caso de la formulación de NGB-Nps la dispersión presentaba una concentración de 2,15 mg/mL de NGB.

4.2.14. Modelo de ictus

El procedimiento experimental consistió en una ligera modificación del modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Ji y col., 2009). En resumen, la anestesia fue inducida mediante la inyección de 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina en la mezcla. La temperatura rectal se mantuvo a 37,51°C utilizando una almohadilla térmica controlada por retroalimentación.

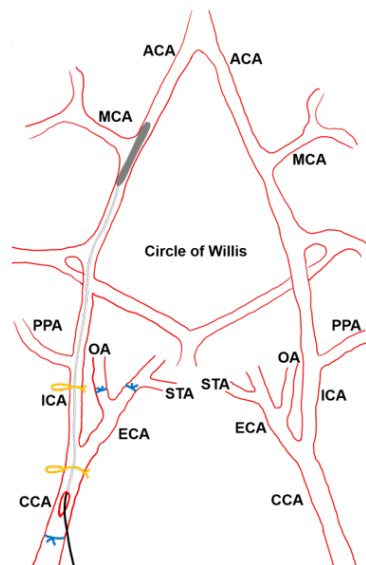


Figura 16. Representación esquemática del modelo de accidente cerebrovascular de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO). CCA (arteria cerebral común); ECA (arteria cerebral externa); ICA (arteria cerebral interna); MCA (arteria cerebral media).

Bajo un microscopio estereoscópico, se diseccionaron las arterias carótidas derecha, externa e interna del tejido conectivo a través de una incisión en la línea media del cuello. Se insertó un segmento de 23 mm de recubrimiento de 3-4 mm de sutura de monofilamento de nylon para ratas, comercialmente disponible (Doccol Corp., Redlands, CA, EE. UU.). Fue insertado desde el muñón de la arteria carótida común derecha hacia la arteria carótida interna de 18 a 20 mm desde la bifurcación para ocluir el origen de la arteria cerebral media. La sutura se retiró después de 45 minutos de

oclusión (figura 16). Se colocó una sonda de flujo láser-Doppler (diámetro de la punta de 1 mm) conectada a un medidor de flujo (PeriFlux 5000; Perimed AB, Estocolmo, Suecia) sobre el cráneo adelgazado en el territorio de MCAO (4 mm lateral a bregma) para obtener una medida continua de flujo cerebral relativo durante el experimento. Solo se incluyeron en el estudio animales con una reducción del flujo sanguíneo cerebral superior al 60%, evaluado por una sonda de flujo Doppler láser (diámetro de la punta 1 mm) conectada a un medidor de flujo (moorVMS-LDF1, Axminster, Reino Unido). Después de la cirugía y la recuperación, las ratas se devolvieron a sus jaulas y se sacrificaron 2 o 24 horas después de la reperfusión. Las ratas operadas por control se sometieron a los mismos procedimientos experimentales, pero sin oclusión de filamentos.

4.2.15. Histología y microscopía

La histología y el análisis microscópico confocal se llevaron a cabo en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (SCAI).

Después del sacrificio, se extrajeron los cerebros de todos los animales inyectados y se cortaron en secciones de 2 mm de espesor. Además, algunas secciones de los cerebros del grupo tMCAO se tiñeron con cloruro de trifeniltetrazolio monohidrato (TTC) (Ansari y col., 2011) para visualizar el área infartada, que parece blanca en contraste con las áreas normales teñidas de rojo (figura 17).

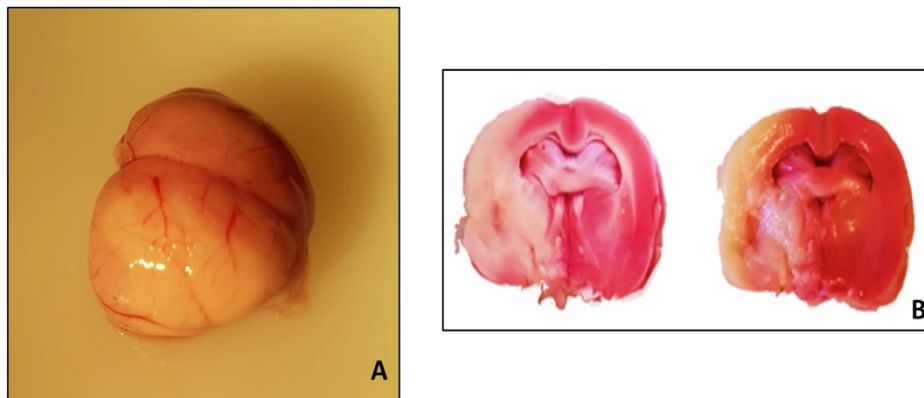


Figura 17. A: Cerebro sometido a tMCAO que muestra el área de infarto en el hemisferio izquierdo como el área más inflamada y pálida. B: Secciones del cerebro teñidas con TTC que muestran el área infartada más blanca la parte en contraste con las áreas teñidas de rojo no afectadas.

Después de la eutanasia, los animales se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4) seguido de 300 mL de formalina al 10%. Los cerebros se extrajeron y se fijaron posteriormente durante un período adicional de 4 horas en el mismo fijador a temperatura ambiente. Las muestras se crioprotegieron por inmersión durante la noche a 4°C en PB 0,1 M que contenía 30% de sacarosa, y se incrustaron en medio OCT para obtener secciones rostrocaudales en serie (20 µm de espesor) utilizando un criostato (Leica CM1950; Leica Microsistemas

SLU, L'Hospitalet de Llobregat, España). Las secciones de flotación libre se lavaron tres veces en PBS durante 5 minutos cada una, y se incubaron en solución de bloqueo que contenía Triton X-100 al 0,1% y suero de cabra normal (NGS) al 3% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente; luego y sólo en el caso de los animales tratados con NGB-Nps, las secciones se incubaron en antisueros de conejo anti-NGB 1:500 en PBS que contenía Triton X-100 al 0,2%, durante la noche a 4°C. Después de varios enjuagues en PBS, las secciones se incubaron con IgG 1 de conejo anti-conejo de cabra unida a Cy2: 1000, después de tres enjuagues en PBS, las secciones se tiñeron con 4', 6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato (DAPI) 1:2000 durante 8 minutos para visualizar los núcleos celulares. Luego, las secciones se deshidrataron rápidamente en una serie graduada de etanol, se limpiaron y se montaron en portaobjetos para examinarlas con un microscopio confocal de escaneo láser (Leica TCS SP5 II; Leica Microsistemas SLU, L'Hospitalet de Llobregat, España). Los núcleos celulares se visualizaron en azul debido a la tinción DAPI (Excitación 358, Emisión 529), las Nps aparecieron en rojo debido a la rodamina-123 (Excitación 507, Emisión 525) y NGB en verde debido a la tinción de inmunofluorescencia Cy2 (Excitación 492, Emisión 510), para garantizar que la señal detectada en cada canal no fuera debida a muestras de control de autofluorescencia de ratas no inyectadas con Nps-NGB. Por lo tanto, la biodistribución de Nps y NGB dentro del área infartada de los cerebros podría visualizarse histológicamente. Algunas secciones de los cerebros infartados se tiñeron con monohidrato de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Ansari y col., 2011) para visualizar el área infartada, que aparece blanca en contraste con las áreas normales teñidas de rojo (figura 17B).

4.2.16. Cuantificación de fluorescencia en el parénquima cerebral

La fluorescencia de la rodamina, Cy2 y DAPI se evaluó automáticamente en diferentes secciones del cerebro utilizando el software avanzado Leica AF.

Usando este software, que analiza la fluorescencia emitida por cada fluoróforo (valor gris medio) de áreas previamente determinadas en las secciones histológicas, se realizó una estimación semicuantitativa de la presencia de Nps (fluorescencia de rodamina), NGB (fluorescencia Cy2) y núcleos celulares (Fluorescencia DAPI) localizada en el parénquima cerebral de los cerebros sometidos a tMCAO en períodos de reperusión de 2 horas y 24 horas. Los datos obtenidos de diferentes secciones histológicas en áreas ubicadas al mismo nivel de la corteza parietal isquémica y con un aumento idéntico en ambos grupos de animales, se registraron para un análisis posterior (figura 18). Las comparaciones entre 2 horas y 24 horas se realizaron mediante la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95%.

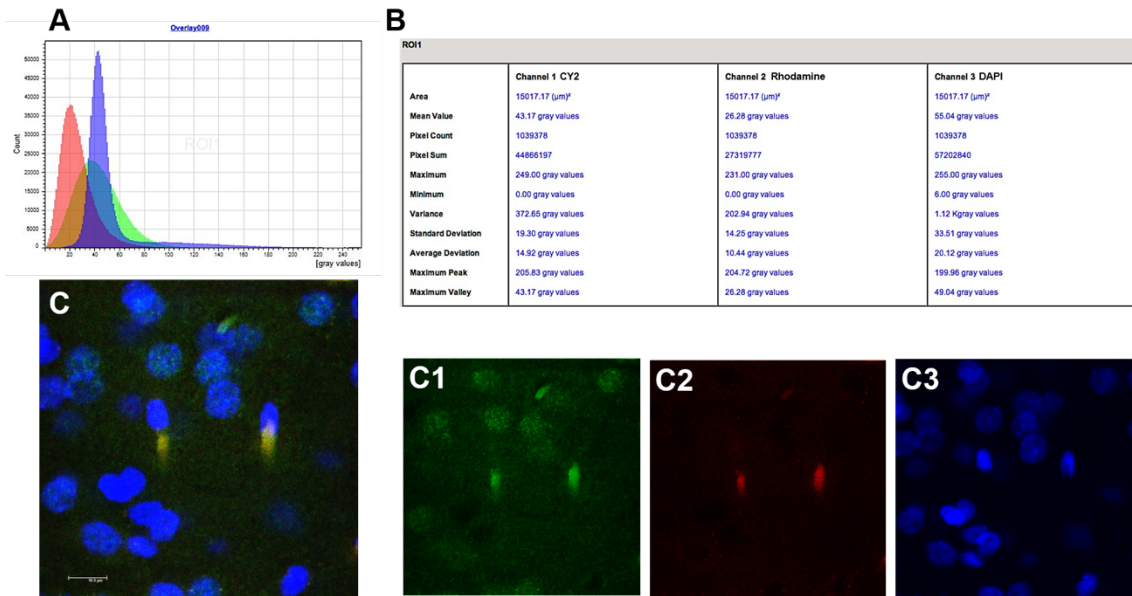


Figura 18. Metodología utilizada para cuantificar la fluorescencia emitida por los diferentes fluoróforos utilizados para etiquetar NGB, Nps y núcleos celulares en secciones histológicas del parénquima cerebral infartado. A y B: representación gráfica (A) y datos semicuantitativos (B) de los valores grises medios obtenidos por el software confocal AF (Leica) a partir de fluoróforos Cy2 (canal 1), rodamina (canal 2) y DAPI (canal 3). C: imagen fusionada de una sección histológica de la corteza parietal infartada, como resultado de la superposición de las imágenes C1, C2 y C3, que muestran respectivamente fluorescencia Cy2, rodamina y DAPI por separado: los núcleos celulares aparecen en azul (DAPI); NGB en verde (Cy2) y Nps en rojo (rodamina) se colocan (naranja claro / amarillo) en el citoplasma de las células nerviosas.

5. **RESULTADOS Y** **DISCUSIÓN**

5.1. ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO SOBRE MEDICAMENTOS BIOSIMILARES

La cienciometría es la ciencia que estudia la producción científica con el fin de medirse y analizarse. A la hora de llevarla a cabo prácticamente se realiza a través de la bibliometría, una parte de ella que aplica métodos matemáticos y estadísticos a toda la literatura de carácter científico y a los autores que la producen con el objetivo de estudiar y analizar la actividad científica (Mingersa y Leydesdorff, 2015).

Este trabajo, ha sido realizado utilizando como motor de búsqueda ScienceDirect, publicaciones científicas referenciadas en la bibliografía, así como algunas webs sobre la materia.

ScienceDirect es una herramienta líder en información de Elsevier para investigadores, profesores, estudiantes y profesionales de la salud y la información. Combina publicaciones científicas, técnicas y de salud autorizadas de texto completo con una funcionalidad inteligente e intuitiva para mantenerse informado y trabajar de una manera eficaz y eficiente. ScienceDirect contiene más de 14 millones de publicaciones de más de 3.800 revistas y más de 35.000 libros de Elsevier. Dicha herramienta es accesible para nosotros gracias a la suscripción realizada por la Universidad de Granada.

A la hora de realizar el trabajo, se introduce la palabra clave obteniéndose automáticamente el número de publicaciones que poseen la palabra o palabras buscadas. Además, se analizan los años de aparición, títulos de las publicaciones, temática y teniendo en cuenta si se encuentran en una revista o libro. En nuestro caso, el objetivo ha sido estudiar desde un punto de vista bibliométrico los distintos aspectos que presentan los medicamentos biosimilares, su importancia y el impacto que generan en su entorno. Para ello, se analizará su evolución en el tiempo y temáticas en las que se ha profundizado más. En una segunda parte, además, se selecciona uno de los tratamientos en los que los biosimilares están teniendo mayor repercusión: la artritis (Schimizzi y col., 2016).

5.1.1. Estudio 'biosimilar'.

La primera búsqueda se ha llevado a cabo con la palabra biosimilar / biosimilars y los resultados obtenidos han sido de 1883 publicaciones en la búsqueda y 697 resultados de imágenes relacionadas.

Cabe señalar como el primer resultado aparece en el año 2000 con una publicación sobre la revisión de un libro (Flyybjerg, 2000) que trata sobre la matemática existente

en bioestructuras y biodinámica, lo cual no guarda relación con la temática que se propone estudiar y analizar. De hecho, en los siguientes 3 años no existen publicaciones que respondan al patrón de búsqueda.

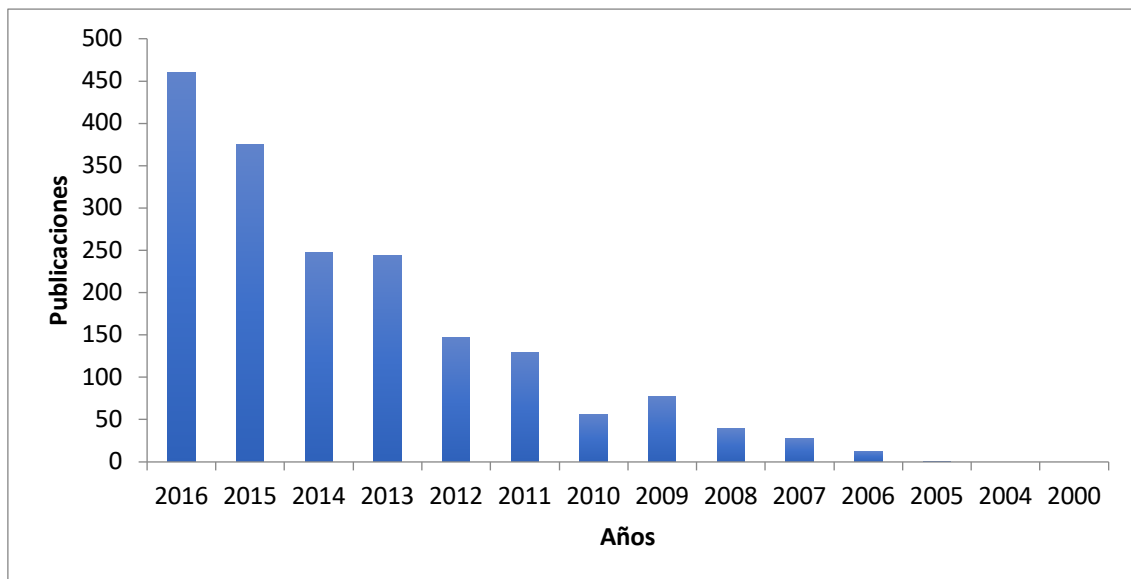


Figura 19. Publicaciones por año al introducir biosimilar como patrón de búsqueda.

En el año 2006 tenemos de nuevo publicaciones. En dicho año, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprueba el primer biosimilar (Romain, 2007). A continuación, como se puede observar en la figura 19 los artículos comienzan a crecer a partir de dicha fecha. Por otro lado, también se comprueba, que según nos acercamos a la actualidad, el número de publicaciones sigue aumentando cada vez más, lo que refleja la novedad, actualidad y repercusión de este tema. Partiendo de la existencia de solo una publicación en los años 2000 y 2004, de 14 en 2006 y hasta 468 en el año 2016, podemos asegurar que dichas cifras serán superadas a lo largo de 2017 con total seguridad, pues a mediados del correspondiente mes de enero de 2017 la cifra ronda las 60 publicaciones sobre la temática y en dicho año serán aprobados nuevos medicamentos biosimilares, a la vez que se sigue evidenciando estudios sobre los ya presentes y futuros. Esto no es más que el reflejo del despertar de los medicamentos biosimilares que suponen no solo gran impacto en el campo científico, sino también social, político y económico (Girault y col., 2015).

Centrando la búsqueda en el título de la publicación, podemos decir que donde más resultados aparecen es en las revistas: Value in Health (211) seguida de Gastroenterology (71) y European Journal of Cancer (56) (Fig. 20).

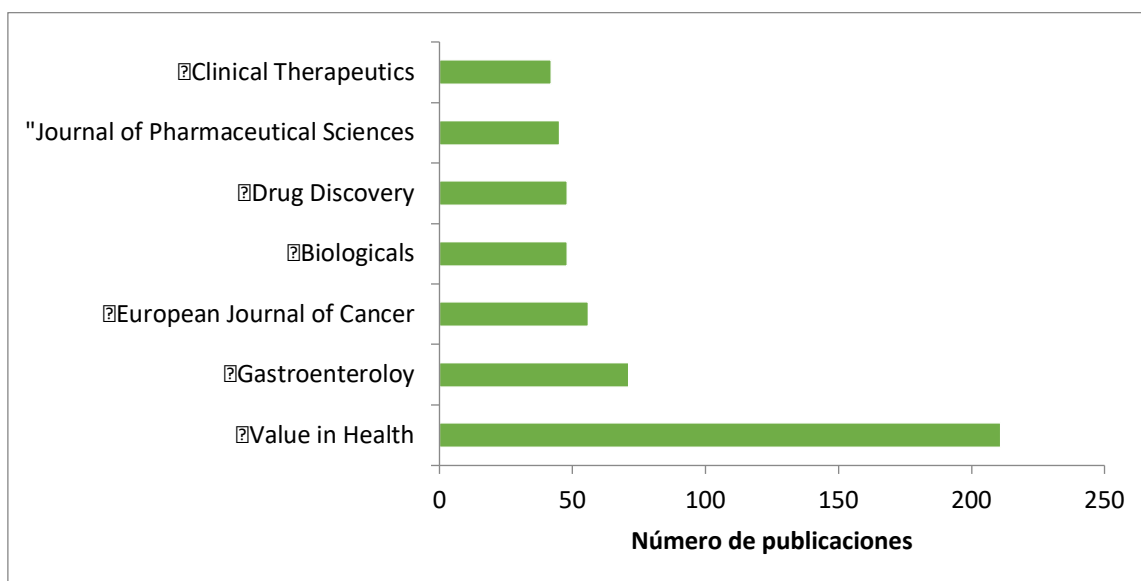


Figura 20. Revistas con más publicaciones sobre el patrón de búsqueda biosimilar.

Value in Health es una revista científica que contiene artículos de investigación sobre farmacoeconomía, salud económica, política, y diversos resultados de investigaciones (clínica, económica, etc.), lo que sin duda es debido a la gran evolución, interés e impacto económico que supone el empleo de biosimilares.

En segundo lugar, se posiciona la revista Gastroenterology. La razón de ello se debe a uno de los medicamentos biológicos más populares: infliximab, y del cual existen 3 biosimilares: Flixabi®, Inflectra® y Remsima®. Es uno de los medicamentos biosimilares más importantes debido a que es uno de los primeros medicamentos biológicos que se desarrollaron, además entre sus indicaciones está el tratamiento de la enfermedad de Crohn, que consiste en inflamaciones crónicas a lo largo del aparato digestivo y cuya diagnosis ha crecido en gran medida en los últimos años junto a la colitis ulcerosa, artritis o psoriasis que poseen gran impacto social (Khraishi y col., 2016).

Finalmente cabe hablar del cáncer, enfermedad que se encuentra en el top de investigación y recursos para llevar a cabo sus estudios. Los medicamentos biológicos establecen una nueva manera para luchar contra ella y los biosimilares se posicionan como los medicamentos para nuevos tratamientos (Curigliano y col., 2016), siendo el cáncer uno de los objetivos para la aplicación de los medicamentos biológicos (Cochran y col., 2017).

Llegados a este punto, nos pareció interesante analizar la variabilidad temática que presentan estos medicamentos. La figura 21 muestra los resultados obtenidos, siendo patient (247) el que más resultados obtiene, suponiendo cerca del 25% de los analizados, lo que sin duda refleja la importancia del estudio 'in vivo' y de postcomercialización y farmacovigilancia de los biosimilares. Le siguen research poster (118) y poster presentation (108), igualado en número con sesiones de presentación

(108). Estos dos últimos reflejan la difusión científica que se está produciendo en torno a estos medicamentos y la novedad que representan.

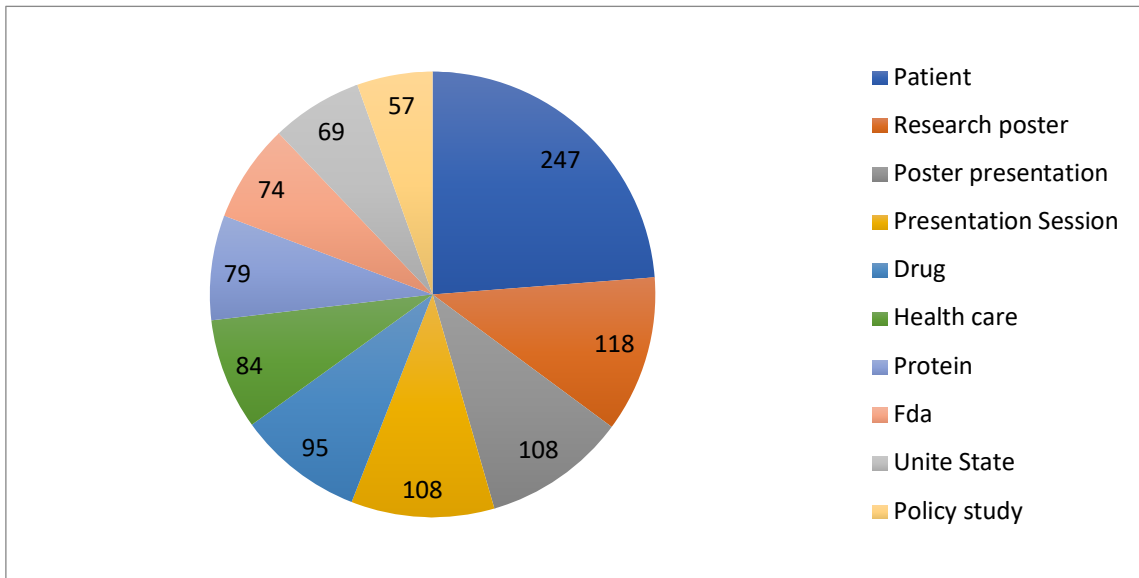


Figura 21. Publicaciones por temática sobre el patrón de búsqueda biosimilar.

Por último, queremos tener en cuenta el tipo de publicación que recoge mayor número de estudios sobre los biosimilares (figura 22), encontramos que son las revistas científicas con 1.683 resultados seguido por libro (223) y trabajo de referencia (23).

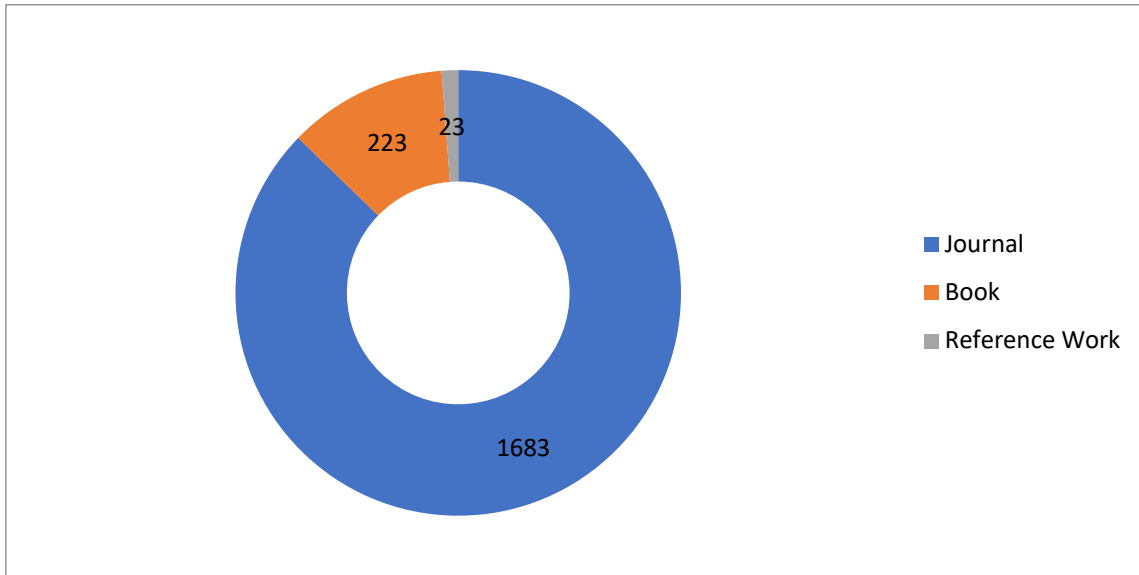





Figura 22. Publicaciones biosimilar por formato.

Que predominen las revistas es algo que se considera lógico, ya que los medicamentos biosimilares son un concepto reciente y por lo tanto la escritura al respecto se encuentra más ceñida a la versatilidad, brevedad y accesibilidad que posee la revista, y que se distancia de lo que son los géneros de libro o trabajo de referencia y cuya mejor manera de apreciarlo es la visual del anillo de la figura 22.

Sin duda alguna la divulgación en las revistas científicas nos proporciona una información bastante más actualizada que la de los textos científicos, aunque estos nos dan en la gran mayoría de los casos una información más extensa sobre el tema.

5.1.2. Estudio sobre tratamientos para la artritis con medicamentos biológicos y biosimilares

En esta segunda parte, el objetivo se centra en una enfermedad y su tratamiento con medicamentos biosimilares. Debido a la alta cantidad de pacientes que la sufren y su impacto social ilustramos el tratamiento de medicamentos biosimilares con la artritis. Para ello, el trabajo se ha enfocado sobre tres apartados que por separado se han considerado interesantes; así en primer lugar analizaremos artritis con biosimilar y posteriormente con las dos moléculas con principio activo que presentan biosimilares para tratar la enfermedad (artritis e infliximab y artritis y etanercept).

-  Artritis + biosimilar
-  Artritis + infliximab
-  Artritis + etanercept

Arthritis + Biosimilar

Al introducir este patrón se han encontrado 413 resultados la mayoría de los trabajos datan de 2016 (114) y se observa como progresivamente a lo largo de los años el número de resultados al respecto va aumentando según nos acercamos a la actualidad (figura 23).

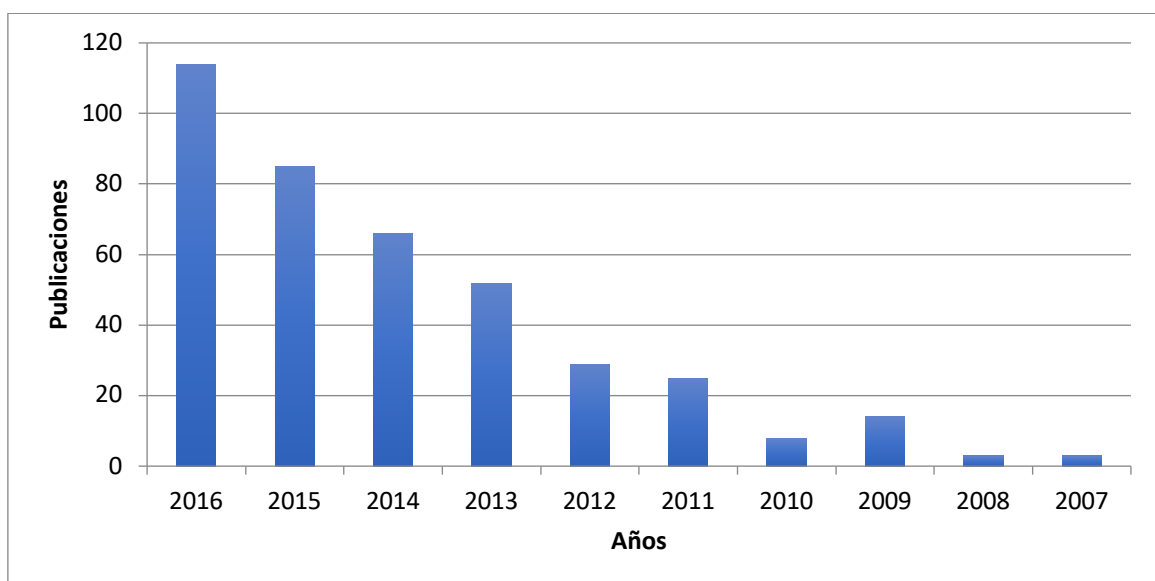


Figura 23. Publicaciones por año con el patrón de búsqueda de artritis y biosimilar

La primera publicación data del año 2007 y no guarda mucha relación con la temática que estamos estudiando al centrarse en las consecuencias de la secuenciación genómica y el resultado de aplicarlas al tratamiento de enfermedades, hecho que vuelve a ocurrir en los tres siguientes años. Es a partir de 2010 cuando podemos visualizar de una forma clara el crecimiento en el número de publicaciones, pareciéndose a una exponencial según nos acercamos a la actualidad y donde se va profundizando cada vez más sobre la temática objeto de estudio en cada una de ellas.

El tratamiento de la artritis con medicamentos biológicos empezó en el año 1999, gracias a Remicade® (Cornillie, 2009), pero el primer biosimilar no se autoriza en el mercado hasta septiembre de 2013. Por eso si comparamos en el gráfico el año 2013 con la actualidad podemos apreciar cómo se ha doblado prácticamente el número de publicaciones. La tendencia es de un crecimiento más rápido de lo que ha venido sucediendo, sobre todo si tenemos en cuenta lo ocurrido durante 2016, año en el que se autoriza un nuevo principio activo biosimilar, que entre sus indicaciones incluye la artritis: Benepali® sobre el que predecimos que su estudio en los años venideros aumentará (Psachoulia y Keady, 2016).

La figura 24 representa las publicaciones por revistas y podemos observar, que son 3 fundamentalmente las que tratan el tema objeto de estudio, ya que son las que poseen mayor relevancia.

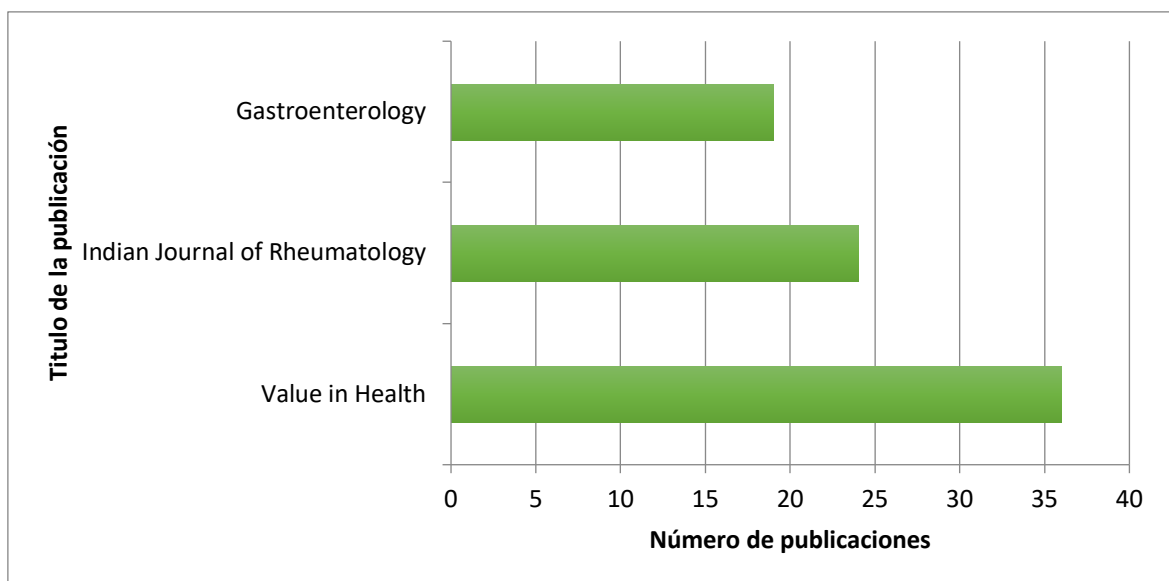


Figura 24. Revistas con mayor número de publicaciones sobre nuestra búsqueda.

Value in Health es la revista que ocupa el primer lugar. Se observa cómo se prioriza el peso de biosimilar entre otros, pues esta revista se centra entre otras temáticas en temas económicos principalmente, punto donde recae la importancia de los medicamentos biosimilares, como demostramos en la primera parte de este estudio. En segundo lugar, aparece Indian Journal of Rheumatology. Prescindiendo de hablar del gran número de investigaciones indias en el compendio mundial, aquí podemos ver

en segundo lugar el peso de la enfermedad en la búsqueda al estar presente de una manera notable en los estudios de este país. Finalmente comentar que enfermedades como la de Crohn o colitis ulcerosa emplean tratamientos con mecanismo de acción similares al del tratamiento de la artritis (inhibición del TNF alfa), y de hecho se utilizan los mismos medicamentos biológicos como en el caso de infliximab®, de ahí la aparición en tercer lugar de Gastroenterology, la primera en su área (1 de 79), y con un índice de impacto de 18,187 en 2015 un Q1 (Bell y Kamm, 2000). Además, Value in Health tiene un índice de impacto de 3.824 en el mismo año. Esto, lo podemos interpretar como que la investigación en torno a la enfermedad tiene más valor o importancia, pero cuando hablamos de biosimilares aparecen los aspectos económicos de una manera muy destacada.

Respecto al tipo de publicaciones destaca como viene siendo habitual la revista de una manera contundente por razones de novedad, publicaciones periódicas y facilidad de acceso a su información entre otras (figura 25).

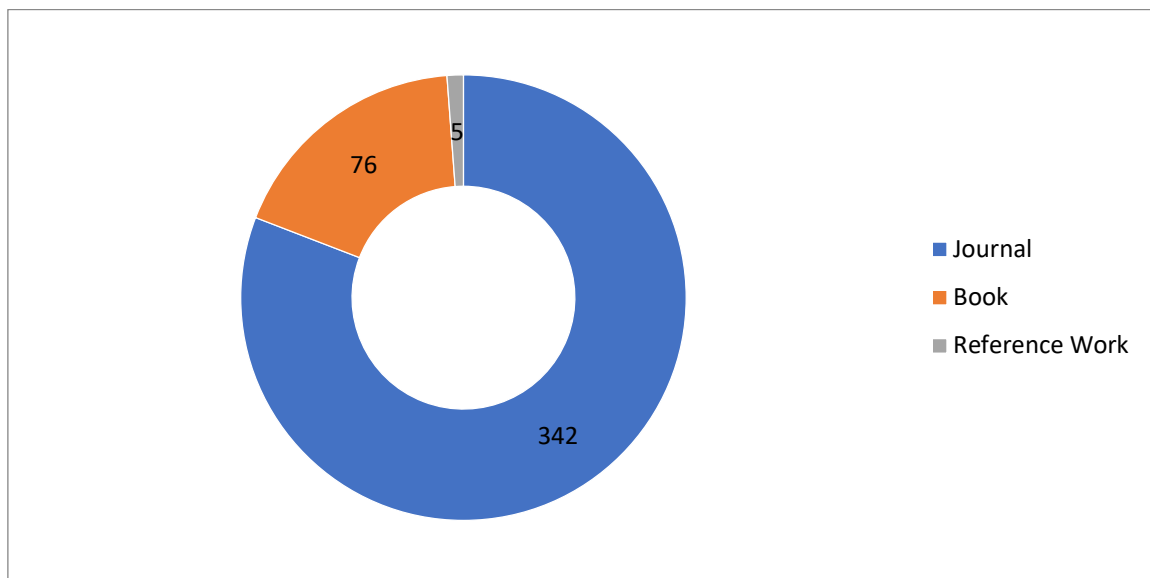


Figura 25. Formato de las publicaciones.

Arthritis + infliximab

Infliximab fue el primer medicamento biotecnológico que se utilizó en reumatología, al autorizarse en 1999. Esta especialidad médica, junto a la oncología, ha sido la que más ha crecido en el desarrollo de las terapias biológicas (Márquez-Velásquez, 2016). La aprobación de biosimilares con infliximab fue un hito, porque constituyó la primera autorización en Europa de un biosimilar de un fármaco de segunda generación con particulares complejidades estructurales y funcionales. Además, esta 'luz verde' a biosimilares con infliximab en Europa se ha extendido a comienzos de abril de 2016 en Estados Unidos, donde ya se ha aprobado uno de los biosimilares de infliximab que existen en el mercado (Cornillie, 2009).

En nuestra búsqueda realizada desde 1998 hasta 2016 se encuentran 9.687 resultados cuyo número, al igual que los anteriores, avanza conforme nos acercamos a la fecha actual, pero con un matiz diferente como podemos ver en la figura 26.

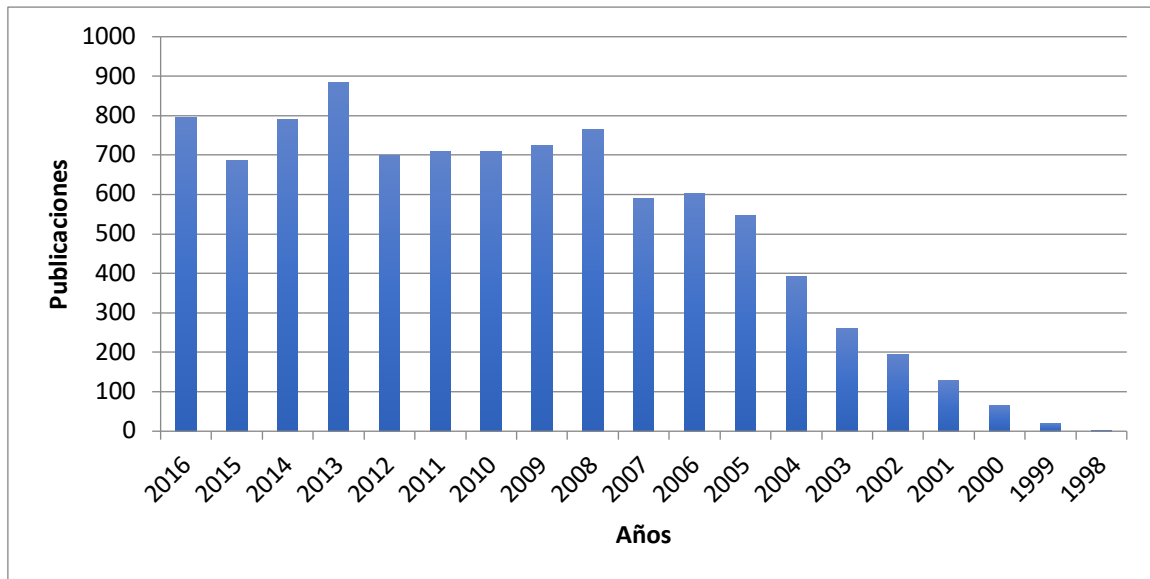


Figura 26. Publicaciones durante los últimos años de la búsqueda propuesta.

Tal y como hemos comentado anteriormente el medicamento se autorizó en 1999, y precisamente en ese año aparecen 22 publicaciones con temáticas predominantes sobre las indicaciones que tratan, la artritis sobre la cual hablamos y la enfermedad de Crohn. A partir de ese momento dichas publicaciones tienen un crecimiento exponencial hasta el año 2008 donde se produce un estancamiento en el crecimiento del número de publicaciones hasta el año 2013, año donde se produce el mayor incremento para posteriormente mantenerse con fluctuaciones hasta 2016, donde vuelve a repuntar. Dichas fluctuaciones pueden deberse a que en 2013 se autorizaron los primeros biosimilares de infliximab y continuó en 2016 con otro más (Gokhale y col., 2016). Para el final de 2016 había 3 medicamentos biosimilares de infliximab comercializados. Una razón más para justificar la forma que presenta este gráfico es la artritis 'per se', ya que es una enfermedad con un enorme impacto en nuestra sociedad, pues mucha gente la padece y el esfuerzo para encontrar un mejor tratamiento es reflejado en el número de estudios publicados: muy numerosos, y con leve crecimiento a lo largo de los años.

Continuando el estudio, hay un rasgo llamativo, y es que Value in Health ha pasado a situarse en segundo lugar en las revistas científicas, tal y como se puede observar en la figura 27. Curioso es comprobar como el primer lugar es ocupado por Gastroenterology. La razón procede de las indicaciones de Infliximab, ya que aparte de utilizarse para el tratamiento de artritis, entre sus indicaciones también figura la enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, psoriasis, colitis ulcerosa y esto se hace presente cuando analizamos gran parte de los trabajos que responden al patrón de búsqueda

introducido. De ahí que figuren las revistas Gastroenterology (Kaniweska y Rydzewska, 2016) y Journal of American Academy of Dermatology entre las que más publicaciones tienen al respecto. Aún así sigue destacando, la importancia de la temática farmacoeconómica de este principio activo focalizado en la artritis.

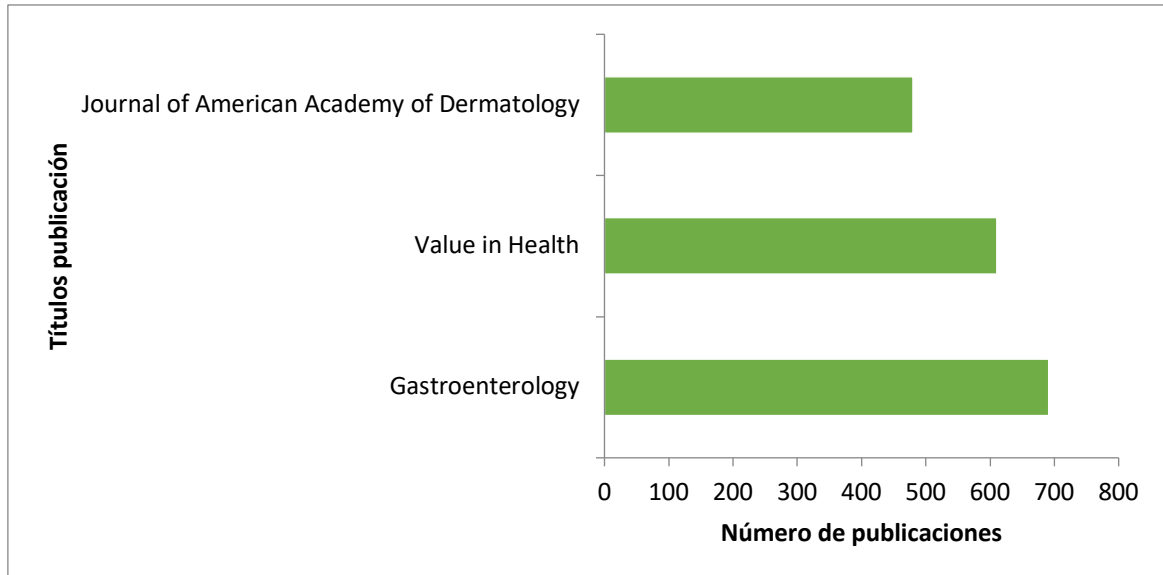


Figura 27. Revistas con más publicaciones sobre la búsqueda.

Los desórdenes que siguen a pacientes en la temática (enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide) son dos para los cuales tiene indicación el medicamento y, a su vez, enfermedades contra las que más se ha avanzado en los últimos años. Estos medicamentos establecen una nueva manera de tratar estas enfermedades de una forma mucho más eficaz de lo que se realizaba antes de su existencia, disminuyendo de una manera muy significativa las consecuencias negativas o efectos secundarios de los tratamientos químicos, que incluyen corticoides en gran mayoría y afectan a la calidad de vida de los pacientes que padecen dichas enfermedades (Scholar, 2009).

Cabe destacar finalmente (figura 28) el elevado número de libros publicados respecto a la búsqueda realizada, ya que superan los mil. Al llevar autorizado desde 1999 esto muestra la consolidación de la información al respecto. También vale la pena destacar que Handbook of Systemic Autoimmune Diseases lidera las publicaciones de libros lo que nos hace pensar en el destacado papel del medicamento en el tratamiento de este tipo de patologías desde su autorización. Sin embargo, no deja de ser una cifra pequeña si lo comparamos con las publicaciones en revistas, representando aproximadamente un 10% del total.

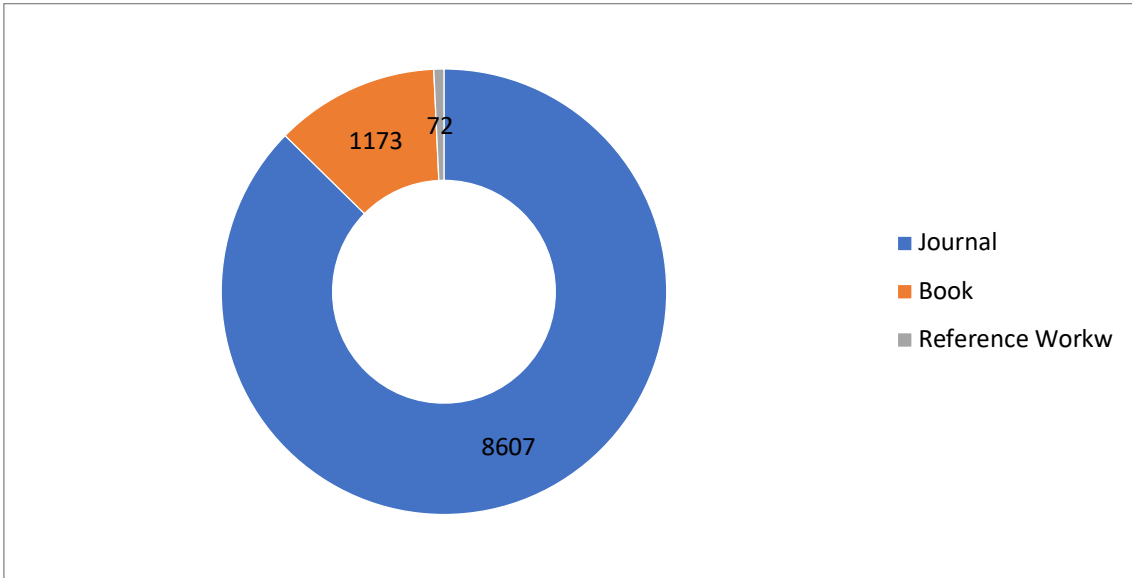


Figura 28. Formato más común en las publicaciones.

Arthritis + etanercept

Etanercept, es un medicamento biológico entre cuyas indicaciones se encuentran los casos de artritis reumatoide de moderada a grave, que fue aprobado en 1999, fecha en la que comienzan a aparecer publicaciones.

Encontramos 7991 resultados y sucede como en los casos anteriores. El primer trabajo data de 1998 donde hay solo una publicación, a partir de ahí se incrementa manteniéndose en unas cifras más o menos constantes hasta llegar a un repunte en el año 2005, volviendo a mantener esa continuidad en el número de artículos en los años posteriores y siendo 2010 y 2016 los años con más publicaciones como se puede ver en la figura 29.

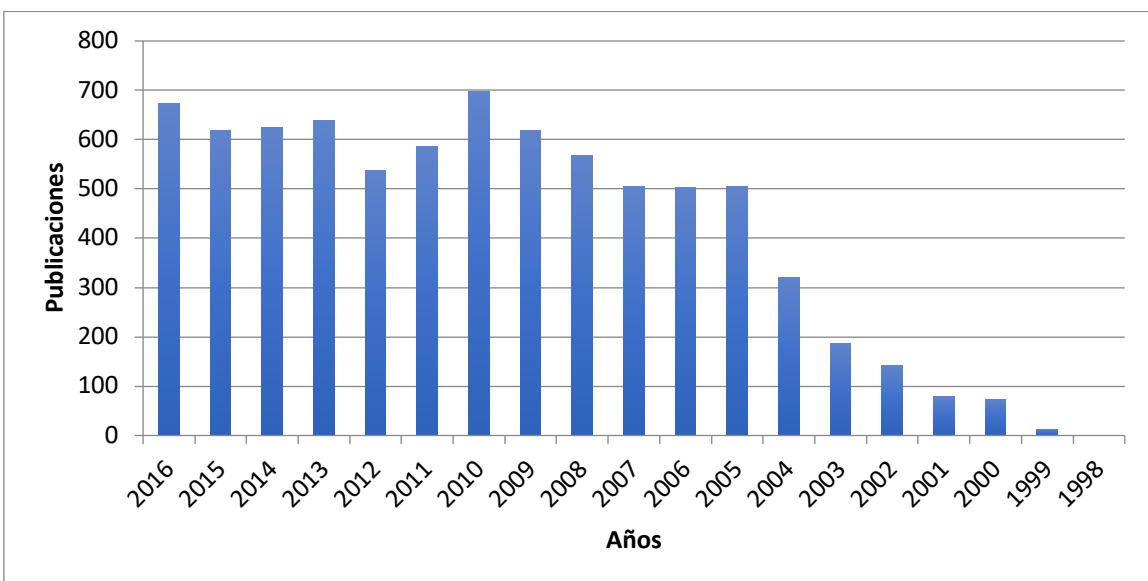


Figura 29. Publicaciones por año según el patrón de búsqueda.

Es precisamente a partir de enero de 2016 cuando se autoriza su biosimilar, lo que puede provocar el repunte señalado en el número de investigaciones respecto a los años anteriores.

A la hora de visualizar las revistas que poseen más número de publicaciones (figura 30), podemos observar que al contrario de infliximab, en esta búsqueda si aparece Value in Health en primer lugar, algo que contrasta, pues el biosimilar salió al mercado en el año 2006, la justificación es debida la preocupación famacoeconómica de la molécula, entre otras cosas porque en España por ejemplo dobla en precio al infliximab (Ben-Horin y col., 2016).

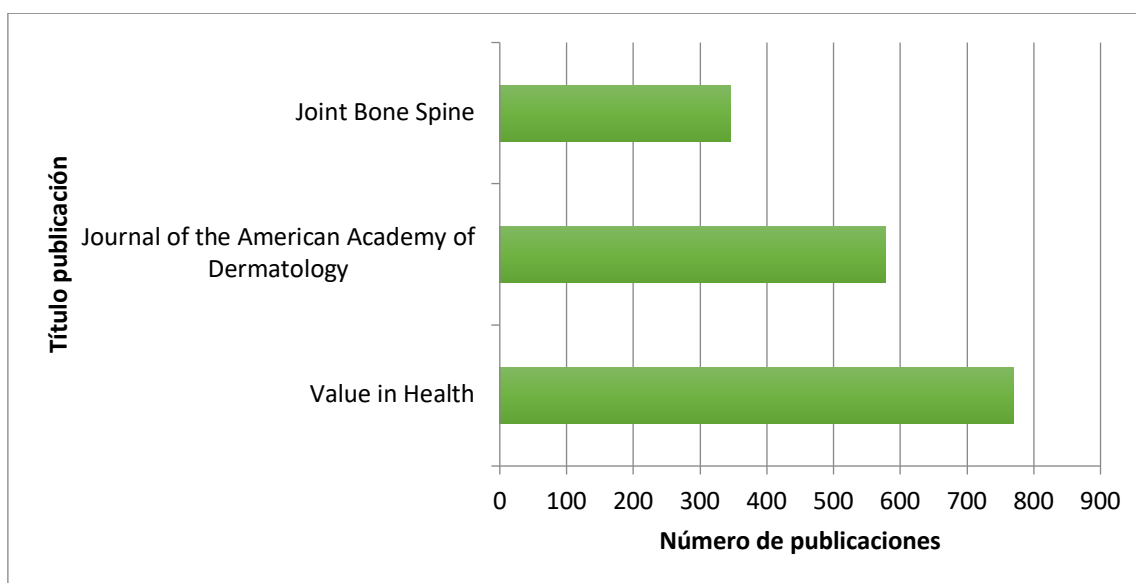


Figura 30. Revistas científicas con más publicaciones de la búsqueda.

En segunda y tercera posición se encuentran Journal of the American Academy of Dermatology y Joint Bone Spine, revistas de prestigio que se encuentran en esa posición debido a que aparte de ser un medicamento con indicación para la artritis, posee indicación para espondilitis anquilosante y la psoriasis (Sartor, 2004), de ahí que sean numerosos los trabajos recopilados por estos medios de divulgación que son considerados en su área como publicaciones con alto índice de impacto. Concretamente Journal of the American Academy of Dermatology tiene un factor de impacto de 5,472 y Joint Bone Spine de 2,946, lo que sin duda avala la categoría científica de las mismas.

En esta última parte del estudio, similar a la realizada con el anterior principio activo (infliximab), a pesar de ser la revista el género más cultivado, hay un número consistente de libros y trabajos de referencia que nos permiten afirmar que etanercept ha sido estudiada de una manera intensa encontrando todo tipo de información científica consolidada sobre él (figura 31).

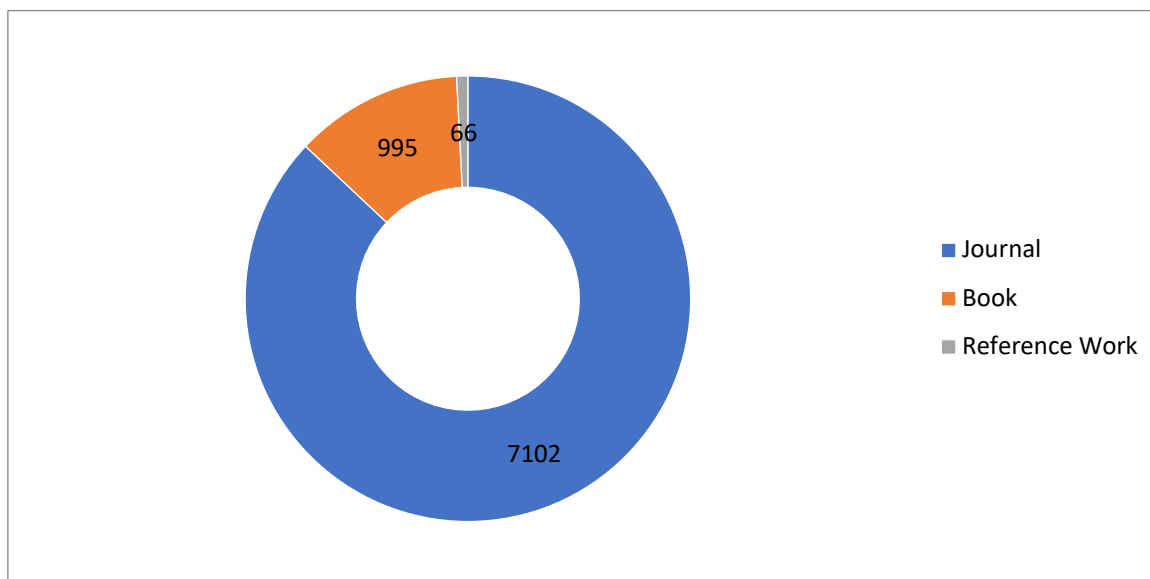


Figura 31. Tipo de publicaciones según búsqueda.

Respecto a los datos obtenidos en el estudio bibliométrico realizado, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- El interés en los medicamentos biosimilares se está incrementando y se puede pronosticar que en el futuro continuará esta tendencia, dados los datos obtenidos en nuestro estudio bibliométrico.
- La verdadera importancia de estos medicamentos subyace en el tema económico. La razón es que, a lo largo del análisis de las publicaciones, en las búsquedas conjuntas, encontramos un gran número de revistas cuya temática se asemeja más con temas económicos que con las distintas enfermedades que tratan estos medicamentos.
- Los medicamentos biológicos y biosimilares tienen su foco en enfermedades muy extendidas, como los trastornos del sistema inmunitario y el cáncer.
- La artritis es una enfermedad con gran impacto en nuestra sociedad y los trabajos sobre ella son muy numerosos. Los medicamentos biológicos representan una nueva manera de tratarla que llega a superar los tratamientos convencionales. Cuando relacionamos nuestra búsqueda con biosimilar y los dos fármacos se demuestra que el estudio de los medicamentos biológicos comienza a principios de siglo y sigue creciendo hasta la actualidad. De hecho, nuestras búsquedas aparecen en revistas con un alto índice de impacto, lo que demuestra que los medicamentos biológicos y especialmente los biosimilares son de gran interés científico y representan el futuro de la industria farmacéutica.
- El estudio de biosimilares, como la relación con una determinada enfermedad, poseen gran relevancia actual en el campo de la investigación científica. Existe una numerosa

presencia de trabajos sobre estudios clínicos, muchos de los cuales comparan los medicamentos biosimilares con los innovadores. La razón como dijimos en la introducción es que son similares, pero no idénticos debido a su propia idiosincrasia de naturaleza y fabricación.

- Los biosimilares son medicamentos que tienen validada su eficacia y seguridad comparables a la del innovador original. Y esto unido a su razón económica respecto a sus innovadores, está incrementando el estudio y uso en terapias variadas al aumentar su accesibilidad y el conocimiento del uso de los medicamentos biológicos, como se ha comprobado tras la revisión bibliográfica realizada.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1. Tamaño, Polidispersión y Potencial Zeta

Una vez elaboradas las preparaciones según los métodos de síntesis expuestos anteriormente se procedió al análisis macroscópico de las dispersiones de Nps. En ninguna de las muestras estudiadas se presentan agregados ni sedimentos, lo que pone de manifiesto su estabilidad física. Los tres métodos presentan cierta tonalidad blanquecina, la cual es más intensa en los métodos 2 y 3. De acuerdo con los estudios de Decuzzi y col. (2009), Nps con un tamaño de entre 100 y 200 nm son fácilmente capturadas por endocitosis y partículas con un tamaño superior a 300 nm lo son por fagocitosis, por lo que nuestro tamaño ideal para estos nanotransportadores debería ser inferior a los 300 nm.

Además del tamaño, en su diseño se considera fundamental la carga eléctrica superficial, pues tal y como refleja la ley de Fick, este parámetro es decisivo ya que permite que las Nps atraviesen membranas celulares mediante mecanismos como la difusión pasiva, transcitosis o transporte por adsorción (Meares, 1993; Ritsema y col., 2018). Se realizaron varias medidas a las diferentes dispersiones de Nps obtenidas en cada uno de los métodos de síntesis, medidas realizadas a las Nps sin recubrir y tras los diferentes recubrimientos. La tabla 8 muestra el tamaño, polidispersión y potencial ζ obtenidos para las diferentes dispersiones de Nps sintetizadas de acuerdo con los tres métodos propuestos.

Muestra	Tamaño medio (nm)	Polidispersión	ζ - Potencial (mV)
1	65,69 \pm 0,98	0,89 \pm 0,15	-24,03 \pm 6,70
2	55,92 \pm 7,60	0,84 \pm 0,22	-26,70 \pm 9,20
1A	193,66 \pm 10,37	0,34 \pm 0,07	47,50 \pm 1,61
2A	163,73 \pm 14,05	0,53 \pm 0,11	29,67 \pm 1,41
1B	248,06 \pm 6,17	0,46 \pm 0,09	27,93 \pm 1,50
2B	243,16 \pm 6,02	0,37 \pm 0,03	17,88 \pm 2,02
3	200,10 \pm 3,82	0,317 \pm 0,04	68,20 \pm 1,85

Tabla 8. Medidas del tamaño, polidispersión y potencial ζ , de los diferentes tipos de Nps. 1: Nps de HS según el método 1. 2: Nps de HS según el método 2. 1A: Nps de HS (1) con recubrimiento de quitosán. 2A: Nps de HS (2) con recubrimiento de quitosán. 1B: Nps de HS (1A) con recubrimiento lipídico. 2B: Nps de HS (2A) con recubrimiento lipídico. 3: Nps sólidas lipídicas según el método 3.

Dada la similitud en la síntesis de los métodos 1 y 2 en la que utilizamos HS y la gelificación iónica, sus resultados serán analizados conjuntamente y a continuación se analizará el método 3. Como se puede observar, los resultados para las Nps obtenidas según el método 1 y 2 en su síntesis son muy parecidos en tamaño sin que existan

diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), 65,7 y 56 nm, respectivamente. De igual modo, ambos métodos presentan una carga eléctrica superficial negativa similar, -24 y -27 mV respectivamente.

Una vez elaboradas, estas Nps han sido sometidas a un recubrimiento específico con la intención de hacerlas potencialmente adecuadas para su paso a través de la barrera hematoencefálica. En ambos casos el recubrimiento ha sido el mismo. En primer lugar, hemos utilizado quitosán, un polisacárido catiónico gracias a los grupos amino presentes en su estructura. Por este motivo, tras dicho recubrimiento las partículas pasan a tener un valor de carga superficial positiva. Esto se traduce en una importante ventaja farmacocinética, ya que se promueve la interacción con las células endoteliales caracterizadas por un elevado potencial electrocinético negativo. Por otra parte, el valor del potencial ζ se relaciona con la estabilidad de las Nps en el seno de la dispersión. De modo que valores de potencial ζ por encima de ± 30 mV implican una mayor estabilidad debido al predominio de las fuerzas de repulsión electrostática entre dichas partículas (Hans y col., 2002; Muller y col., 2001). Así, para el método 1 hemos determinado valores en torno a 48 mV y para el método 2 de aproximadamente 30 mV. En cuanto al tamaño de las Nps, en ambos casos se incrementa en aproximadamente un 300%, aunque el tamaño se mantiene por debajo de los 300 nm.

Como paso final del recubrimiento, se procede a adicionar un lípido, concretamente - glicerol tripalmitina-, que se unirá a la primera lámina de recubrimiento de quitosán en virtud de las interacciones electrostáticas entre ambos, pues son de carga opuesta. De este modo pretendemos dotar a las Nps diseñadas de cierto carácter lipófilo, lo que puede potenciar su capacidad de internalización a través de las membranas. De acuerdo con la tabla 8 y como cabría esperar, los valores tanto de tamaño como de carga eléctrica, se vuelven a ver afectados. Particularmente, si hablamos del tamaño vuelve a aumentar, situándose las Nps definitivas para ambos métodos en torno a los 240 nm. Dicho tamaño se encuentra dentro de los objetivos para el cual han sido diseñadas. Respecto al análisis de su carga superficial, a pesar del descenso en valor absoluto, la carga sigue siendo positiva, aunque tal y como se puede observar en los datos de la tabla 8, las Nps pierden carga eléctrica superficial positiva, que disminuye cerca de los 20 mV para el método 1 y de 12 mV para las Nps del método 2. Por tanto, el recubrimiento lipídico fue realizado con éxito con el objeto de mejorar la permeación de las Nps a través de la BHE, pues favorece su liposolubilidad sin llegar a alterar el signo de su carga eléctrica superficial que sigue siendo positiva. De hecho, los proteoglicanos, mucopolisacáridos, glicolípidos y flucoproteínas con sulfatos y ácido siálico presentes en la membrana plasmática de las células endoteliales les confieren carga negativa a pH fisiológico; así interacciones electrostáticas entre las Nps (positivamente cargadas) y las membranas (negativas) podrían favorecer su adsorción e internalización a través de células endoteliales (Jones y Shusta, 2007).

En este sentido, los trabajos realizados por otros autores han puesto de manifiesto que Nps con moderada o alta carga positiva (15mV o por encima de 15mV) han sido capaces de cruzar la BHE, constituyendo eficientes sistemas de administración de fármacos en el cerebro (Saraiva y col., 2016; Gao y col., 2014; Jallouli y col., 2007).

Finalmente, la polidispersión de las Nps se muestra elevada según los valores correspondientes a la síntesis de las Nps de hialuronato. No obstante, hemos observado, al contrario de lo que refieren otros autores (Iache y González, 2017), que la polidispersión disminuye con el recubrimiento. El descenso en el valor de la polidispersión es más patente tras el primer recubrimiento con quitosan. Los datos finales (tabla 8) se mantienen por debajo de valores de 0,4 lo que pone de manifiesto una mayor uniformidad de los sistemas y estabilidad de la dispersión a lo largo del tiempo con una menor tendencia a formar agregados (Pauluk y col., 2019).

En cuanto a los resultados obtenidos para las Nps preparadas de acuerdo al método 3, se observa que tras su síntesis presentan un tamaño adecuado, en torno a los 200nm. Tal y como se mencionó anteriormente, se trata de nanopartículas lipídicas sólidas sintetizadas de modo que presentan un potencial ζ positivo y una naturaleza lipídica que les otorga la capacidad de atravesar membranas biológicas, por lo que no se han sometido a ningún tipo de recubrimiento. Tanto por su tamaño como por su carga (68 mV) dicho método 3 se presenta como una alternativa diferente a las Nps propuestas de acuerdo con los métodos 1 y 2 y que, por su naturaleza lipídica, se postulan como buenos candidatos para penetrar la BHE. Por último, de acuerdo con los valores de polidispersión este sistema es uniforme en cuanto a tamaño de partícula.

5.2.2. Estudios microfotográficos: TEM y SEM

Distintas muestras de Nps correspondientes a los diferentes métodos de síntesis fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). Estos métodos microscópicos nos permiten obtener correspondencias entre los datos obtenidos en la medición de tamaño y evidenciar la existencia de Nps en los tres métodos elaborados, además de observar la forma y aspectos de dichas partículas. Así en la figura 32 se pueden observar las Nps finales obtenidas tras el correspondiente recubrimiento con quitosán y tripalmitina utilizando el método 1.

En la microfotografía 32A se puede observar una perspectiva general del medio, apreciándose cierta polidispersión en los tamaños de partícula, lo que corrobora la polidispersión comentada en el apartado anterior. En cuanto a la morfología, son partículas esféricas, lo que se aprecia más claramente en la segunda imagen (32B) Según Huiyi y colaboradores (Huiyi y col., 2013), la forma esférica podría servir para el mantenimiento de la calidad textural (Sanchez y col., 2017). Asimismo, se observa unos

bordes más claros probablemente debidos a los diferentes materiales de recubrimiento.

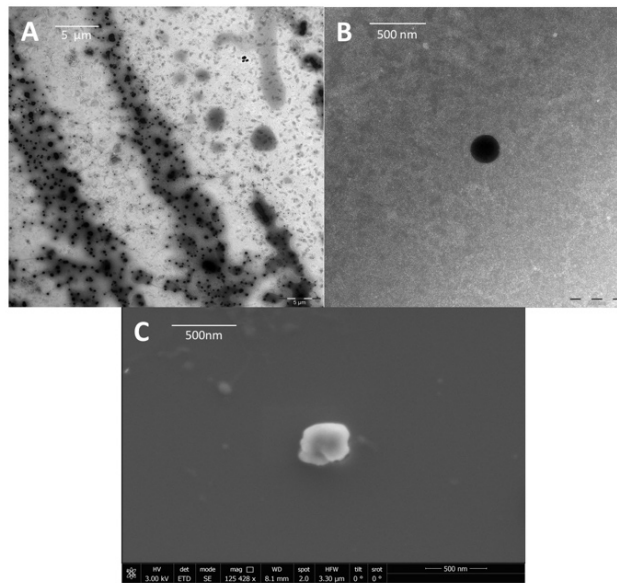


Figura 32. Microfotografías obtenidas de las Nps correspondientes al método 1. A y B TEM y C SEM.

En la imagen 32C, obtenida por SEM, se aprecia una microfotografía de una Np en la que se aprecia que su superficie no es lisa sino rugosa y esponjosa, no se observan poros, lo cual es positivo ya que la alta porosidad se asocia con una difusión rápida y fácil de agua y otros fluidos dentro y fuera de la matriz con posterior fuga o rotura de las Nps (Kumar y Harjinder, 2007; Rathore y col., 2013). Este aspecto está íntimamente relacionado con el recubrimiento.

La figura 33, muestra las imágenes de las Nps obtenidas con el método 2, con resultados similares a los expuestos anteriormente.

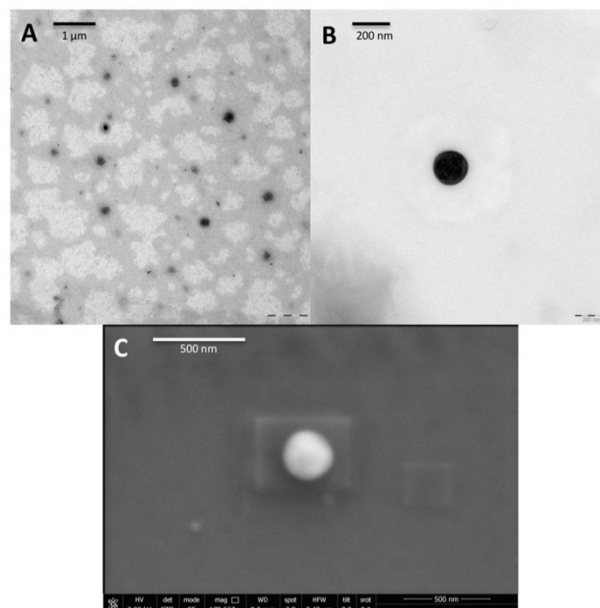


Figura 33. Microfotografías obtenidas de las Nps correspondientes al método 2. A y B TEM y C SEM.

En la microfotografía 33A, se pueden visualizar Nps esféricas y con una ligera polidispersión. En la imagen 33B, se ha seleccionado como en el caso anterior una Np en solitario, la cual presenta un núcleo oscuro y unos bordes más claros debidos posiblemente a su recubrimiento. Su tamaño es de aproximadamente 200 nm. Finalmente, en la tercera imagen (33C), obtenida por SEM, se observa una Np completamente esférica. En este caso tampoco hay presencia de porosidad en la superficie, aunque el recubrimiento se muestra más uniforme y la superficie menos rugosa.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos para las Nps del método 3. La figura 34 muestra que se trata igualmente de Nps esféricas.

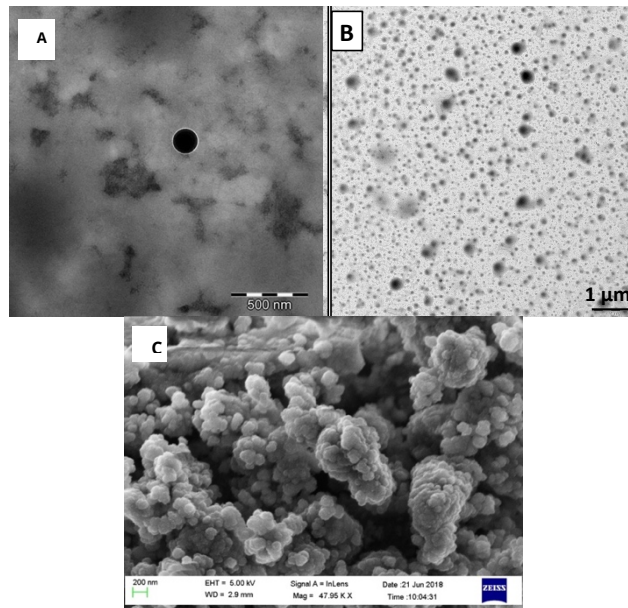


Figura 34. Imágenes correspondientes al método 3. 3A TEM. 3B SEM.

En la imagen de SEM (figura 34C), se pueden apreciar grandes agregados de Nps. Dadas las buenas medidas tanto de tamaño como de carga superficial que se han obtenido y que aparecen recogidos en la tabla 8 y la figura 34 dichos agregados pueden deberse al tratamiento de las Nps para su visualización mediante esta técnica de microscopía electrónica. Pues esto no se observa en las fotografías obtenidas por TEM. En ellas, se aprecian partículas esféricas y con gran homogeneidad en cuanto al tamaño. La imagen 34B se centra en una Nps en solitario en la que no se distingue el halo fruto del recubrimiento como en las Nps sintetizadas según los métodos 1 y 2, lógico dado que en este caso no se ha realizado ningún tipo de recubrimiento.

5.2.3. Estudio del pH

El pH nos indica la concentración de iones hidrógeno H^+ presentes en determinadas disoluciones. Desde nuestro punto de vista tiene una gran importancia su análisis y control debido, por un lado, a la degradación de sustancias en el medio, que crea

inestabilidad, a lo que se añade que muchos fármacos y proteínas son sensibles a la desnaturalización si las condiciones de pH se ciernen en niveles inadecuados para ellos. Por otro lado, nuestro objetivo es una preparación parenteral, esto quiere decir que una vez introducida en el organismo debe guardar un equilibrio y no producir efectos indeseables. En este sentido debemos procurar que su pH sea próximo al fisiológico.

Durante 3 meses se han realizado determinaciones con la intención de estudiar las posibles modificaciones y comprobar la estabilidad de las Nps tras la preparación. Todas las preparaciones se conservaron a 4°C. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 9.

	Tiempo en días					
	1	5	15	40	60	90
Nps Método 1	5,6	5,2	5,2	4,6	4,7	4,9
Nps Método 2	4,3	4,5	4,9	4,7	4,8	4,8
Nps Método 3	8,0	7,9	7,9	7,2	7,1	6,9

Tabla 9. Medidas de pH para las Nps obtenidas para los tres métodos de síntesis.

Los valores obtenidos son muy similares, por lo que podemos concluir que las diferencias de pH a lo largo del tiempo estudiado son pequeñas permaneciendo en unos valores neutros o ligeramente ácidos para los métodos 1 y 2. En el caso del método 3 es el que presenta un pH alcalino que a lo largo del tiempo tiende a disminuir, experimentando un cambio de una unidad entre el valor inicial y final. Todo ello es interesante desde el punto de vista de la estabilidad, pues el pH puede afectar al fármaco en su posterior encapsulación, concretamente a las proteínas con las que se va a trabajar.

5.3. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

La importancia de los estudios de citotoxicidad 'in vitro' radica en evaluar los biomateriales y demás componentes de una preparación, obteniendo información acerca de su biocompatibilidad. En nuestro caso, una vez diseñadas las Nps, es fundamental conocer como éstas interaccionarán con los tejidos vivos. El objetivo y justificación de este estudio, reside en analizar la toxicidad que pueden presentar en el organismo vivo mediante la evaluación del número de unidades celulares vivas a lo largo del tiempo de contacto con las Nps. Como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, el estudio de citotoxicidad consiste en medir la absorción que presentan las distintas muestras a lo largo del tiempo y en presencia de distintas concentraciones de Nps. En primer lugar, se analizarán las Nps de hialuronato sódico obtenidas con los métodos 1 y 2 dado que comparten gran parte de materiales tanto en su preparación como en los recubrimientos. Posteriormente, se analizarán las Nps lipídicas obtenidas utilizando el método 3. La viabilidad de las células es expresada mediante el porcentaje comprendido entre el promedio de células existentes y el promedio de células control.

5.3.1. Métodos 1 y 2

Siguiendo la descripción del apartado 4.2.1. se utiliza la misma nomenclatura para los distintos tipos de Nps.

El proceso a seguir fue descrito en el apartado métodos (4.2) y a continuación se presentan los resultados a los diferentes tiempos de estudio (4, 24 y 48 horas).

La figura 35 y la tabla 10 representan los valores obtenidos para el ensayo a las **4 horas** para cada una de las muestras con las diferentes diluciones (dln) realizadas:

- Dln 1: Muestra original sin diluir.
- Dln 1/5: Muestra original diluida una quinta parte.
- Dln 1/10: Muestra original diluida una decima parte.

En el caso del método 1 se corresponde con:

Dln 1: 0,2 mg/mL Dln 1/5: 0,04 mg/mL Dln 1/10: 0,02 mg/mL

En el caso del método 2 se corresponde con:

Dln 1: 2 mg/mL Dln 1/5: 0,96 mg/mL Dln 1/10: 0,48 mg/mL

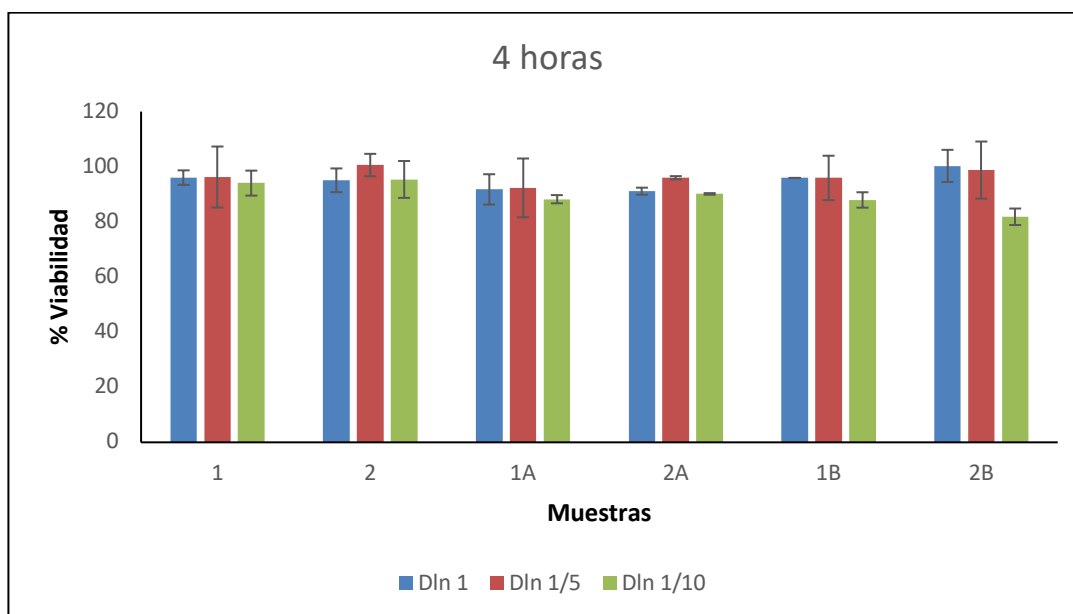


Figura 35. Comparación gráfica de las distintas muestras con sus correspondientes diluciones a las 4 horas.

MUESTRA	DLN 1	DLN 1/5	DLN 1/10
1	96,03 ± 2,64	96,24 ± 11,07	94,04 ± 4,53
2	95,06 ± 4,30	100,58 ± 4,07	95,37 ± 6,69
1A	91,76 ± 5,50	92,31 ± 10,66	88,20 ± 1,49
2A	91,12 ± 1,27	95,99 ± 0,58	90,11 ± 0,29
1B	95,92 ± 0,02	95,92 ± 8,06	87,93 ± 2,79
2B	100,28 ± 5,83	98,76 ± 10,36	81,83 ± 2,99

Tabla 10. Resultados obtenidos para las distintas diluciones de las muestras a las 4 horas.

Se puede observar que todos los valores obtenidos son muy similares, aunque prácticamente todos se encuentran por debajo del valor del control con la salvedad de la muestra 2B que se corresponden con las Nps del método 2 con el recubrimiento lipídico y sin diluir. Las Nps sin recubrir son las que muestran los valores más altos de % de viabilidad, en cambio las muestras con el primer recubrimiento de quitosán son las que presentan los valores más bajos para volver a incrementarse ligeramente su viabilidad cuando son sometidas al recubrimiento lipídico con excepción de la más diluida. Respecto a las diluciones igualmente se pueden apreciar cambios no significativos.

Los resultados obtenidos a las **24 horas** desde el tiempo inicial, se muestran en la siguiente figura 36 y en la tabla 11.

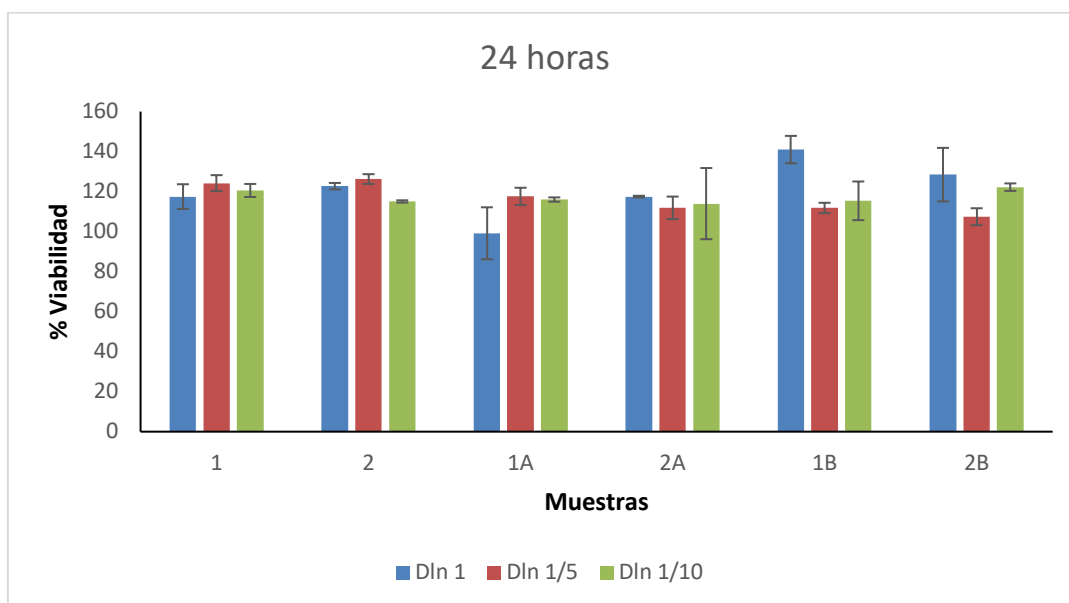


Figura 36. Comparación gráfica de las distintas muestras con sus correspondientes diluciones a las 24 horas.

MUESTRA	DLN 1	DLN 1/5	DLN 1/10
1	117,50 ±6,17	124,22 ±3,99	120,56 ±3,26
2	122,72 ±1,60	126,27 ±2,44	115,07 ±0,57
1A	99,15 ±12,98	117,58 ±4,33	116,04 ±1,07
2A	117,48 ±0,43	111,87 ±5,64	113,99 ±17,79
1B	141,00 ±6,85	111,81 ±2,59	115,39 ±9,66
2B	128,47 ±13,38	107,43 ±4,23	122,22 ±1,87

Tabla 11. Resultados obtenidos para las muestras a las 24 horas.

En este caso, todos los valores con excepción de los obtenidos para la muestra 1A se encuentran por encima del control. Los incrementos de la viabilidad se pueden relacionar con una mayor multiplicación celular y, por lo tanto, un crecimiento celular. Como en los valores obtenidos a las 4 horas, ocurre algo parecido respecto a la diferencia entre los valores de las muestras sin recubrir y las del primer recubrimiento, pues en la mayoría de los casos parece indicar que con el chitosán los valores son más bajos. Posteriormente, con el recubrimiento lipídico los valores vuelven a incrementarse ligeramente para la mayoría de los casos como ocurría a las 4 horas. Desde la perspectiva de las diluciones realizadas todos los valores son muy similares.

Las medidas realizadas a las **48 horas** se exponen a continuación en la figura 37 y la tabla 12.

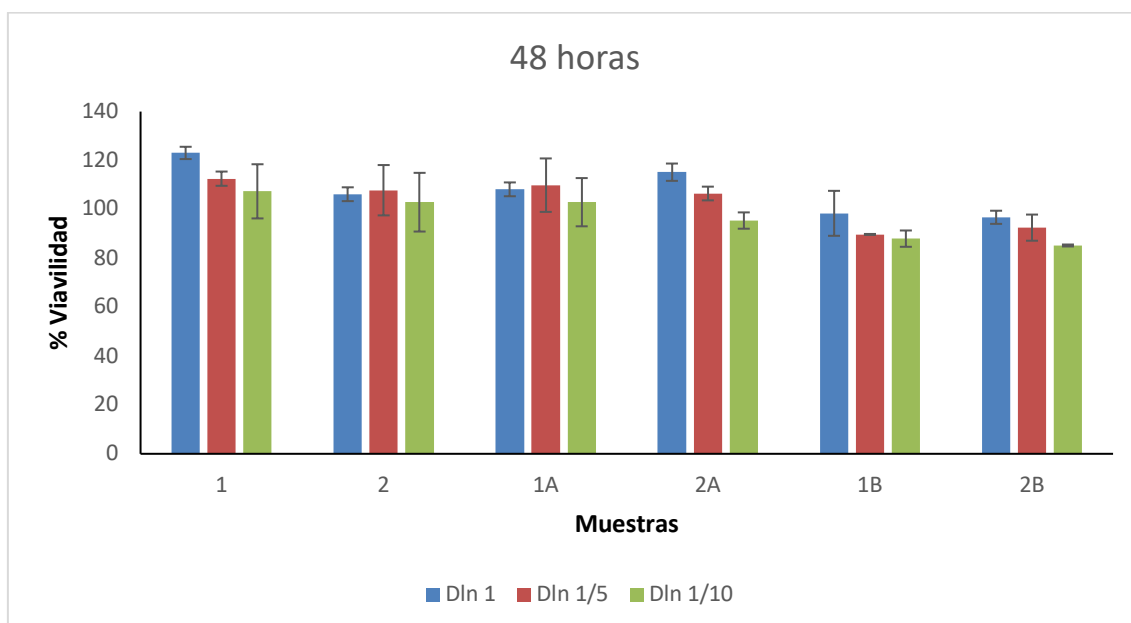


Figura 37. Comparación gráfica de las distintas muestras con sus correspondientes diluciones a las 48 horas.

MUESTRA	DLN 1	DLN 1/5	DLN 1/10
1	123,08 ± 2,51	112,54 ± 2,91	107,37 ± 11,08
2	106,19 ± 2,82	107,82 ± 10,29	102,92 ± 12,00
1A	108,19 ± 2,83	109,89 ± 10,93	102,92 ± 9,86
2A	115,19 ± 3,54	106,48 ± 2,81	95,41 ± 3,34
1B	98,37 ± 9,19	89,74 ± 0,19	88,02 ± 3,33
2B	96,75 ± 2,68	92,51 ± 5,35	85,21 ± 0,40

Tabla 12. Resultados obtenidos para las muestras a las 48 horas.

Al realizar un análisis de los mismos, encontramos un perfil de valores superiores al control, salvo para las Nps con el recubrimiento lipídico, para las que observamos un ligero descenso en la viabilidad. La muestra más concentrada vuelve a presentar los valores más elevados de absorbancia. A medida que aumentamos la dilución a 1/5 y 1/10 los valores disminuyen ligeramente.

Analizando todos estos resultados en conjunto, se puede señalar que los métodos de preparación de las nanopartículas no tienen gran influencia en la posible citotoxicidad de las muestras, ya que han presentado unos valores de viabilidad celular muy similares a lo largo del tiempo. Además, los cambios apreciados en la viabilidad con los recubrimientos han afectado de una manera similar en los dos casos. Igualmente, se han obtenido unos valores próximos a los del control y en algunas muestras incluso superiores por lo que la citotoxicidad general es nula para estas Nps.

En algunos casos incluso el % de viabilidad supera al control, lo que podría explicarse debido a que las células utilizarían el material de obtención de las mismas, para proliferar, nutriéndose de él. La razón de ello podría radicar en la activación del metabolismo celular mediante la hialuronidasa, de esta manera las Nps de hialuronato

disminuirían la citotoxicidad. En trabajos como el de Xu y col. (2017) se estudian Nps de hialuronato comprobando cómo podrían disminuir la toxicidad de las moléculas que transportan, en comparación con las mismas en solitario y de esta forma, mejorar los efectos en muchos casos de los mismos fármacos en el cerebro. Otro problema de toxicidad que se podría presentar al ser partículas lipídicas cargadas positivamente sería que pudieran desestabilizar la membrana endosomal, sin embargo, varios estudios prueban que esto no llega a suceder (Fukishige y col., 2017; Remaut y col., 2007).

En nuestro caso, el tensioactivo utilizado (Tween® 80) también podría aumentar el metabolismo celular de HS como sugiere el trabajo realizado por Sauerová y col. (2017). Todos estos estudios respaldarían la hipótesis de la proliferación celular que presentan algunas muestras analizadas, valores por encima de los controles y que se justifican en la composición de las Nps y el uso como nutriente de las mismas del HS, siendo biocompatible, biodegradable, no tóxico y no inmunogénico y a todo ello podemos añadir que su receptor está expresado ampliamente en las membranas celulares (Dosio y col., 2016).

Si se considera las diluciones de la muestra, las Nps siguen mostrando unos valores similares, pudiéndose apreciar una leve disminución de la absorbancia a medida que se diluye la muestra. Esto avala el punto anterior, al estar más diluidas hay menos HS y menos crecimiento celular.

En cuanto al tiempo transcurrido desde que las muestras se ponen en contacto con las células se puede observar una tendencia hacia el aumento de la viabilidad. En el ensayo realizado a las 4 horas prácticamente todos los datos se encuentran por debajo de la absorbancia media de los de control. Sin embargo, en el ensayo de las 24 horas ocurre lo contrario, pues casi todos los datos son superiores a los que presenta el control. En la última medición a las 48 horas, existen valores por encima y por debajo del control. Las Nps podrían haber sido destruidas y los componentes de las mismas que podría haber utilizado las células para crecer a las 24 horas podrían haber desaparecido en gran cantidad a las 48 horas.

Los resultados obtenidos tanto por el método 1 como el 2 son buenos y nos permiten afirmar que las Nps preparadas no son citotóxicas, por lo que son perfectamente viables para su empleo como transportadoras de la proteína objeto de estudio (NGB).

5.3.2. Método 3

En cuanto al estudio de citotoxicidad con Nps obtenidas utilizando el método 3 se ha seguido la misma metodología, pero en este caso se ha estudiado de una manera separada, ya que estas Nps se han obtenido con componentes y metodología diferentes a las anteriores, siendo sistemas nanoparticulares lipídicos.

En el caso del método 3 los valores de concentración se corresponden con:

Dln 1: 4,8 mg/mL Dln 1/5: 0,96 mg/mL Dln 1/10: 0,48 mg/mL

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 38, y en la tabla 13.

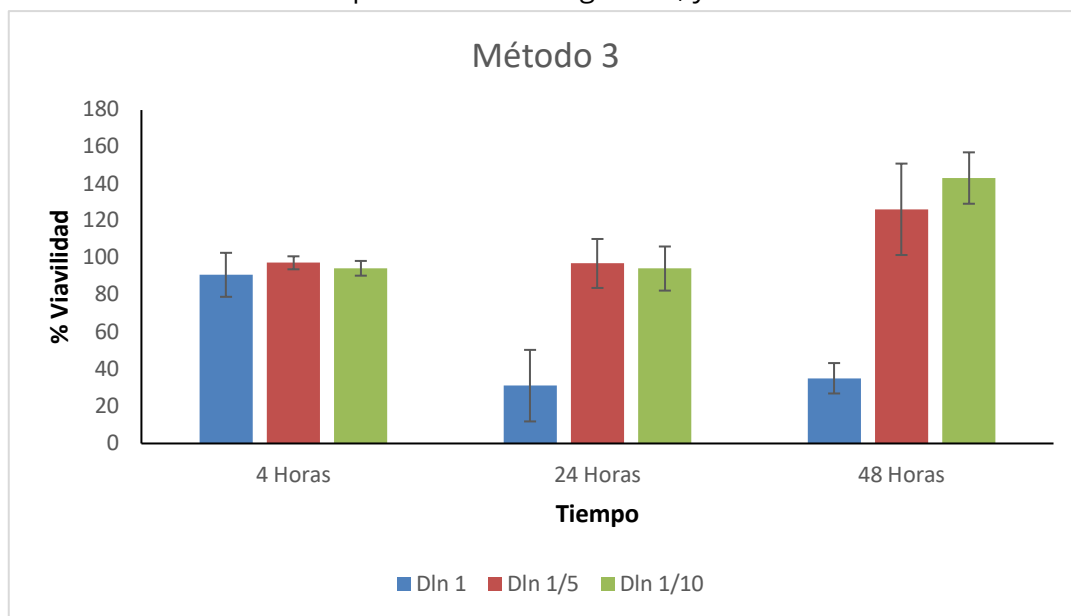


Figura 38. Comparación de las distintas absorbancias para cada dilución a los diferentes tiempos.

	DLN 1	DLN 1/5	DLN 1/10
4 HORAS	91,04 ± 11,88	97,53 ± 19,31	94,57 ± 8,21
24 HORAS	31,21 ± 3,50	97,18 ± 13,21	94,43 ± 24,68
48 HORAS	35,20 ± 3,97	126,41 ± 11,90	143,29 ± 13,87

Tabla 13. Resultados obtenidos para Nps según método 3.

En el análisis de los datos obtenidos se aprecia a las 4 horas unos valores similares para todas las medidas de las muestras. Ninguno de los valores llega a superar al control, pero todos tienen unos valores muy cercanos sin que pueda apreciarse una influencia de la dilución. Sin embargo, a las 24 horas se observa que la muestra sin diluir presenta valores significativamente inferiores al control y al resto de las diluciones. A las 48 horas esta tendencia se mantiene, observándose como las diluciones 1/5 y 1/10 muestran unos valores superiores a los del control, esto no se aprecia en los tiempos anteriores. Por el contrario, se puede observar que la viabilidad celular en presencia de las Nps sin diluir se altera significativamente a las 24 y 48 horas.

Con estos valores se puede contrastar que durante la primera medida la interacción no conlleva ningún tipo de citotoxicidad, sin embargo, transcurridas 24 horas la muestra más concentrada tiene una incidencia sobre el crecimiento celular que desaparece al diluirla. En último lugar, esta incidencia persiste para Dln 1 sobre el crecimiento de las más concentradas persiste, mientras que sus diluciones muestran crecimiento con respecto al control, probablemente debido a que puedan utilizar el material de las Nps y metabolizarlo.

En definitiva, consideramos que las nanopartículas no presentan citotoxicidad significativa. Incluso estudios como el de Serpe y col. (2004) afirman que las Nps lipídicas podrían llegar a disminuir la toxicidad del principio activo que transporten, en caso de toxicidad del mismo.

5.4. ESTUDIO DE PENETRACIÓN DE NPS EN MODELOS ANIMALES

La penetración 'in vivo' de las Nps constituye sin duda uno de los objetivos fundamentales de este trabajo, cuya finalidad última es su empleo con una proteína (NGB) que no tiene capacidad de atravesar la BHE 'per se', pero cuyo objetivo como ya se ha comentado con anterioridad es estudiar un vehículo que sea capaz de atravesar esa BHE y liberar a la proteína objeto de estudio en el lugar donde debe ejercer su acción. Para ello, en esta parte se trataron los animales separando dos grupos: control y tMCAO (Modelo transitorio Oclusión Arteria Cerebral Media). Se decidió inyectar a ambos grupos con Nps del método 1 y 2 sin recubrir (1 y 2) y con el recubrimiento lipídico definitivo (1B y 2B). Además, las Nps correspondientes al método 3 (3) también fueron inyectadas. Todas las preparaciones comentadas fueron marcadas con el fluoróforo rodamina-123 para la identificación de las Nps mediante microscopía confocal e inyectadas en los animales. En la figura 39 se muestran las fotografías de fluorescencia para cada uno de los métodos ensayados.

Las Nps fueron administradas a los animales a través de la vena de la cola 2 horas antes del sacrificio, y se aprecian bajo la microscopía confocal como vesículas rojas debido a la fluorescencia producida por la rodamina. Las secciones histológicas exhiben que todos los tipos de Nps cruzaron la BHE y luego fueron capturadas por las neuronas del parénquima cerebral. De hecho, se aprecian vesículas en el citoplasma de las células neuronales, alrededor de los núcleos y probablemente asociadas con el sistema celular endomembrana. Además, se pueden ver Nps menos fluorescentes al lado de las células endoteliales en el lumen de los vasos y dentro de la pared vascular. Los diferentes receptores de las células endoteliales deben participar en los mecanismos de la transcitosis para permitir que las Nps atraviesen la BHE (Mosquera y col., 2018) (Alyautdin y col., 2014) y sean capturadas por las neuronas. Estos mecanismos deben gestionar el tráfico de Nps dentro del parénquima cerebral y abordar su acumulación preferencial en las células neuronales; en particular, se han descrito diferentes receptores HS, como CD44, Layilin, LYVE-1, HARE / Stab2 o RHAMM en la superficie celular (Weigel, 2017) que probablemente influyen en la penetración de las Nps en las células. En este sentido, es igualmente importante considerar que, de acuerdo con los trabajos de diversos autores, a las cadenas de Tween® 80 presentes en los tres tipos de Nps sintetizadas puede unirse LDL endógeno del plasma y que cuenta con un receptor específico a nivel de BHE (Wohlfarty col., 2012). No obstante, las aclaraciones de tales mecanismos requerirán una mayor investigación no solo 'in vivo' sino también 'in vitro' (Vilella y col., 2015; Alyautdin y col., 2014).

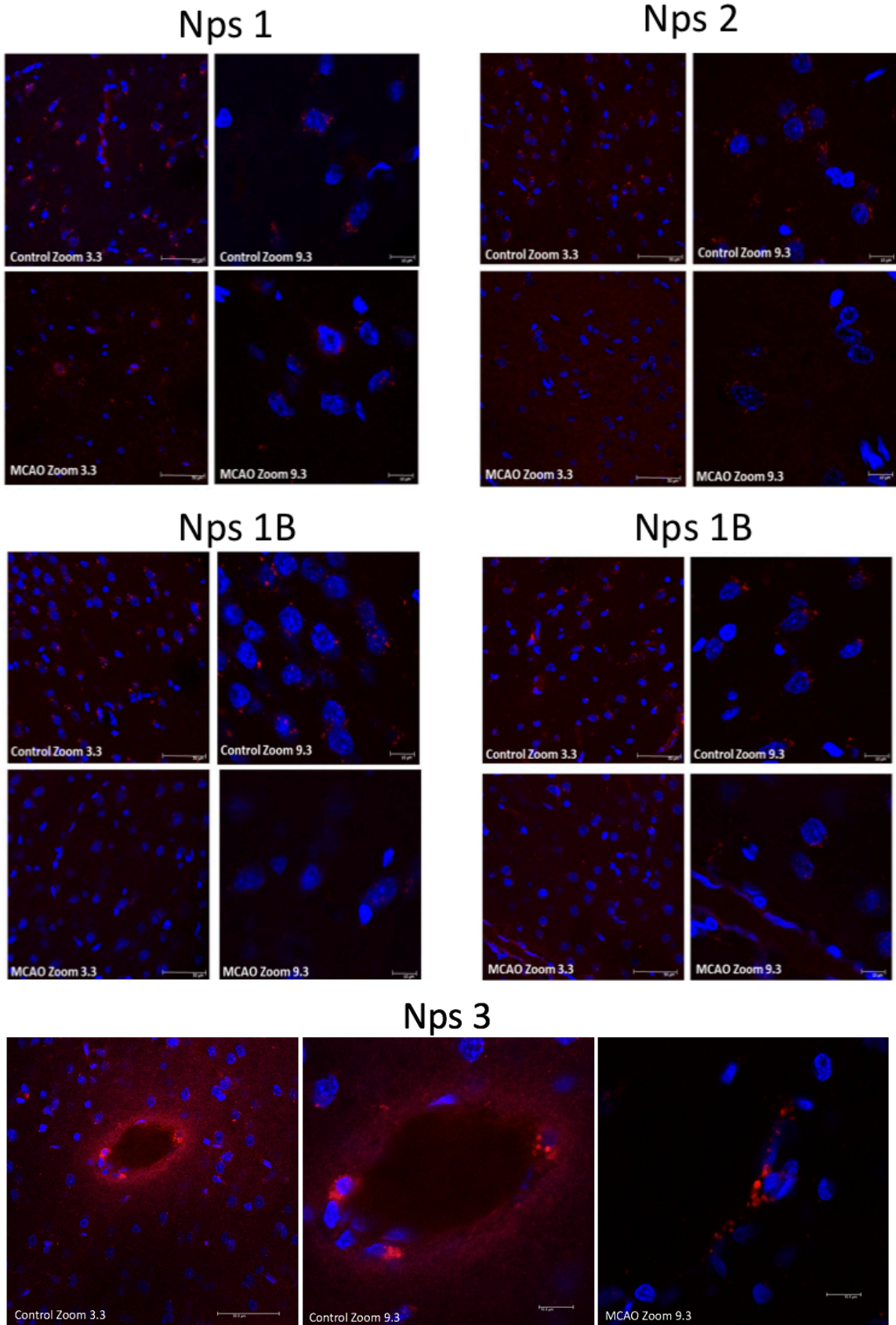


Figura 39. Secciones histológicas de los cerebros, de animales control y tMCAO en el área de la corteza parietal, que muestran las diferentes Nps con rodamina fluorescentes ensayadas y se encuentran ubicadas principalmente en la pared vascular y las neuronas.

En la figura 40 se muestra una estimación de los niveles de gris (niveles de fluorescencia de rodamina) para las Nps correspondientes a todas las muestras ensayadas en el parénquima cerebral de los dos grupos de animales. Para ello, se evaluó en secciones histológicas de los animales de control y tMCAO utilizando el software avanzado Leica AF como se describió anteriormente en el apartado 4.2.9. Los datos se muestran en la figura 40 para todas las Nps de los métodos 1, 2 y 3 analizados (1, 2, 1B, 2B y 3). En ambos grupos de animales las Nps correspondientes al método 2 mostraron una mejor penetración en el parénquima cerebral que las Nps del método 1 y del método 3; este resultado respecto al método 1 debe ser consecuencia de la diferente composición del núcleo de las Nps, que influye en la efectividad de los mecanismos endocíticos. Además, las Nps sin recubrimiento del método 1 y 2 presentan una carga negativa y un tamaño similar, que se sitúa alrededor de 60 nm, también se encuentran dentro de las células, no encontrándose diferencias notables entre los Nps recubiertas y los no recubiertas. Esto puede deberse a que los nanotransportadores recubiertos con carga positiva mejoran la asociación de membrana, la internalización y el escape endosomal, mientras que los no recubiertos, a pesar de su potencial Zeta negativo, tienen una captación más específica y eficiente, particularmente porque se dirigen más fácilmente con ligandos celulares específicos (Vilella y col., 2015; Mosquera y col., 2018; Almalik y col., 2013). Respecto al método 3, es el que valores más bajos de penetración presentó. Finalmente, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos tMCAO en los métodos 1 y 2 es notable, posiblemente porque 2 horas después de un accidente cerebrovascular, la BHE sigue intacta y no ha tenido tiempo suficiente para experimentar cambios en la permeabilidad (Kassner y Merali, 2015). El método 3 es el que presenta valores más bajos de penetración tanto en el grupo control como en el grupo tMCAO.

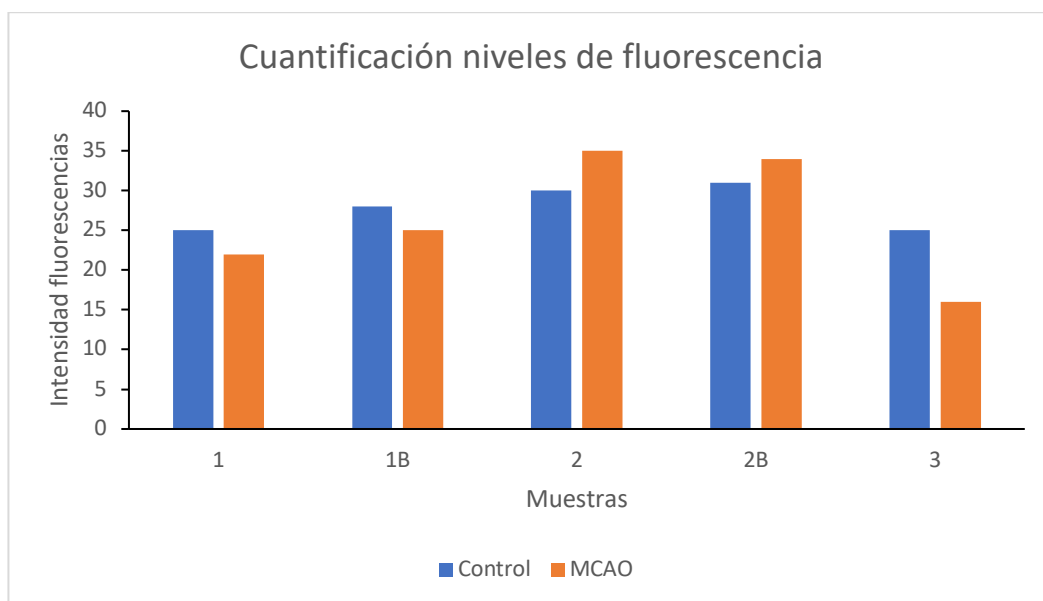


Figura 40. Valor medio de la cuantificación de las diferentes cantidades de Nps con fluorescencia de rodamina ensayados en el parénquima cerebral para los grupos control y tMCAO.

5.5. ESTUDIO DE LOS FÁRMACOS: LAS PROTEÍNAS LISOZIMA Y NGB

La producción de NGB supone un gasto considerable de recursos, los cuales pueden ser mejor gestionados en experimentación, por ello y con el fin principal de disminuir el consumo de NGB optamos por la utilización en unos primeros ensayos de lisozima, ya que se trata de una proteína de características similares, como es su peso molecular y su menor coste. En este apartado ambas proteínas son caracterizadas por HPLC y espectrofotometría. Además, se analizó la estabilidad de la NGB a lo largo del tiempo y la estabilidad que presenta tras el proceso de liofilización.

5.5.1. Lisozima

5.5.1.1. Valoración espectrofotométrica

Se realiza en primer lugar el espectro de absorción de la proteína desde 190 a 500 nm, a una concentración de 0,58 mg/ml en solución acuosa, la figura 41 muestra los resultados obtenidos.

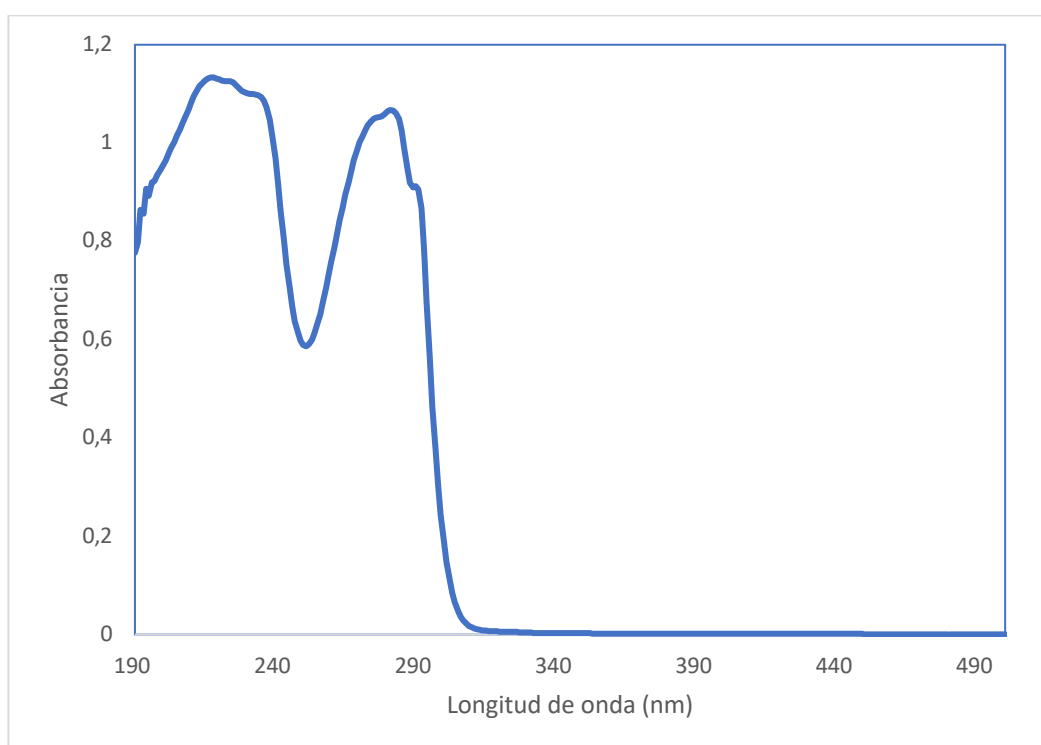


Figura 41. Espectro de Lisozima a una concentración de 0,58 mg/ml.

En esta figura se pueden apreciar varios picos de absorción, pero el mejor para cuantificación es el obtenido a 281nm, dato que coincide con la bibliografía consultada

(Piras y col., 2014). Una vez seleccionada la longitud de onda de máxima absorción se realizan distintas diluciones para la elaboración, de su recta de regresión. Los datos obtenidos, media de tres determinaciones, se muestran en la tabla 14, y la figura 42 recoge los espectros entre 250 y 300nm.

Concentraciones (mg/mL)	Absorbancia (281 nm)
0,5800	1,0670
0,4350	0,8973
0,3262	0,6814
0,2446	0,5010
0,1835	0,3393
0,1376	0,2440

Tabla 14. Datos obtenidos para la elaboración de la recta de regresión

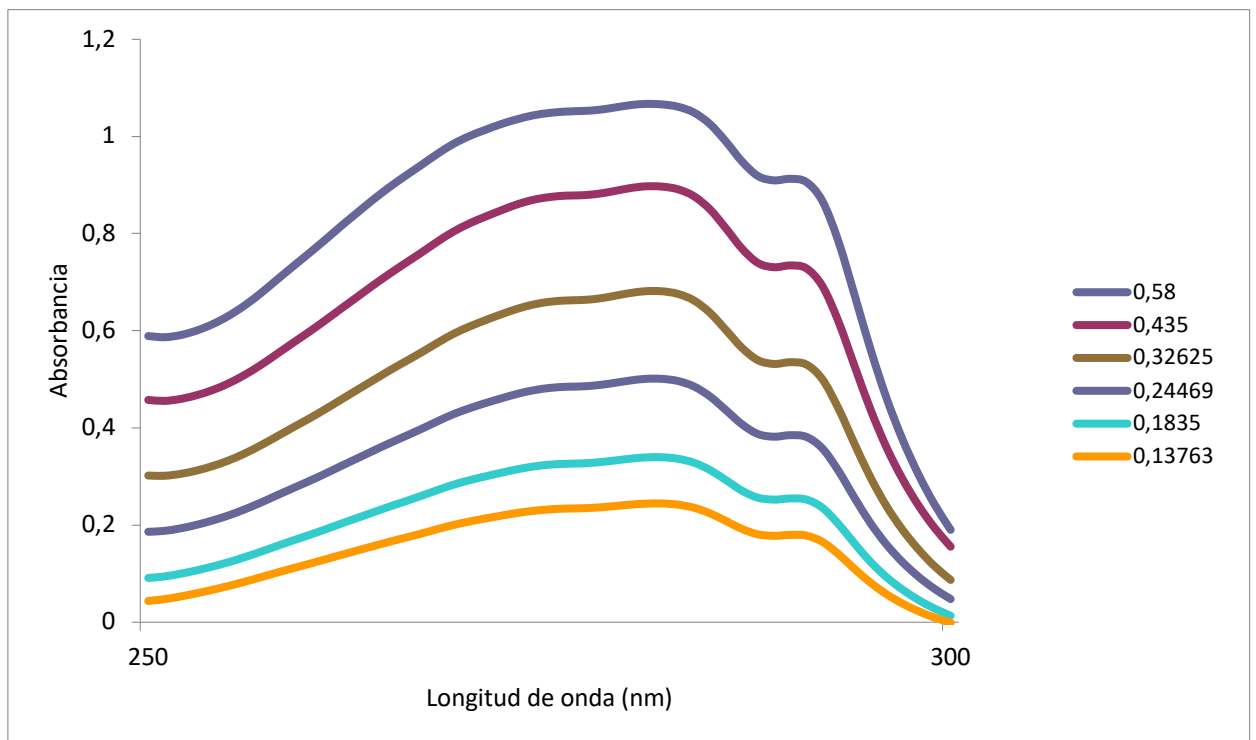


Figura 42. Espectros de lisozima entre 250-300nm para las distintas concentraciones empleadas.

Tomando los valores obtenidos para la longitud de onda de máxima absorción, se elabora la recta de regresión (figura 43).

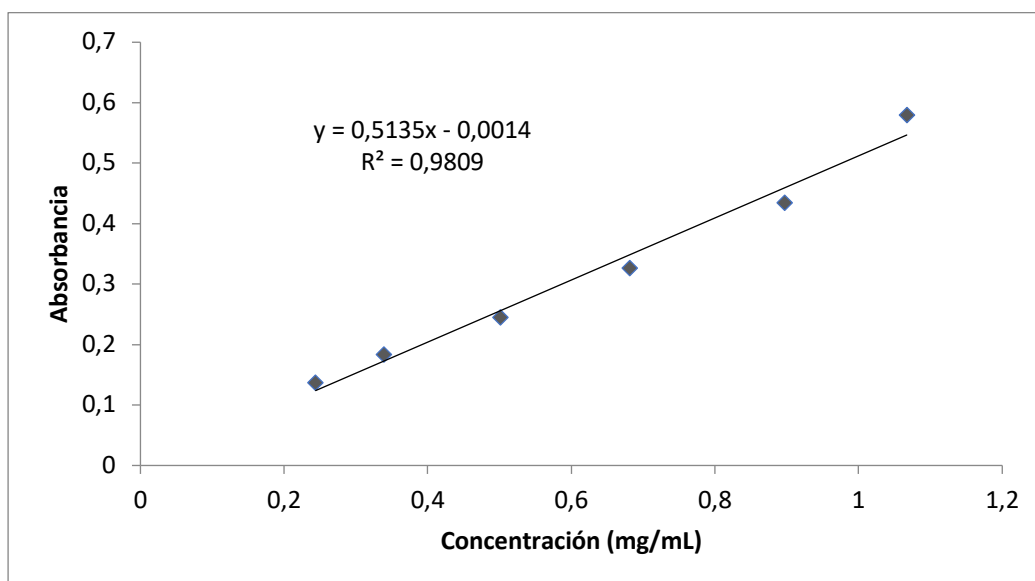


Figura 43. Recta de regresión de lisozima obtenida por espectrofotometría.

Con la validación del método analítico se pretende demostrar, de forma documentada, que dicho método es fiable dentro de unos intervalos definidos. Por tanto, hemos procedido a su validación para la longitud de onda seleccionada. El resultado ha sido un método preciso, exacto y lineal para el rango de concentraciones estudiadas (0,13-0,58 mg/mL).

5.5.1.2. Valoración por HPLC

De igual manera se procedió al análisis de la lisozima por HPLC. En la siguiente figura (fig. 44) se presenta el cromatograma de la misma, observándose al tiempo de 2,44 minutos la separación del pico correspondiente a la lisozima.

La figura 45 muestra la recta de regresión obtenida utilizando este método de análisis.

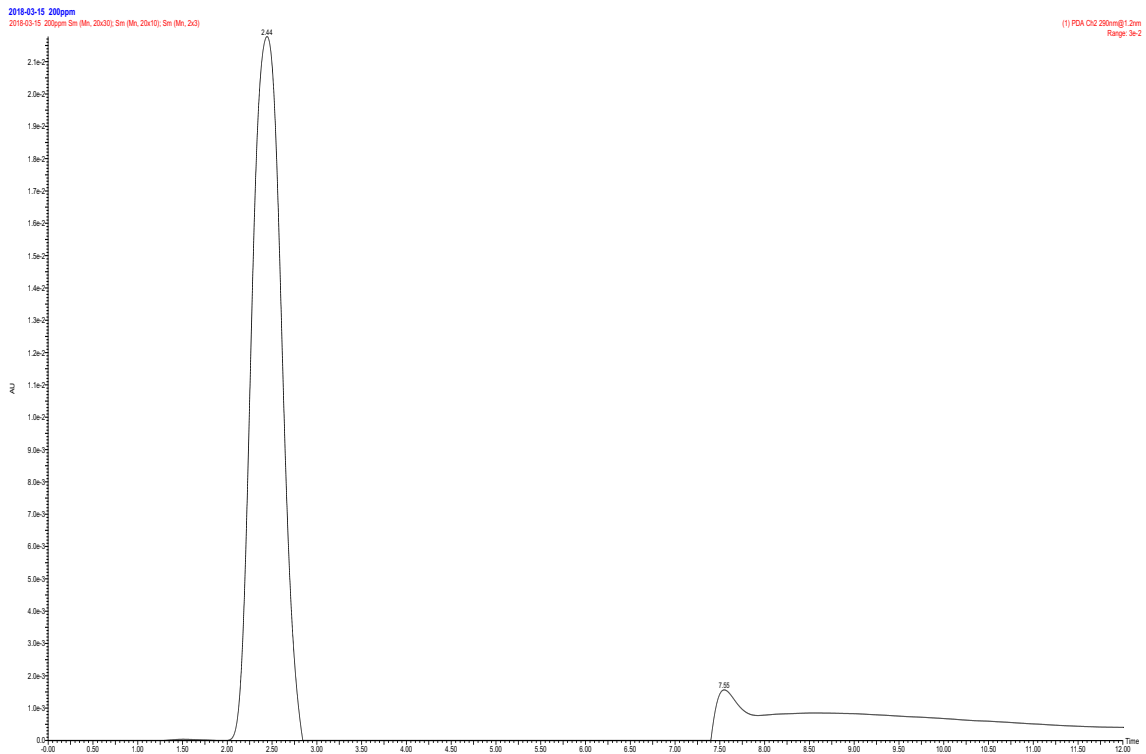


Figura 44. Cromatograma Lisozima.

Se obtuvo, con el mismo método la recta de calibrado para la lisozima ($y = 103,371x - 293,281$) con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,999314$, utilizada para determinar las correspondientes concentraciones de fármaco.

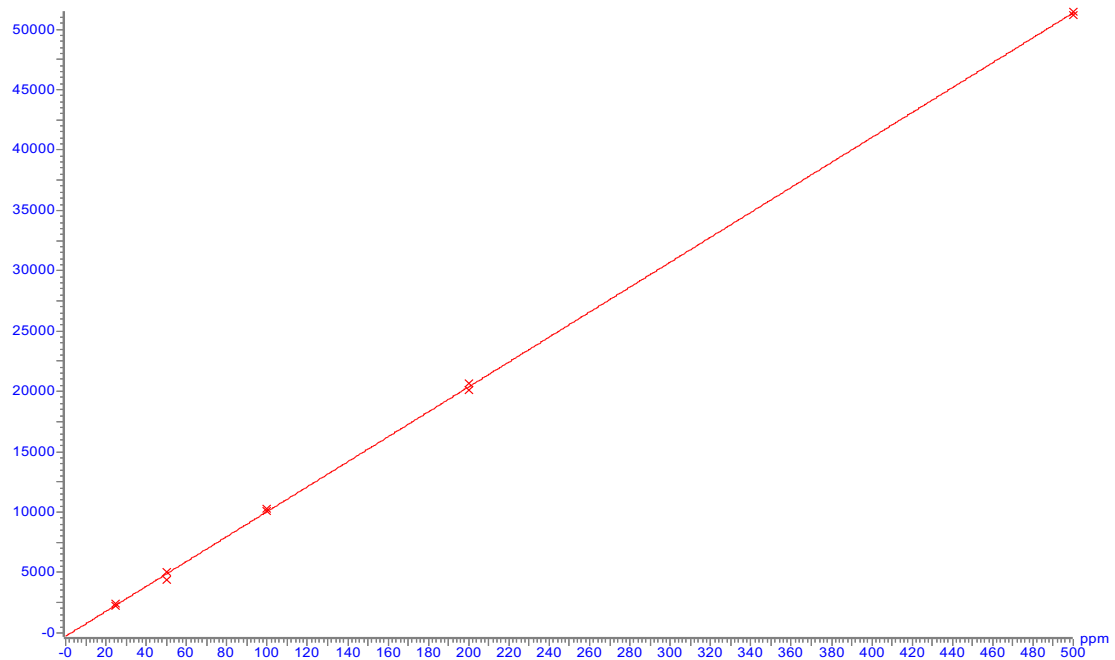


Figura 45. Recta calibrado Lisozima obtenida por HPLC

5.5.2. Neuroglobina

5.5.2.1. Valoración espectrofotométrica.

En primer lugar, se obtiene el espectro de absorción de la proteína realizando un barrido de 190 a 450 nm, a una concentración de 1mg/mL (figura 46).

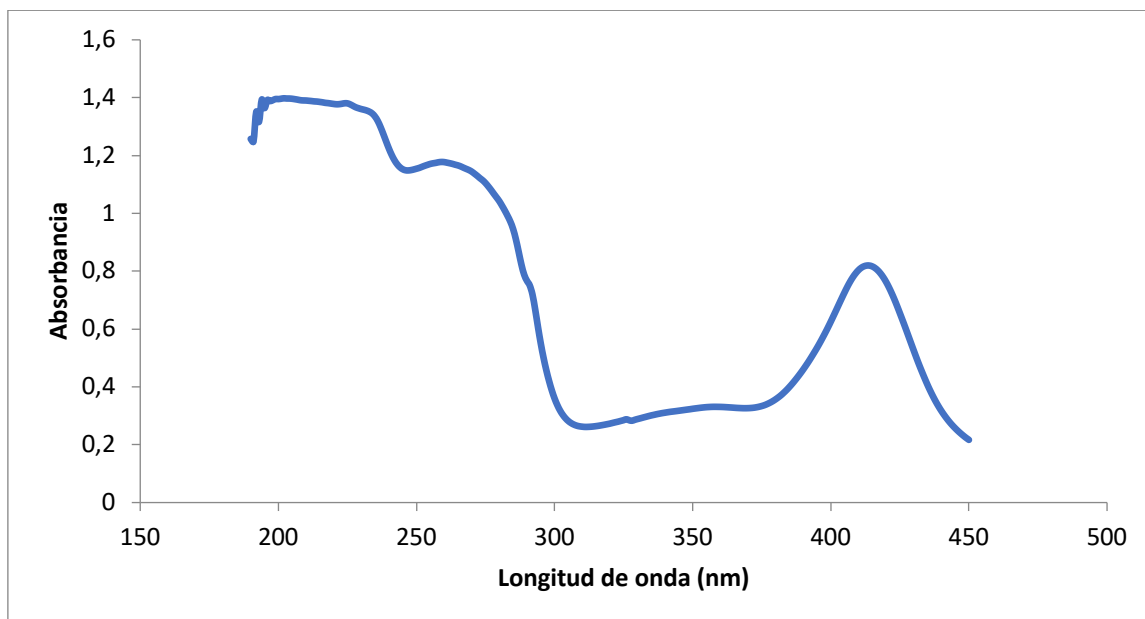


Figura 46. Espectro de la NGB a una concentración de 1mg/mL.

La figura 46 muestra varios picos de absorción, pero sin duda es a 413nm el más significativo, siendo esta longitud de onda la que tomaremos para realizar la recta correspondiente, tras la preparación de distintas diluciones (tabla 15). Todas las medidas fueron realizadas por triplicado y se utilizaron para comprobar que el presente método analítico es lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas (0,056-1 mg/mL).

Concentraciones (mg/mL)	Absorbancia (413 nm)
1,0000	0,81951
0,7500	0,64813
0,5625	0,4991
0,4219	0,40123
0,3164	0,28855
0,2373	0,20518
0,1778	0,14287
0,1335	0,09573
0,1001	0,06327
0,0751	0,04276
0,0563	0,02457

Tabla 15. Datos obtenidos para la representación de la recta de regresión.

En la figura 47 se muestran los espectros obtenidos para las distintas concentraciones ampliando la zona entre 360 y 450 nm.

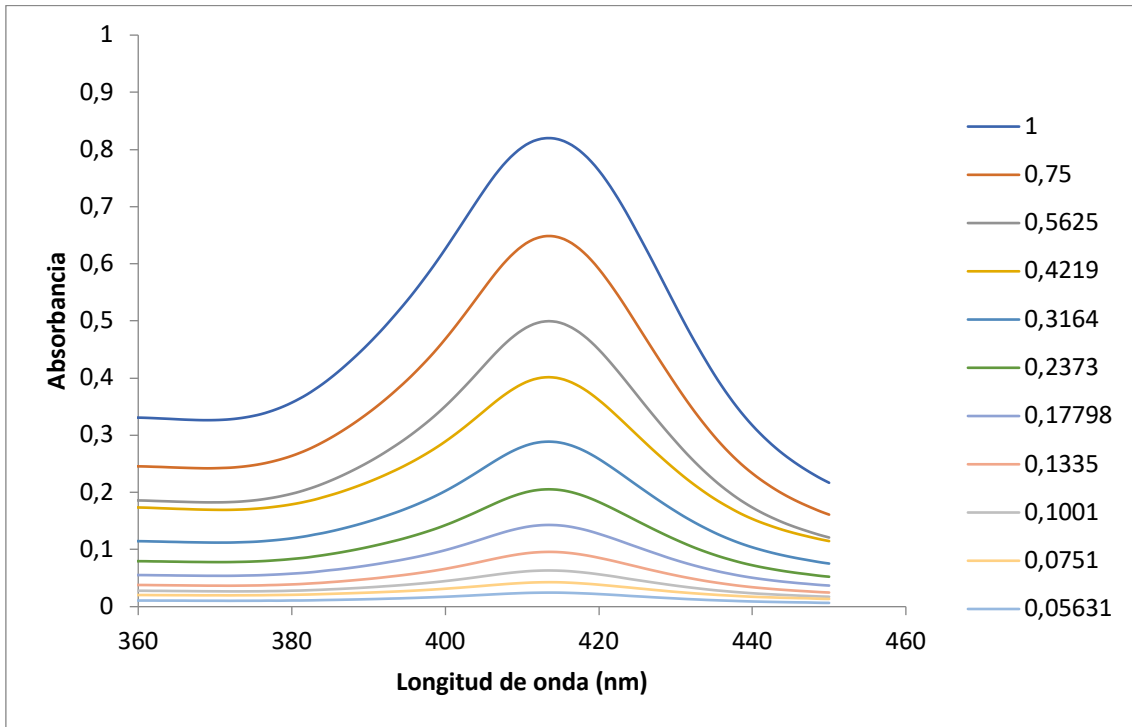


Figura 47. Espectros de absorción entre 360 y 450nm para distintas concentraciones de NGB

Con estos valores se obtiene la recta de regresión. En la figura 48 se plasma la recta obtenida, su ecuación y el coeficiente de correlación.

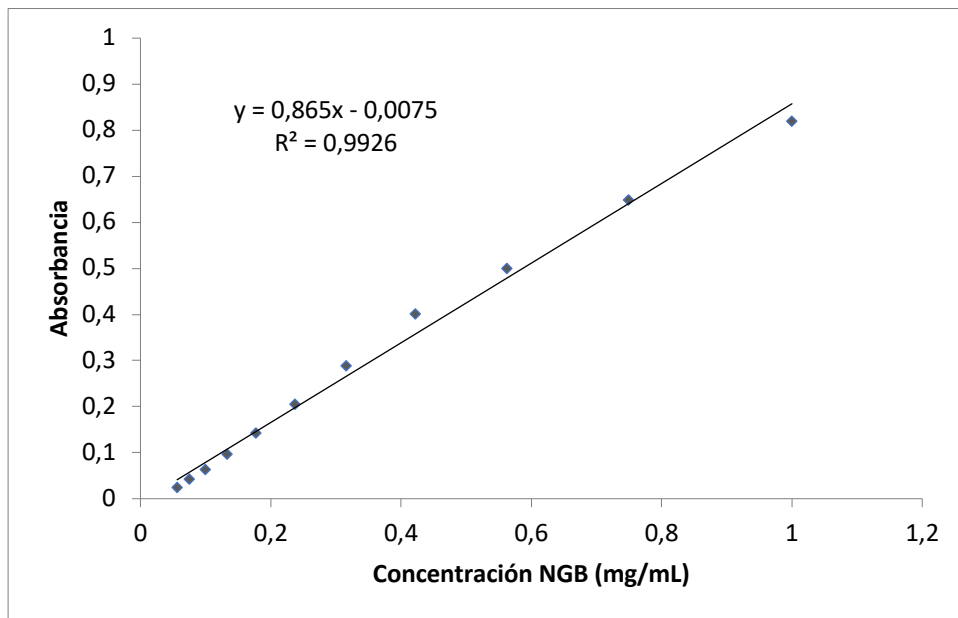


Figura 48. Recta de regresión NGB, obtenida a la λ de 413 nm

De la misma manera que con la lisozima, se realiza la validación del método analítico se pretende demostrar, de forma documentada, que dicho método es fiable dentro de unos intervalos definidos. Por tanto, hemos procedido a su validación para la longitud

de onda seleccionada de 413 nm. El resultado ha sido un método preciso, exacto y lineal para el rango de concentraciones estudiadas (0,05-1 mg/mL).

5.5.2.2. Valoración por HPLC

Se procedió a la realización de la valoración de NGB mediante HPLC (figura 49).

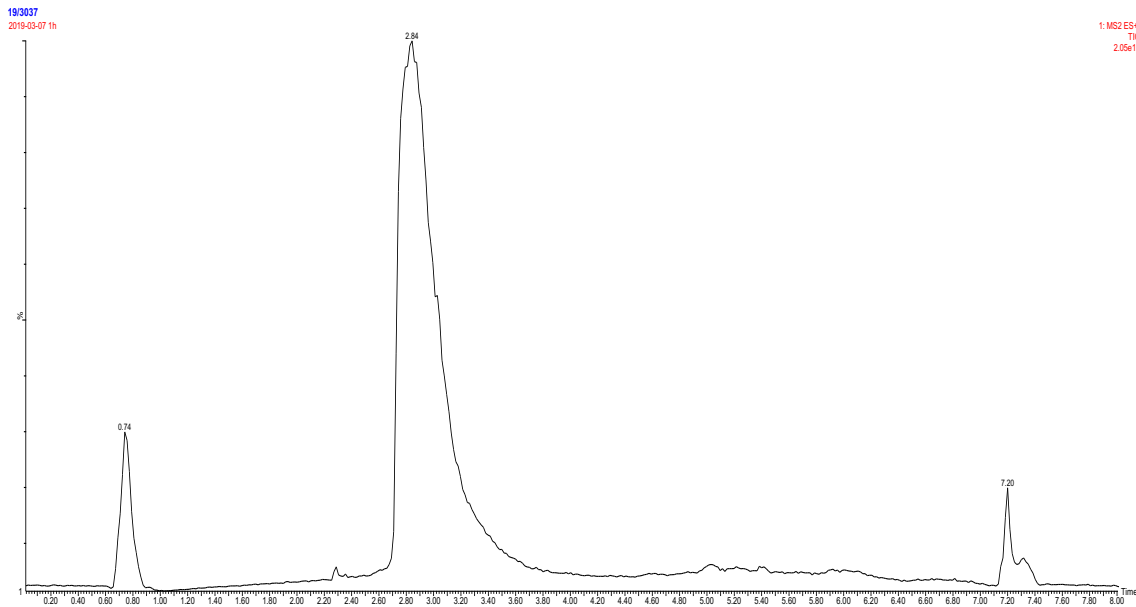


Figura 49. Cromatograma NGB

En el cromatograma obtenido, se puede observar el pico de 2,84 minutos, en el cual se corresponde con el patrón de la proteína. Este pico se corresponde con la proteína tanto por el análisis del patrón como por los datos obtenidos en la caracterización por espectrometría de masa. La figura 50 muestra la recta de calibrado obtenida, $y = 13,7803x + 362,858$, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,999712$.

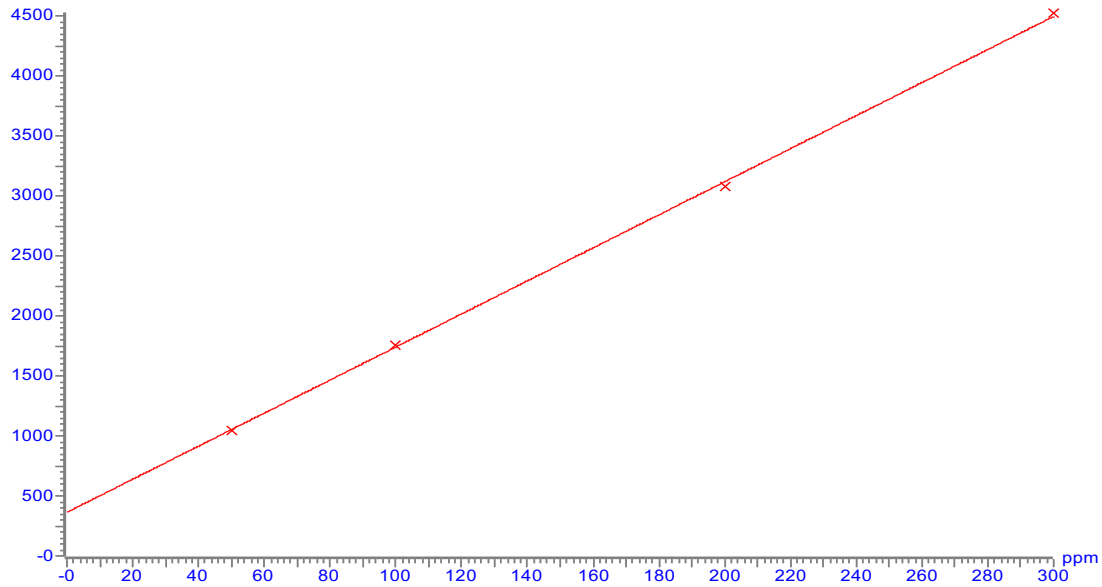


Figura 50. Recta de calibrado NGB obtenida por HPLC.

A la vista de todos estos resultados la espectrofotometría nos ofrece una manera rápida de medir las concentraciones en el laboratorio, pero carece de la precisión y sensibilidad del HPLC. A la hora de preparar nuestras nanopartículas con proteína, las concentraciones a detectar de la misma serán muy reducidas por lo que en los ensayos y estudios realizados optaremos por HPLC como método preferente a la hora de obtener datos de concentración de las muestras analizadas.

5.5.2.3. Estabilidad de NGB

Se pensó que era importante ver la estabilidad que presentaba NGB en distintas condiciones, de esta forma se estudió su conservación en frío, a una temperatura de 6°C durante 3 meses y también su estabilidad tras ser sometida al proceso de liofilización. Para el estudio de las muestras en frío se prepararon diferentes alícuotas de una solución de NGB, con una concentración inicial de 0,6mg/mL. La tabla 16 muestra los resultados obtenidos, media de 3 determinaciones, utilizando como método de valoración la espectrofotometría.

Tiempo (Días)	% NGB perdida
0	0,00%
7	0,36%
15	3,70 %
30	5,45 %
60	16,32 %
90	23,97 %

Tabla 16. Porcentaje de NGB perdida a lo largo de 3 meses.

Como se puede observar, durante los 3 meses de duración del experimento se aprecia una pérdida importante de la NGB mantenida en el frigorífico, llegando a casi el 25% al final del periodo de estudio.

Con el fin de mejorar la estabilidad de la NGB en el tiempo, se pensó en la formulación extemporánea como una posible solución, para ello la liofilización fue elegida como el mejor método, tanto por su accesibilidad como por su coste y frecuente uso con proteínas. La NGB fue liofilizada en las condiciones descritas en el apartado 4.2.10.

Los resultados obtenidos nos confirmaron que tras ser sometida a liofilización se produce una pequeña pérdida de NGB, aproximadamente un 5%. Durante todo el tiempo de ensayo (30 días) apenas se produjeron modificaciones no observándose variaciones significativas en el polvo liofilizado respecto al valor inicial. Es por ello que consideramos que con la liofilización se mantiene estable la proteína.

Finalmente, es interesante considerar la importancia del pH en la estabilidad de la NGB. De esta manera, según Chao y col. (2006), la estabilidad óptima de NGB se sitúa aproximadamente sobre un pH de 7. En el caso de acidificación del medio se produce una pérdida ligera de la concentración de proteína. Así a un pH de 2,1 la concentración de NGB se reduce en un 28,4%. En nuestro caso, la dispersión de nanopartículas de HS oscila cerca de un pH de 5, y las Nps lipídicas sólidas en torno a 7, pudiendo comprometer la estabilidad de la proteína sólo en las primeras.

Por último, comentar que de acuerdo al trabajo de Chao y col. (2006), ya citado anteriormente, la mayor pérdida de proteína se produce cuando el medio se vuelve más básico, así a pH de 9,01 la concentración se ve reducida en un 32,4%. Esto nos hace concluir que, aunque NGB presenta una aceptable estabilidad, su degradación es más favorable en medio alcalino que en ligeramente medio ácido, como el que presenta nuestra dispersión de Nps.

5.6. ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN 'IN VITRO' DE LISOZIMA

5.6.1. Encapsulación Lisozima

La eficiencia de encapsulación es un parámetro fundamental en el ámbito de la nanotecnología, ya que pone de manifiesto el rendimiento del proceso de encapsulación en sí mismo, íntimamente relacionado con la naturaleza de las partículas, el método de síntesis y las características fisicoquímicas del fármaco a encapsular. La eficiencia de encapsulación debe ser lo suficientemente alta para minimizar la cantidad de fármaco utilizado en la elaboración de los sistemas; siendo, además, necesario lograr una dosis que haga posible el efecto terapéutico del principio activo.

Como se describió previamente, se utilizó en primer lugar lisozima, como proteína modelo. Para ello se realizaron síntesis de Nps en presencia de diferentes concentraciones de proteína y utilizando los diferentes métodos de síntesis ya descritos. Como técnica de valoración de lisozima, hemos recurrido tanto a la espectrofotometría como al HPLC, siendo más precisa como era de esperar y computamos el HPLC. Aun así, todos los procesos realizados fueron medidos por las dos técnicas, encontrando en todos los casos resultados muy parecidos. En la figura 51 se muestran los diferentes porcentajes de encapsulación en los tres métodos de preparación que se están estudiando en función de la concentración de proteína. La tabla 17 recoge los resultados numéricos para las mediciones realizadas.

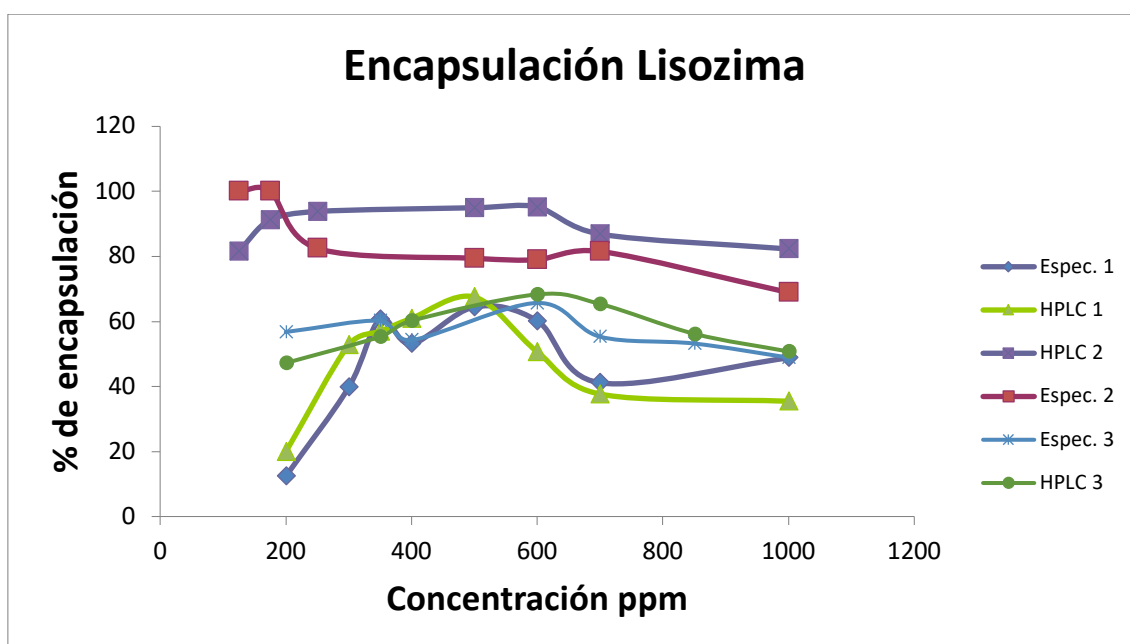


Figura 51. Porcentaje de lisozima encapsulada en función de la concentración.

Se puede observar cómo, en el método 1, conforme se incrementa la concentración inicial de fármaco presente en el medio, aumenta también el porcentaje de encapsulación hasta 600ppm, siendo muy similares los datos obtenidos tanto por HPLC como por espectrofotometría, sobre todo entre 300-600ppm. A partir de esa concentración disminuye el % de encapsulación. Igualmente hay que señalar las dificultades de solubilización de la lisozima en este método, cuando trabajamos a concentraciones superiores a 600ppm, a pesar de encontrarnos por debajo de su concentración a saturación. Posiblemente se deba a la presencia de polímeros en el medio.

Método	Concentración (ppm)	% Encapsulado Espectrofotometría	% Encapsulado HPLC
1	200	12,4± 2,10	19,90± 4,44
	300	39,73± 2,23	52,75± 5,65
	350	60,62± 6,5	56,93± 7,01
	400	53,17± 5,7	60,94± 5,36
	500	64,47± 7,12	67,52± 4,56
	600	60,18± 6,23	50,69± 5,81
	700	41,13± 7,11	37,67± 9,01
	1000	48,81 ±4,56	35,46± 6,73
2	125	100± 10,11	81,51± 8,88
	175	100± 9,12	91,27± 7,67
	250	82,49± 7,77	93,84± 4,56
	500	79,42± 6,43	94,98± 11,33
	600	78,98± 3,95	95,23± 7,23
	700	81,56± 6,32	86,88± 2,79
	1000	68,91± 6,55	82,3± 8,66
	3	200	56,77± 4,74
350		60,22± 2,34	55,33± 5,12
400		54,30± 3,54	60,22± 7,65
600		65,70± 6,43	68,34± 4,54
700		55,32± 4,23	65,4± 5,44
850		53,21± 7,66	56,21± 5,56
1000		48,91± 6,08	50,76± 3,48

Tabla 17. % de encapsulación de lisozima para los diferentes métodos.

Respecto al método de síntesis 2, a bajas concentraciones existe una encapsulación próxima al 100%, a partir de los 300 ppm se aprecia una ligera disminución de dicho parámetro. La curva de encapsulación va disminuyendo, pero muy levemente manteniéndose valores altos en todos los casos con este método y siendo el método que mejores resultados presenta.

Los métodos 1 y 3 presentan un patrón muy similar con las diferentes concentraciones de proteína en el medio. En estos métodos los mejores resultados de encapsulación se encuentran en torno a los 500 - 600 ppm, con un valor de aproximadamente el 60-65%, para posteriormente disminuir ligeramente según aumenta la concentración.

Tras el análisis de estos resultados, se puede concluir que para la lisozima el mejor método de encapsulación es el segundo, y que durante todo el margen de concentraciones estudiadas los valores presentados de eficiencia de encapsulación son elevados.

5.6.2. Liberación de lisozima

Un patrón de liberación de fármacos es un parámetro crucial para cualquier portador de administración de fármacos, incluidas las nanopartículas. En la mayoría de los casos, los polímeros y los materiales utilizados para el recubrimiento condicionarán la tasa de liberación de los fármacos como se informó anteriormente (Nayak, 2011). En esta simulación 'in vitro' se trata de estudiar la liberación de la proteína en condiciones parecidas a las que las Nps pueden encontrar en el organismo. Con esta finalidad, utilizamos el método de diálisis descrito previamente en el apartado 4.2.14, utilizando como control las Nps sin lisozima y realizando el análisis de cada muestra por triplicado de acuerdo con los intervalos de tiempo fijados previamente.

La figura 52 muestra el % de lisozima liberado por los 3 sistemas objeto de estudio a lo largo de 72 horas.

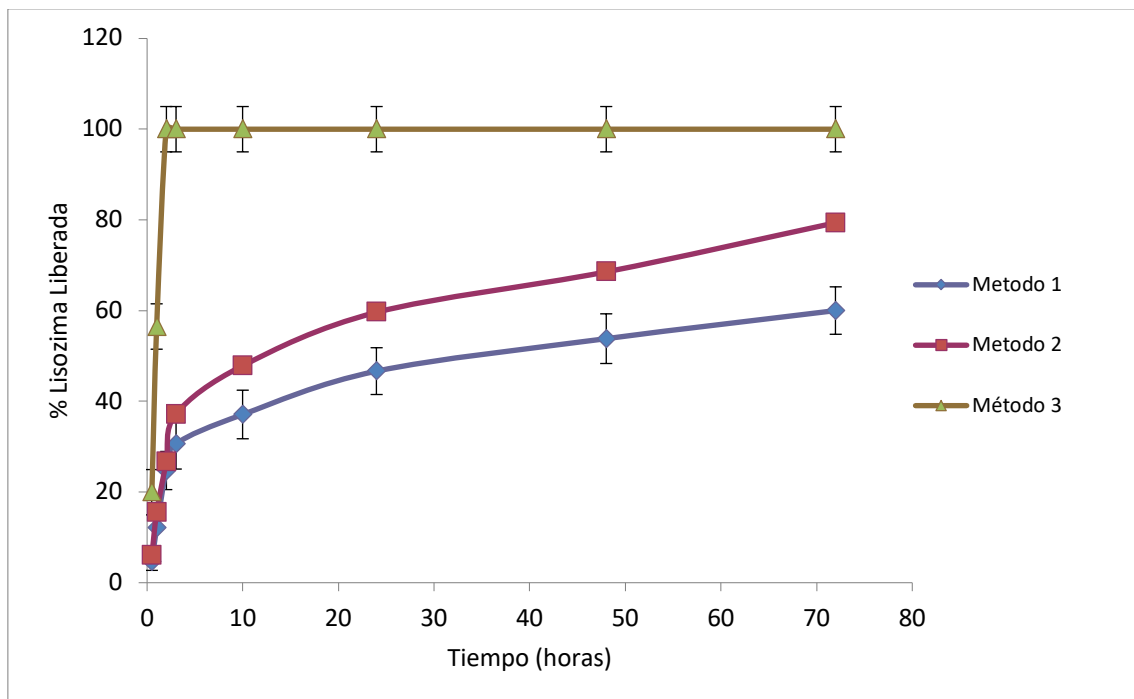


Figura 52. Porcentaje de lisozima liberada a lo largo del tiempo.

TIEMPO (HORAS)	MÉTODO 1 - % LIBERADO	MÉTODO 2 - % LIBERADO	MÉTODO 3 - % LIBERADO
0,5	4,59 ±1,86	6,02 ±0,75	19,95 ±1,88
1	12,12 ±0,06	15,43 ±0,94	56,49 ±1,99
2	24,73 ±4,20	26,62 ±1,39	100 ±6,90
3	30,57 ±5,50	37,11 ±1,15	100 ±6,38
10	37,09 ±5,35	47,84 ±1,52	100 ±6,50
24	46,65 ±5,15	59,63 ±0,13	100 ±6,94
48	53,81 ±5,49	68,54 ±0,27	100 ±6,06
72	60,01 ±5,20	79,37 ±1,45	100 ±5,25

Tabla 18. Porcentaje de lisozima liberada para cada método.

Analizando las diferentes curvas para los diferentes métodos, se puede observar en primer lugar, que el método 3 da lugar a una liberación completa de fármaco transcurridas 2 horas del inicio del ensayo y, sin embargo, las nanopartículas de acuerdo a los métodos 1 y 2 muestran unas curvas de liberación más sostenidas en el tiempo, llegando al cabo de 72 horas a no liberar la totalidad de la proteína vehiculizada. De hecho, el método 1 llega a alcanzar aproximadamente un máximo del 60% de liberación y el método 2 del 80% aproximadamente. Aunque durante las 3 primeras horas del estudio los porcentajes liberados son similares, transcurridas 10 horas de ensayo es el método 2 el que muestra mayores porcentajes de fármaco cedido. Las nanopartículas lipídicas liberan todo el fármaco que vehiculizan transcurridas 2 horas.

5.6.2.1 Cinéticas de liberación

Los datos experimentales de liberación de lisozima se han analizado de acuerdo con una cinética de orden cero, primer orden y los modelos de Higuchi y Hixon-Crowell. La tabla 19 muestra los valores obtenidos tras el ajuste matemático a cada uno de los modelos antes mencionado, en concreto, la constante de velocidad (K), el coeficiente R² y el valor del criterio discriminatorio de Akaike (AIC) tras el correspondiente análisis estadístico realizado utilizando el programa Microsoft Excel 2019. La función con el menor valor AIC presentado y el valor de R² más próximo a 1, explicará mejor el proceso de liberación.

	Orden cero			Primer orden			Higuchi			Hixon-Crowell		
	Q _t = kt			ln (1- Q _t) = kt			Q _t = kt ^{1/2}			Q _t ^{1/3} = kt		
Muestra	k	R ²	AIC	k	R ²	AIC	k	R ²	AIC	k	R ²	AIC
M 1B	14,15	0,740	50,43	0,042	0,230	48,15	135,05	0,900	44,34	0,13	0,943	50,04
M 2B	14,09	0,749	50,04	0,017	0,240	51,32	134,23	0,912	50,14	0,125	0,941	44,37
M 3	13,41	0,758	49,91	0,016	0,914	49,95	127,19	0,914	51,46	0,122	0,934	44,48

Tabla 19. Cinéticas de liberación para los distintos métodos de elaboración de Nps.

A la vista de los resultados obtenidos, es el modelo de Higuchi el que mejor explica la liberación de fármaco desde las Nps obtenidas de acuerdo con el método de síntesis 1, siendo un proceso que se debe fundamentalmente a la difusión del fármaco desde el interior de las partículas. No obstante, el modelo de Hixon-Crowel presenta una mejor linealidad ($R^2 = 0,943$), aunque un menor valor de AIC, confirmando que las Nps se van erosionando con el tiempo y el fármaco es liberado debido tanto a la difusión como a la erosión de las mismas (Kariminia y col., 2016).

También la cinética de Hixon-Crowell es la que mejor se ajusta a los datos de liberación obtenidos para las Nps 2B y 3. Tanto la erosión como la difusión del fármaco a través de las Nps se justifica por razones geométricas; específicamente cuando las Nps tienen una forma esférica o en presencia de tensioactivos que forman micelas en el seno de la dispersión (Doménech y col., 2013).

5.7. NANOPARTÍCULAS CON NGB

A la vista de todos estos resultados y considerando que nuestro objetivo primordial es la encapsulación de NGB para que pueda atravesar la BHE y liberar allí dicho principio activo, se ha decidido seleccionar el método 2, basado en la gelificación iónica externa en el seno de una emulsión. Este método es el que mejores propiedades, en general, ha presentado tanto en solitario como con la lisozima. Son varias las razones que nos han conducido a esta decisión:

- ✚ Niveles superiores de permeabilidad a través de la BHE.
- ✚ Mejores resultados presentados en encapsulación.
- ✚ Mayor liberación sostenida en el tiempo.
- ✚ Intervalo de pH adecuado para la estabilidad de NGB.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, en el siguiente apartado se llevará a cabo un profundo estudio en el que utilizaremos el método de síntesis 2 con hialuronato de sodio y un doble recubrimiento para la nanoencapsulación de NGB.

En concreto, seguimos el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.3. Una vez preparadas dichas Nps, se procedió a su caracterización mediante los métodos adecuados.

5.7.1. Caracterización de nanopartículas con NGB

La tabla 20 muestra los valores de tamaño obtenidos para las Nps con NGB (NGB-Nps) respecto a las Nps sin fármaco en las mismas condiciones (2B Nps). Se ha observado una disminución en el mismo (tabla 20) debido a la presencia de NGB en el medio, algo posible en la encapsulación mediante gelificación iónica como refieren las investigaciones reportadas por nuestro grupo de investigación (Sánchez y col., 2017; Martin y col., 2013). Esto podría ser beneficioso ya que conseguimos menores tamaños de partícula, lo que podría mejorar la penetración de las Nps a través de la BHE. Además, los valores de polidispersión ponen de manifiesto una mayor uniformidad del sistema, lo que es igualmente beneficioso (figura 53).

	Tamaño medio (nm)	Polidispersión	ζ-Potencial (mV)
NGB-Nps	145,77 ±1,14	0,2628 ±0,0046	27,55 ±1,017
2B Nps	243,16 ±6.02	0,37 ±0.03	17,88 ±2,02

Tabla 20. Comparaciones tamaño, polidispersión y Potencial ζ entre las Nps con y sin proteína.

En cuanto a la carga superficial, también se puede apreciar un aumento en el valor absoluto de potencial ζ de las Nps y que estas siguen siendo positivas. Ambos hechos

contribuyen a la estabilidad física del sistema y a potenciar la interacción con el endotelio de la BHE favoreciendo su internalización a través de la misma.

Se realizaron análisis de las muestras también por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (figura 53).

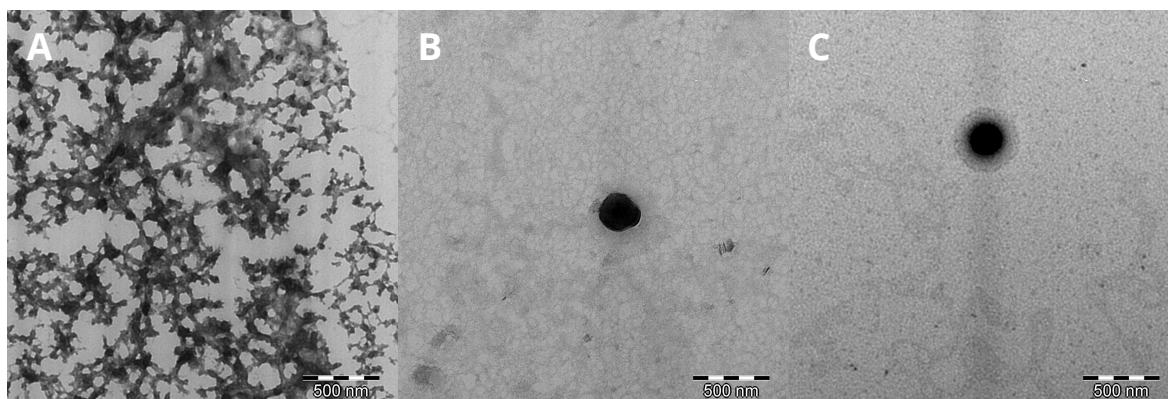


Figura 53. NGB-Nps mediante TEM. A) Campo completo. B y C) NGB-Nps en solitario.

En la figura 53A, se puede observar un campo completo de NGB-Nps, en el que se aprecian puntos oscuros correspondientes con las NGB-Nps. En las figuras 53B y C se aprecian campos seleccionados con Nps en solitario, que ponen de manifiesto la forma esférica de las partículas, además se pone de manifiesto la diferencia entre el núcleo constituido por el hialuronato y el halo debido al doble recubrimiento, más claramente apreciado en la figura 53C.

5.7.2. Estudio de encapsulación

La encapsulación de fármaco es un parámetro fundamental que depende de la dosis de fármaco necesaria, para conseguir el efecto terapéutico deseado. Actualmente no existe ningún estudio que use Nps para administrar NGB a un cerebro isquémico; sin embargo, si existen otras sustancias que han sido utilizadas para este propósito como los vectores virales (Sun y col., 2003) y los péptidos de penetración celular (CPP) (Cai col., 2011). En el caso particular de CPP-NGB, fue administrada en ratones que sufrieron una lesión cerebral después de una hemorragia subaracnoidea, siendo la dosis de fármaco para inyección sistémica de 6 mg por kilogramo (Chen F. y col., 2018); sin embargo, esta dosis e incluso otras más altas han sido aplicadas en los modelos de accidente cerebrovascular (Cai y col., 2011) pareciendo ser demasiado altas (Dietz, 2011). Por lo tanto, se decidió en nuestro estudio utilizar una dosis más baja, para intentar lograr la máxima encapsulación posible, cerca de los valores de uso "in vivo".

En este sentido, los datos obtenidos en el análisis de HPLC son buenos en términos de encapsulación para Nps en general (Shkodra-Pula y col., 2019). La eficiencia de encapsulación presentó valores de $92,37\% \pm 0,84$, para una concentración de 823 ppm. Esto se puede atribuir al proceso realizado de gelificación externa en el seno de una

emulsión, ya que tanto el polímero como la proteína tienen predilección por la fase acuosa.

5.7.3. Estudio de Liberación 'in vitro'

A continuación, se procedió a la realización del ensayo de liberación 'in vitro' de las NGB-Nps. En la Figura 54 y tabla 22, se muestra el porcentaje de proteína liberada a lo largo de 72 horas de estudio.

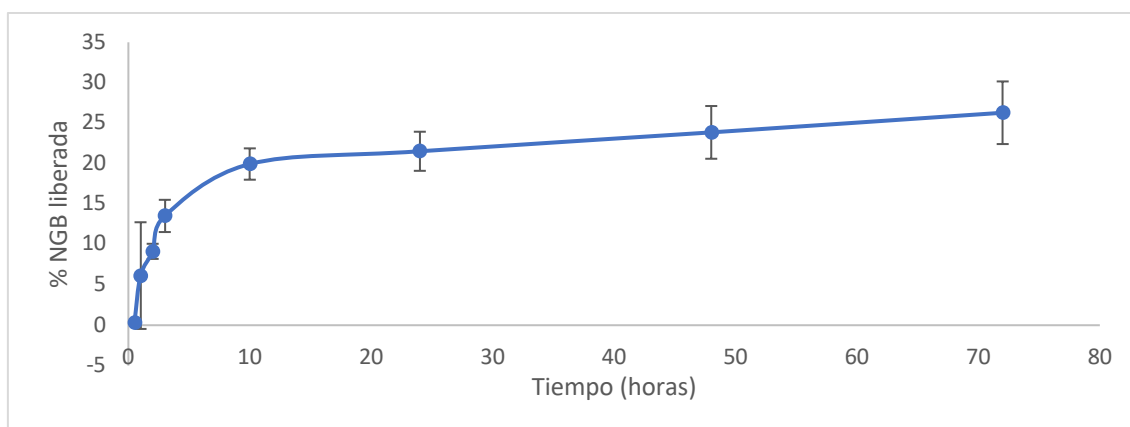


Figura 54. Porcentaje de NGB liberada a lo largo del tiempo.

Tiempo (horas)	% Liberado NGB
0	0
0,5	0,32 ± 0,03
1	6,13 ± 6,59
2	9,13 ± 0,93
3	13,51 ± 1,99
10	19,94 ± 1,93
24	21,52 ± 2,42
48	23,86 ± 3,26
72	26,29 ± 3,87

Tabla 21. % NGB liberada a lo largo del tiempo.

Como se puede ver durante las primeras 10 horas, se libera la mayor parte de la proteína llegando a ser de casi el 20%. A partir de ese momento, la liberación se mantuvo de manera más sostenida, alcanzando su máximo a las 72 horas, con valores próximos al 27%. La liberación que se produce en el primer tramo, durante las primeras 10 horas, puede deberse a que la proteína encapsulada que se libera se encuentra cerca de la superficie de las Nps, difundiendo más rápidamente a través de las dos capas de recubrimiento. La liberación es progresiva y no se aprecia un 'efecto ráfaga'

correspondiente a una liberación intermitente, ya que los recubrimientos especialmente el lipídico actuaría como una especie de membrana. El segundo tramo de liberación, entre las 10 a las 72 horas, podría corresponder con la liberación de la NGB localizada en la zona más interna de las Nps, lo que justificaría el patrón más sostenido que encontramos en este periodo. Aun así, los datos de liberación completa no superan el 26,29%, comparándolos con el estudio de liberación de lisozima, en el cual la liberación final alcanzó un porcentaje cercano al 80%, estos % son bajos. Creemos que esto puede ser debido a que la NGB se degrada en el medio de liberación por las condiciones de pH y temperatura en mayor medida que la lisozima, ya que esta proteína es más sensible y más fácilmente alterable.

5.7.3.1. Cinéticas de liberación

Los datos experimentales se han ajustado a cada uno de los métodos matemáticos utilizando como criterio discriminatorio el de Akaike (AIC) y el coeficiente R^2 . La función con el menor valor AIC presentado y el valor de R^2 más próximo a 1 para las 2B Nps con NGB es la de Hixon-Crowell (tabla 22), al igual que ocurría con la lisozima en el apartado 5.6.2.1. Por tanto, podemos concluir que la proteína es liberada debido a su difusión desde el interior de las Nps y a la erosión de las mismas conforme transcurre el tiempo estando la variación que presenta la superficie del sólido relacionada directamente con la raíz cúbica del cuadrado del volumen de las Nps (Doménech y col., 2013), considerando que presentan una forma esférica. Estos datos avalan los explicados en el apartado 5.7.3.

Orden cero			Primer orden			Higuchi			Hixon-Crowell		
$Q_t = kt$			$\ln(1 - Q_t) = -kt$			$Q_t = kt^{1/2}$			$Q_t^{1/3} = kt$		
k	R^2	AIC	k	R^2	AIC	k	R^2	AIC	k	R^2	AIC
7,15	0,633	48,6	0,045	0,276	49,99	70,55	0,828	49,63	0,1	0,906	47,24

Tabla 22. Cinéticas de liberación para las NGB-Nps.

5.7.4. Estudio de estabilidad

Para intentar aumentar la estabilidad de la NGB, las Nps obtenidas con proteína fueron sometidas a un proceso de liofilización, teniendo en cuenta, sobre todo, que el medicamento final tenga una presentación extemporánea para preservar lo máximo posible su estabilidad y conservación. Para ello, una vez reconstituido en agua, el liófilo fue analizado para determinar posibles modificaciones en el tamaño y carga de las Nps. También se realizó un estudio microfotográfico mediante TEM. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 23 y figura 55.

Tipos NPs	Tamaño medio (nm)	Polidispersión	ζ-Potencial (mV)
NGB-Nps sin liofilizar	145,77 ±1,14	0,2628 ±0,0046	27,55 ±1,017
NGB-Nps liofilizadas	143,98 ±2,01	0,2331 ±0,085	29,11 ±1,971

Tabla 23. Tamaño, polidispersión y potencial Zeta de NGB-Nps liofilizadas y sin liofilizar.

Como se puede observar, los valores obtenidos son muy similares en ambos casos, pudiendo afirmar la no existencia de diferencias significativas antes y después de la liofilización. Además de su tamaño, su polidispersión tampoco se ve alterada, lo que descarta la posibilidad de que se puedan formar aglomerados después del proceso. El visionado de las Nps mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (figura 55) confirma las evidencias proporcionadas por el análisis de tamaño y carga, las Nps mantienen su forma esférica, sin que se observen alteraciones visibles en mismas.

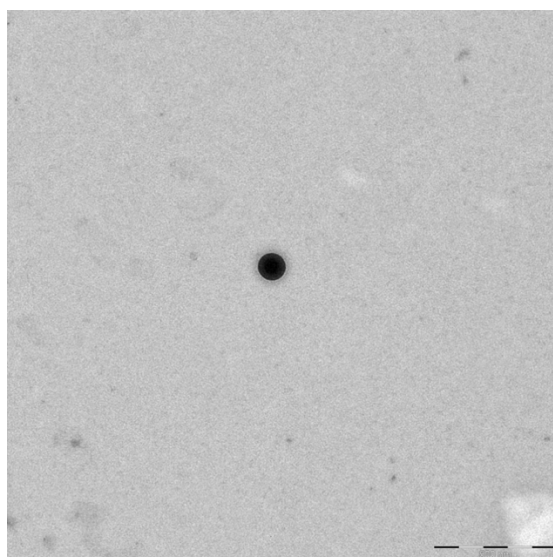


Figura 55. NGB-Np liofilizada. TEM: escala 500nm

5.7.5. Penetración en modelos animales

En este último apartado, las NGB-Nps preparadas anteriormente son inyectadas a los animales de experimentación, tal y como se describe en métodos experimentales (apartado 4.2.). La concentración de NGB inyectada fue de 2,15 mg/mL. Se toman imágenes mediante microscopía confocal de secciones histológicas de cerebros transcurridas 2 horas (figura 56) y 24 horas (figura 57) desde el inicio de la reperfusión.

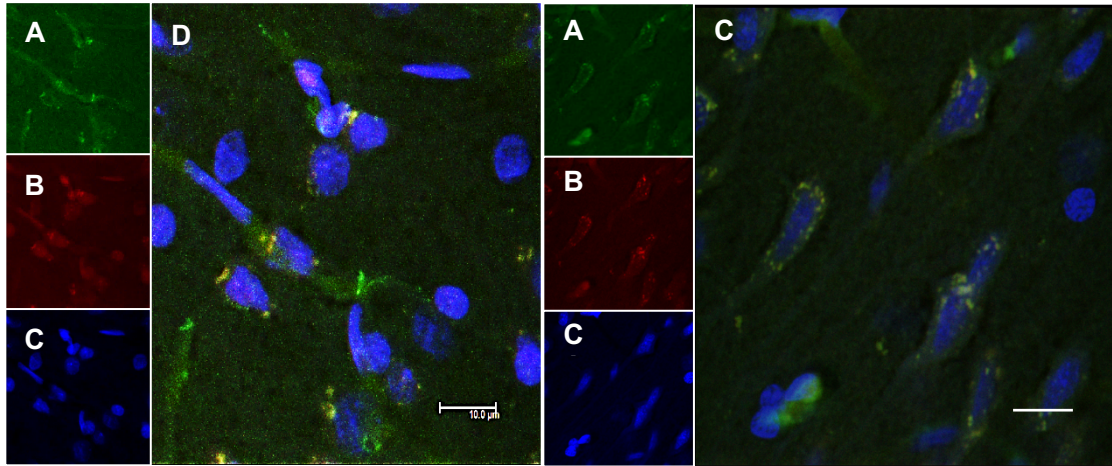


Figura 56. Imágenes de microscopía confocal de la corteza parietal de animales sometidos a tMCAO después de 2 h de reperusión. A: la fluorescencia verde Cy2 representa NGB. B: la fluorescencia roja de rodamina detecta NP. C: a fluorescencia azul DAPI marca los núcleos celulares. D: fusión de imágenes de A, B y C. Barra de escala: 10 µm.

Figura 57. Imágenes de microscopía confocal de la corteza parietal de animales sometidos a tMCAO después de 24 h de reperusión. A: la fluorescencia verde Cy2 representa NGB. B: la fluorescencia roja de rodamina detecta NP. C: la fluorescencia azul DAPI marca los núcleos celulares. D: fusión de imágenes de A, B y C. Barra de escala: 10 µm

Como se aprecia en las figuras 56A y 57A la fluorescencia verde de Cy2 revela la presencia de NGB (marcada con un antisuero contra NGB e identificada en verde con un anticuerpo secundario vinculado a Cy2). Las figuras 56B y 57B muestran fluorescencia roja que se debe a la rodamina introducida en la síntesis de las NGB-Nps. Las figuras 56C y 57C corresponden a los núcleos celulares marcados con azul DAPI. Finalmente, las figuras 56D y 57D son imágenes de combinación, en ella el color amarillo-anaranjado identifica la colocalización de Nps y NGB y, por lo tanto, coincide con las NGB-Nps. Estas imágenes revelan claramente que la NGB vinculada a las Nps ha cruzado la BHE y ha sido endocitada por las células nerviosas después de 2 horas desde su inyección. Además, estos resultados también indican que la fluorescencia permanece en el parénquima cerebral 24 horas más tarde desde que se inyectaron las NGB-Nps. Ciertamente, la NGB detectada en nuestro estudio corresponde no solo a la NGB exógena (vinculada a las Nps) sino también a la endógena. De todos modos, es la NGB exógena co-localizada con Nps, la que representa la mayoría detectada, siendo esta la que se corresponde con el color amarillo-anaranjado en las imágenes fusionadas. En este sentido, debemos tener presente que se ha descrito que NGB se induce en el accidente cerebrovascular solo después de 48-72 horas de la reperusión en ratones (Cai y col., 2011) o en humanos (Xue y col., 2017); por lo tanto, a los tiempos de reperusión de 2 horas y 24 horas, la NGB endógena debe ser bastante escasa. Además, en otros experimentos realizados con péptidos de penetración celular (PPC) acoplados a NGB recombinante se detectaron fácilmente en el cerebro tras 4 horas después de su aplicación intravenosa; por el contrario, a pesar de que el accidente

cerebrovascular interrumpe la BHE, la NGB sin el PPC no impregnó el parénquima cerebral infartado (Cai y col., 2011; Dietz, 2011).

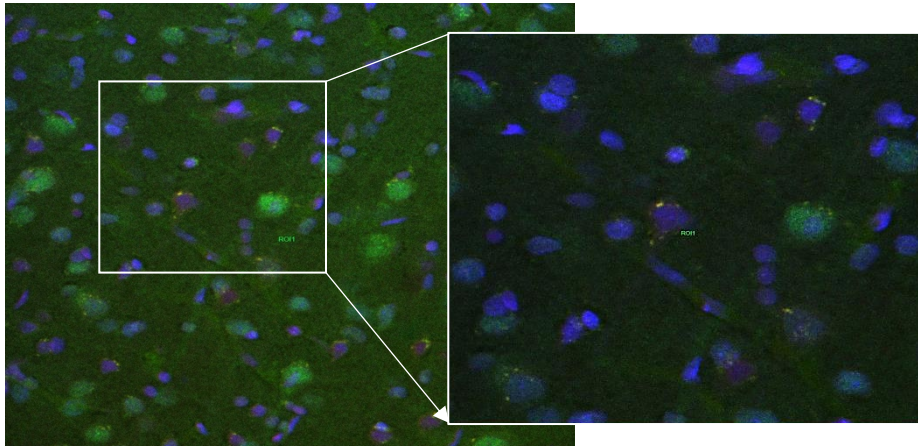


Figura 58. Imágenes confocales fusionadas de la corteza parietal de animales sometidos a tMCAO después de 2 horas de reperfusion. Cada imagen es el resultado de la superposición de tres imágenes tomadas para visualizar NGB (Cy2), Nps (rodamina) y núcleos celulares (DAPI). El recuadro es una ampliación tomada con mayor aumento de la imagen principal. Barra de escala: 30 μ m.

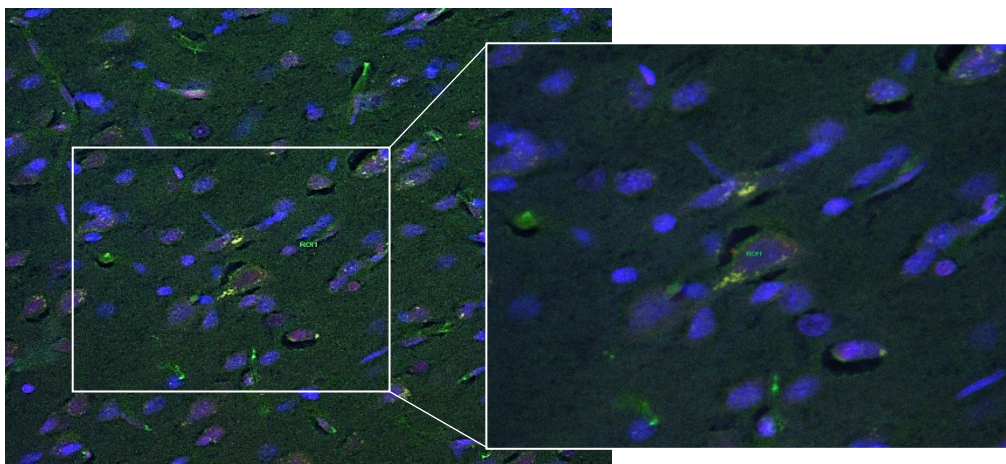


Figura 59. Imágenes confocales fusionadas de la corteza parietal de animales sometidos a tMCAO después de 24 horas de reperfusion. Cada imagen es el resultado de la superposición de tres imágenes tomadas para visualizar NGB (Cy2), Nps (rodamina) y núcleos celulares (DAPI). El recuadro es una ampliación tomada con mayor aumento de la imagen principal. Barra de escala: 30 μ m.

De acuerdo con las imágenes de las figuras 58 y 59, la NGB se localiza en el parénquima cerebral y, más concretamente, en las células nerviosas, que probablemente sean neuronas dada su forma y tamaño. Estas capturan activamente las NGB-Nps una vez que han cruzado la BHE. También aparece en los capilares sanguíneos, pero apenas se puede ver en las células gliales. Corroborando nuestros resultados, Cai y col. (2011) mostraron que CCA-NGB se colocó con el marcador neuronal NSE, pero no con el marcador glial GFAP. Atribuyen esta característica a la composición de la carga, aunque

una explicación alternativa podría ser que la NGB podría ser estable en las neuronas, mientras que podría ser rápidamente metabolizada en la glía (Dietz, 2011).

A continuación, se procedió a cuantificar (valores medios de grises) las fluorescencias de Cy2 (NGB), rodamina- (Nps) y DAPI (núcleos) en el parénquima cerebral, tanto a las 2 horas como a las 24 horas después del inicio del período de reperfusión, utilizando Leica avanzado software AF. Este software permite estimar la cuantificación de la fluorescencia de un fluoróforo determinado en el campo visual del microscopio de la sección histológica seleccionada. La figura 60 representa estos resultados.

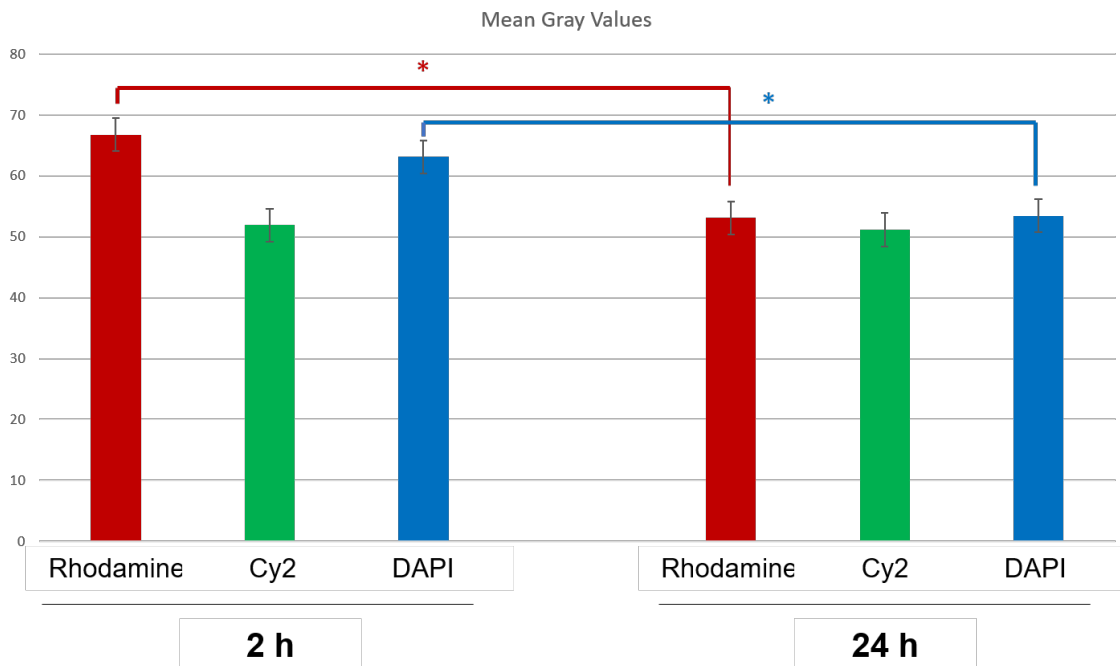


Figura 60. Estimación de los valores grises medios de la emisión fluorescente de rodamina (Nps), Cy2 (NGB) y DAPI (núcleos) 2h y 24h después de tMCAO respectivamente. * $p < 0,05$.

Los datos obtenidos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la cantidad de rodamina detectada a las 2 y 24 horas, mientras que la NGB (verde) permanece estable después de 24 horas de reperfusión. Es posible que después de las 24 horas, se haya perdido algo de fluorescencia de rodamina debido a la degradación de las Nps; sin embargo, dado que la NGB estaba marcada inmunohistoquímicamente, no se vería afectado por el tiempo transcurrido desde que se inyectaron los NGB-Nps al inicio de la reperfusión. En último lugar, se aprecia una disminución de DAPI, el cual es atribuible a que durante la reperfusión se suele producir un aumento de muerte celular en el tejido infartado.

El análisis de todos los datos obtenidos nos indica el interés que pueden tener estos compuestos en el posible tratamiento del ictus, dados los resultados tan positivos conseguidos.

6.

CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar la importancia e impacto que presentan los medicamentos biológicos, y especialmente los biosimilares en el tratamiento de diferentes patologías, ampliando el arsenal terapéutico a la vez que se mejora. También se ha establecido el diseño de un medicamento biológico destinado al tratamiento del ictus y que igualmente podría llegar a ser aplicado en otros trastornos neurodegenerativos. Todo ello gracias al empleo de la nanotecnología, de la cual nos hemos servido para transportar una proteína al parénquima cerebral donde ejerce su función neuroprotectora. Como resultado de este trabajo se ha logrado la publicación de 4 artículos y 1 sometidos, 6 publicaciones tipo poster en congresos, 2 comunicaciones orales en congresos y una estancia en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia del Jagiellonian University Medical College en Cracovia. Teniendo en cuenta todo lo anterior cabe resaltar las siguientes conclusiones:

Respecto a los medicamentos biológicos

1. Desde su aparición han tenido un gran impacto tanto por su complejidad y características como por su capacidad de tratar enfermedades de acuerdo con un nuevo planteamiento terapéutico. Además, su interés se incrementa constantemente y la tendencia sigue creciendo teniendo su foco en enfermedades muy extendidas, como los trastornos del sistema inmunitario y el cáncer.
2. La importancia de los medicamentos biológicos se ve reflejada en los biosimilares, que son copias no idénticas de los medicamentos biológicos originales que han perdido su patente.
3. El uso de medicamentos biosimilares se incrementa año tras año y constituyen la esperanza para la sostenibilidad de los sistemas sanitarios, pues su fin subyace en datos económicos y el ahorro que pueden suponer para los sistemas nacionales de salud.

Respecto al proceso de obtención de Nps

4. Se han conseguido preparar Nps a partir de hialuronato de sodio utilizando distintas tecnologías y con propiedades adecuadas para su administración parenteral.
5. A partir de ellas se han obtenido Nps 'inteligentes' mediante diferentes modificaciones realizadas en el recubrimiento para conseguir tamaño, liposolubilidad y carga adecuada a los fines perseguidos.

6. Estos recubrimientos se han realizado con quitosán para cambiar su carga superficial y posteriormente con glicerol-tripalmitina para conferirles la liposolubilidad necesaria para llegar al lugar de acción.
7. Se han elaborado sistemas lipídicos sólidos (SLS) capaces de transportar neuroglobina en concentraciones satisfactorias, con buenas propiedades en lo que respecta a forma, tamaño y carga eléctrica.
8. Con los tres métodos desarrollados se consiguen elevados niveles de encapsulación de proteína, siendo el denominado método 2 o gelificación iónica externa en el seno de una emulsión el que mejores resultados generales ofrece, tanto por las buenas cifras de encapsulación, como de penetración y liberación. Por lo que fue seleccionado para llevar a cabo las pruebas con NGB.
9. Los estudios de toxicidad realizados a todas las Nps demuestran su biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad independientemente del método utilizado.
10. La conservación de la forma farmacéutica constituye un pilar fundamental para su eficacia. Tras ser sometidas a liofilización tanto las Nps como la NGB presenta unos valores de degradación bajos o nulos, considerándolos altamente estables.
11. Mediante estudios en animales se comprobó la capacidad de las NGB-Nps de alcanzar la diana terapéutica y disponerse alrededor de los núcleos neuronales, donde se demuestra la penetración de las mismas a través del endotelio de la barrera hematoencefálica.
12. Las NGB-Nps son captadas y la NGB liberada en el citoplasma celular alrededor de los núcleos. Además, llegan rápidamente a las células neuronales como se detecta en el citoplasma después de 2 horas y permanece allí después de 24 horas tras la reperusión.
13. Los estudios histológicos del cerebro realizados mediante microscopía confocal de los animales de experimentación han demostrado la presencia de NGB en las zonas afectadas.
14. El diseño y la formulación desarrollada representan un sistema de entrega exitoso para llevar la proteína NGB al cerebro isquémico después del accidente cerebrovascular.

Conclusión final

Consideramos que todo el trabajo motivado de esta Tesis Doctoral nos permite poder afirmar que se pueden conseguir Nps con NGB encapsulada que podrían ser eficaces en el tratamiento del ictus. Sin duda, será necesario realizar más estudios que corroboren todos estos datos para que, en un futuro no muy lejano, se pueda disponer de un medicamento biológico elaborado con Nps y NGB.

Z. **BIBLIOGRAFÍA**

Al-Qadi S, Grenha A, Remuñán-López C. Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. *Carbohydrate Polymers*. 2011; 86:25-34.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Introducción a la biología celular*. 3a ed. Barcelona: Editorial Panamericana. 2011; 571-580.

Almalik A, Karimi S, Ouasti S, Donno R, Wandrey C, Tirelli N. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34:5369-5380.

Alvarez Sabín J, Alonso de Lecinana M, Gallego J, Gil-Peralta A., Casado I, Castillo J. Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Plan de atención sanitaria al ictus. *Neurología*. 2006; 21:717-26.

Álvarez-Sabín J, Ribó M, Masjuan J, Tejada JR, Quintana M. en nombre de los investigadores del estudio PRACTIC. Importancia de una atención neurológica especializada en el manejo intrahospitalario de pacientes con ictus. *Neurología*. 2011; 26: 510-7.

Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH, Kuznetsov D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*. 2014; 9:795-811.

Ansari S, Azari H, McConnell DJ, Afzal A, Mocco J. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2011; 8(51)2879.

Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD. Astrocyte-mediated induction of tight-junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Developmental Brain Research* 1987; 36:155-159.

Badylak SF. Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix. *The Anatomical Record Part B The New Anatomist*. 2005; 287(1):36-41.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*. 2004; 16:1-13.

Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004; 104:29-45.

Bell S, Kamm MA. Antibodies to tumour necrosis factor α as treatment for Crohn's disease. *The Lancet*. 2000; 355(9207):858-60.

Ben-Horin S, Vande N, Schreiber S, Laszlo P. Biosimilars in Inflammatory Bowel Disease: Facts and Fears of Extrapolation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016; 14(12):1685-96.

Bentmann A, Schmidt M, Reuss S, Wolfrum U, Hankeln T, Burmester T. Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:20660-20665.

Betsholtz C, Keller A. PDGF, pericytes and the pathogenesis of idiopathic basal ganglia calcification (IBGC). *Brain Pathology*. 2014; 24(4):387-95.

Bhowmik A, Khan R, Ghosh MK. Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International*. 2015; 2015: 320941-60.

Bickel WK, Marsch LA. Toward a behavioral economic understanding of drug dependence: delay-discounting processes. *Addiction* 2001; 96:73-86.

Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007; 47:323-55.

Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancertherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64:206-212.

Burmester T, Hankeln T. Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiologica*. 2014; 211:501-514.

Burmester T, Hankeln T. Neuroglobin. A Respiratory Protein of the Nervous System. *Physiology*. 2004; 19:110-113.

Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000; 407(6803):520-3.

Cai B, Lin Y, Xue XH, Fang L, Wang N, Wu ZY. TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Experimental Neurology*. 2011, 227(1):224-231.

Carrillo W. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actualización en nutrición*. 2013; 14:314-326.

Chantal A, Monchois V, Byrne D, Chenivesse S, Lembo F, Lazaroni JC and Claverie JM. Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *PNAS*. 2007; 104: 6394-6399.

Chao Z, Lianzhi L, Li W, Haiwei J. Circular dichroism spectral studies on the recombinant human neuroglobin. *Chinese Science Bulletin*. 2006; 51(21): 2581-2585.

Chen F, Lu J, Chen F, Lin Z, Lin Y, Yu L, Su X, Yao P, Cai B, Kang D. Recombinant neuroglobin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via inhibiting the activation of mitochondria apoptotic pathway. *Neurochemistry international*. 2018; 112:219-226.

Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64:640-65.

Chiu HC, Lin CW and Suen SY. Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cationexchange membranes. *Journal Membrane Science*. 2007; 290:259-266.

Cho JH, Fraser IP, Fukase K, Kusumoto S, Fujimoto Y, Stahl GL and Ezekowitz RA. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood*. 2005; 106:2551-2558.

Cochran J, Superti-Furga G, Craig M, Crews C. Where is the Future of Drug Discovery for Cancer? *Cell*. 2017; 168(4):564-565.

Cornillie F. Ten years of infliximab (Remicade®) in clinical practice: The story from bench to bedside. *European Journal of Pharmacology*. 2009; 623(1):S1–S4.

Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood–brain barrier. *Neurochemical Research* 2009; 34:2067-2077.

Cortivo R, De Galateo A, Haddad M, Caberlotto M, Abatangelo G. Glycosaminoglycans in human normal gingiva and in periodontosis: biochemical and histological observations. *Giornale di stomatologia e di ortognatodonzia*. 1986; 5(3):69-72.

Curigliano G, Darran P, O'Connor D, Rosenberg J. Biosimilars: Extrapolation for oncology. *Oncology Hematology*. 2016; 104:131-137.

Da Silva RC, De Martini Soares FAS, Maruyama JM, Dagostinho NR, Silva YA, Ract JNR, Gioielli LA. Microscopic approach of the crystallization of tripalmitin and tristearin by microscopy. *Chemistry and physics of lipids*. 2016; 198:1-9

Daneman R, Rescigno M. The gut immune barrier and the blood–brain barrier: are they so different? *Immunity*. 2009; 31:722-735.

Davies D.C. Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *Journal of Anatomy*. 2002; 200(6):639-646.

De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 2008; 3:133-149.

de Mora F. Biosimilar: what it is not. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2015; 80:949-956.

Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharmaceutical Research*. 2009; 26:235-243.

Dermietzel R, Krause D. Molecular Anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *International Review of Cytology*. 1991; 127:57-109.

Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, Marden MC, Caubergs R, Moens L. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(42):38949-55.

Di Domenico F, Casalena G, Jia J, Sultana R, Barone E, Cai J, Pierce WM, Cini C, Mancuso C, Perluigi M, Davis CM, Alkayed NJ, Butterfield DA. Sex differences in brain proteomes of neuron-specific STAT3-null mice after cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of Neurochemistry*. 2012; 121:680-692.

Dietz GP: Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: a decade of research. Comment on Cai et al: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2011; 227(1):224-31. *Experimental Neurology*. 2011, 231(1):1-10.

Díez-Tejedor E, editor. *Ictus: una cadena asistencial*. Barcelona: Ediciones Mayo, S.A. 2004; 1-2.

Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999; 182:21-32.

Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart J, y col (eds). *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol II. Ed Síntesis, Madrid 2013.

Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery*. 2016; 1(97):204-36.

Engström PE, Shi XQ, Tronje G, Larsson A, Welander U, Frithiof L, Engstrom GN. The effect of hyaluronan on bone and soft tissue and immune response in wound healing. *Journal of Periodontology*. 2001; 72(9):1192-1200.

Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery*. 2006; 58:1456-1459.

Feigin VL, Krishnamurthi R, Bhattacharjee R, Parmar P, Theadom A, Hussein T, y col. New strategy to reduce the global burden of stroke. *Stroke*. 2015; 46(6):1740-1747.

Felt O, Carrel A, Baehni P, Buri P, Gurny R. Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2000; 16:261-270

Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 180:185-193.

Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. Liposomal Nanomedicines: an emerging field. *Toxicologic Pathology*. 2008; 36:21-29.

Flyvbjerg H. Biomathematics. *Mathematics of Biostructures and Biodynamics. Chemistry and Physics of Lipids*. 2000; 106(2):191-192.

Forrellat M, Hernández P. Neuroglobin: a novel member of the globin family. *Revista Cubana Hematología Inmunología y Hemoterapia*. 2011; 27:3.

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent EBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*. 1997; 242:27-33.

Fries E, Kaczmarczyk A. Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochimica Polonica*. 2003; 50(3):735-742.

Fukishige K, Tagami T, Ozeki T. The offset effect of a hyaluronic acid coating to cationic carriers containing siRNA: Alleviated cytotoxicity and retained gene silencing in vitro. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017; 39:35-441.

Gao X, Qian, S. Zheng J, Changyi Y, Zhang J, Ju S, Zhu J, Li C. Overcoming the blood-brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist. *ACS Nano* 8. 2014; 22(4)3678-3689.

Gasco MR. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Advanced Drug Delivery*. 2007; 59:377-378.

Girault D, Trouvin JH, Blanchier-Poisson C, y col. Biosimilars: from Technical to Pharmaco-economic Considerations. *Therapie*. 2015; 70(1):47-55.

Gokhale SB, Cassel T, Mahon R, Balkin PE, Singh S, Bhattacharyya S, Handin J, Mendoza C. PMS29 – Comparison of healthcare costs between rheumatoid arthritis patients treated with infliximab, Etanercept and Adalimumab in nordic setting. *Value in Health*. 2016; 19(7):A535.

Gómez-Gaete C. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Revista de farmacología de Chile*. 2014; 7:7-16.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology* 1999; 52(4):189-196.

Gregory A, Hernández S, Mejía O, Báez A, García A. Biología y patología humana del ácido hialurónico en la estabilización de la matriz extracelular y la inflamación. *Revista Med*. 2005; 14(1):80-87.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours After Acute Ischemic Stroke. *Journal of Vascular Surgery*. 2008; 8:1634-1635.

Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 2002; (6):319-327.

Hawkins B.T., Davis T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*. 2005; 57:173-185.

Hsu LW, Ho YC, Chuang EY, Chen CT, Juang JH, Su FY, Hwang SM, Sung HW. Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterial*. 2013; 34:784-793.

Hu Z, Xia X, Tang L. Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent App. 20,060/040,892. 2004.

Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical Research*. 2004; 21:44-35

Huiyi S, Weiting Y, Meng G, Xiudong L, Xiaojun M. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 96:181-189.

lache, JM, González-Navarro, CJ. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. *Nanomedicine*. 2017; 12(11):1209–1211.

Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters*. 2001; 506:27-32.

Jallouli Y, Paillard A, Chang J, Sevin E, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 344:103-109.

Ji S, Kronenberg G, Balkaya M, Färber K, Gertz K, Kettenmann H, Endres M. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome. *Experimental Neurology*. 2009; 216(2):321-8.

Jiang CM, Wang MC, Chang WH and Chang HM. Isolation of Lysozyme Hen Egg Albumen by Alcohol- Insoluble Cross-Linked Pead Pod Solid Ion-Exchange Chromat. *Journal of Food Science*. 2001; 66:1089-1092.

Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochemistry*. 1984; 63:165-189.

Jones A, Shusta EEV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediated transport. *Pharmaceutical Research*. 2007; 9:1759-1771.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica, texto y atlas*. 12ª ed. México: Editorial Panamericana. 2015; 3-101.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of neural science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill. 2000; 523-547.

Kaniewska MA, Rydzewska G. Su1182 Efficacy and safety of biosimilar of Infliximab (Inflectra®) in adult patients with Crohn disease during one year of treatment followed 6 months of observation - One center retrospective study. *Gastroenterology*. 2016; 150(4):S488-S489.

Kariminia S, Shamsipur A, Shamsipur M. Analytical characteristics and application of novel chitosan coated magnetic nanoparticles as an efficient drug delivery system for ciprofloxacin. Enhanced drug release kinetics by low-frequency ultrasounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; 129:450-457.

Kassner A, Merali Z. Assessment of Blood-Brain Barrier Disruption in Stroke. *Stroke*. 2015; 46:3310-5.

Kharb V, Bhalia M, Durej H, Kaushik D. Nanoparticle technology for the delivery of poorly water-soluble drugs. *Pharm Tech*. 2006; 30:82-92.

Khraishi M, Stead D, Lukas M, Scotte F, Schmid H. Biosimilars: A Multidisciplinary Perspective. *Clinical Therapeutics*. 2016; 38(5):1238-49.

Kozlov LV, Lakhtin VM, Batalova TN, Gouzova VA, D'yakov VL, Ramanov SV. Inhibition by an egg lysozyme of three stages of an enzymatic cascade of activation of a classic path of a human complement. *Vestnik Moskovskogo Universitaria Khimiya*. 2000; 41:88-90.

Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2004; 484-488.

Kumar A, Harjinder S. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science Technology*. 2007; 18:240-251.

Lane NJ, Reese TJ, Kacher B. Structural domains of tight junctional intramembrane fibrils. *Tissue Cell*. 1992; 24:291-300.

Lesnierowski G, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J. Thermally and chemically modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World`s Poultry Science Journal*. 2004; 60:303-309.

Lin S, Zhao Y, Nel AE, Lin S. Zebrafish: An In Vivo Model of Nano EHS Studies. *Small*. 2012; 9:1608-1618.

Liu H, Zheng F, Cao Q, Ren B, Zhu L, Striker G, Vlassara H. Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2006; 290:E824.

Loch-Neckel G, Koepp J. La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Revista de Neurología*. 2010; 51:165-174.

Loh XJ, Nam Nguyen VP, Kuo N, Li J. Encapsulation of basic fibroblast growth factor in thermogelling copolymers preserves its bioactivity. *Journal of materials chemistry*. 2011; 21:2246-2254.

Lupo B, Gonzalez C, Maestro A. Microencapsulation in alginate for food. *Technologies and applications. Revista venezolana de ciencia y tecnología de alimentos*. 2012; 3(1):130-151.

Márquez-Velásquez JR. Cross-immunogenicity: Antibodies to infliximab in Remicade-treated patients with inflammatory bowel disease similarly recognise the biosimilar Remsima®. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al Día*. 2016;15(1):19-21.

Martin MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*. 2013; 53(2):480-486.

Maximo GJ, Carareto NDD, Costa MC, dos Santos AO, Cardoso LP, Krähenbühl MA, Meirelles AJA. On the solid-liquid equilibrium of binary mixtures of fatty alcohols and fatty acids. *Fluid phase equilibria*. 2014; 366:88-98.

Meares P. The influence of penetrant concentration on the diffusion and permeation of small molecules in polymers above T_g . *European Polymer Journal*. 1993; 29:237-243.

Mega T, Hase S. Conversion of egg-white lysozyme to lectin like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinin. *Biophysical*. 1994; 64:1488-1490.

Mine Y, Ma FP, Lauriau S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg White lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 58:1088-1094.

Mingersa J, Leydesdorff L. A review of theory and practice in scientometrics. *European Journal of Operational Research*. 2015; 246(1):1-19.

Mosquera J, García I, Liz-Marzán LM. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size Accounts of Chemical Research. 2018; 51:2305-2313.

Muller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy, rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 47:3-19.

Nayak AK. Controlled release drug delivery systems. *Science journal Ubon*. 2011; 2:1-8.

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hialuronan) a review. *Veterinary medicine and science*. 2008; 53(8):397-411.

Neuthaus J., Risau W., Wolburg H. Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter culture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991; 633:578-580.

Ng T, Bekhit A, Fang E, Wong J. Chapter 51 - Grape Seed (*Vitis vinifera*) Oils. Editor: Victor R. Preedy. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press. 2016; Pages 455-462.

Niyonsaba F, Ogawa H. Protective roles of the skin against infection: Implication of

naturally occurring human antimicrobial agents b-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *Journal of dermatological science*. 2005; 40:157-168.

Oksala O, Salo T, Tammi R, Häkkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 1995; 43 (2):125- 135.

Pardridge WM. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015; 19(8):1059-1072.

Pascual-Garvi JM, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S, Roda JM. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Revista de Neurología*. 2004; 38(6):565-581.

Pauluk D, Krause A, Maissar N, Mara R. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*. 2019; 94:411-417.

Petralanda A. Medicamentos biosimilares: ahorro sin coste. *Publicaciones didácticas*. 2018; 88.

Pimentel A, Hernández G, Landa S. Efectos del ácido hialurónico sobre el mecanismo de la cicatrización en la anastomosis de uretra. Un estudio experimental. *Boletín colegio mexicano de urología*. 2007; 17(1):26-31.

Piras A, Maisetta G, Sandreschi S, Esin S, Gazzarri M, Batoni G, Chiellini F. Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014; 67:124-131.

Psachoulia E, Keady S. PMS16 – Evaluation of the cost saving potential of introducing an etanercept biosimilar (Benepali®) for the treatment of all licensed adult Etanercept indications in the UK. *Value in Health*. 2016;19(7):A533.

Ramos-Cabrer P, Campos F. Liposomes and nanotechnology in Drug development: focus on neurological targets. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8:951-960.

Rathore S, Desai PM, Liew CV, Chan LW, Heng PW. Microencapsulation of microbial cells, *Journal of Food Engineering*. 2013; 116:369-381.

Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, Birch N, Brittain T. Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*. 2010; 5(4): 401-11.

Remaut K, Lucas B, Braeckmans K, Demeester J, De Smedt SC. Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides. *Journal Control Release*. 2007; 117:256-266.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood–brain barrier: a historical point of view. *The Anatomical Record. Part B New Anatomist*. 2006; 289(1):3-8.

Rip J, Schenk GJ, de Boer AG. Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009; 6:227-237.

Ritsema J, Herschberg E, Borgos S, Løvmo C, Schmid R, Te-Welscher Y, Storm G, van Nostrum C. Relationship between polarities of antibiotic and polymer matrix on nanoparticle formulations based on aliphatic polyesters. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 548:730-739.

Roberts P, Gaffney E, Luthert P, Foss A, M. Byrne E. Retinal oxygen distribution and the role of neuroglobin. *Journal of Mathematical Biology*. 2016; 73(1):1-38.

Romain O. Preud'homme D. Actualités pharmaceutiques. *Archives de Pédiatrie*. 2007; 14(10):1274-1277.

Rosenthal R, Gunzel D, Finger C, Krug SM, Richter JF, Schulzke JD, Fromm M, Amasheh S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials*. 2012; 33:2791-2800.

Sanchez M, Ruiz M, Lasserrot A, Hormigo M, Morales ME. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: protection, survival and stability study. *Food Hydrocolloids*. 2017; 69:67-75.

Sanguineti AC, Rodríguez-Tafur JM. Moléculas de adhesión y piel. *Dermatología peruana*. 1999; 9(1).

Disponible en:

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v09_sup1/moleculas.htm.

Sartor RB. *Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases*. Ed. Saunders. 2004.

Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016; 235:34-47.

Sauerová P, Pilgrovác T, Pekař M, Hubalek Kalbacova M. Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on

human cell types. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 103:1276-1284.

Schimizzi GF. Biosimilars from a practicing rheumatologist perspective: An overview. *Autoimmunity Reviews*. 2016; 15(9):911-916.

Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M. Biotechnological production and application of hyaluronan. *IntechOpen*. 2010.

<https://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>

Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T. Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(9):8063-9.

Schmidt M, Giessler A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:1932-1935.

Scholar E. Infliximab. *Ref Mod Biom Sciences*. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference: 2009; 1-5.

Schuerer N, Stein E, Inic-Kanada A, Ghasemian E, Stojanovic M, Montanaro J, Bintner N, Hohenadl C, Sachsenhofer R, Barisani-Asenbauer T. Effects of chitosan and chitosan N-acetylcysteine solutions on conjunctival epithelial cells. *Journal of EuCornea*. 2018; 1(1):12-18.

Serpe, L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, Canaparo R, Muntoni, Frairia E, Gasco R, Eandi MR, Zara GP. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004; 58: 673-680.

Shah U, Vemarapu Ch, Askins V, Lodaya M, Elzinga P, Mollan MJ. Nanoparticle formation: A modular high-pressure system to enhance biopharmaceutical properties of poorly soluble drugs. *PharmTech*. 2006; 30(3):96-108.

Shareghi B, Farhadian S, Zamani N, Salavati-Niasari M, Moshtaghi H, Gholamrezaei S. Investigation the activity and stability of lysozyme on presence of magnetic nanoparticles. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015; 21:862-867.

Shkodra-Pula B, Grune C, Traeger A, Vollrath A, Schubert S, Fischer D, Schubert US. Effect of surfactant on the size and stability of PLGA nanoparticles encapsulating a protein kinase C inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 566:756-764.

Sjostrom B, Kronberg B, Carlfors J. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in-water emulsions. I: influence of emulsification and surfactant concentration. *Journal of Pharmacological Sciences*. 1993; 82(6):579-583.

Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research*. 2004; 21:43-49.

Steinberg FM, Raso J. Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998; 1:48-53.

Steward PA, Coomber BL. Astrocytes and the blood-brain barrier. Vol. I Development, morphology and regional specialization of astrocytes. *Astrocytes*. Academic Press. 1986.

Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Greenberg DA: Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(6):3497-3500.

Thammasirirak S, Pukcothanung Y, Preecharram S, Daduang S, Patramanon R, Fukamizo T, Araki T. Antimicrobial peptides derived from goose egg White lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2010; 151:84-91.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2001; 12 (2): 79-87.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (7): 4589-4592.

Vila J.L. *Nanotecnología Farmacéutica: Una Galénica Emergente*. Madrid. 2006.

Vilella A, Ruozi B, Belletti D, Pederzoli F, Galliani M, Semeghini V, Forni F, Zoli M, Vandelli MA, Tosi G. Endocytosis of Nanomedicines: The Case of Glycopeptide Engineered PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2015; 7:74-89.

Villafuerte-Robles Leopoldo. *Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra*. 2009; 14:1-20.

Villegas JC, Broadwell RD. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and blood-brain barrier. *Journal of Neurocytology*. 1993; 22:67-80.

Wang CT, Lin J, Chang CJ, Lin YT, Hou SM. Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A metaanalysis of randomized controlled trials. *The Journal of bone and joint surgery*. 2004; 86(3): 538-545.

Wang X, Liu J, Zhu H, Tejima E, Tsuji K, Murata Y, Atochin DN, Huang PL, Zhang C, Lo EH. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008; 39(6):1869-74.

Weckx-Luc LM, Hirata-Cleonice HW, Abreu-Marilda AM, Fillizolla VC, Silva-Olga MP. Levamisol não previne lesões de estomatite aftosa recorrente: um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2009; 55(2): 132-138.

Weigel PH. Planning, evaluating and vetting receptor signaling studies to assess hyaluronan size-dependence and specificity. *Glycobiology*. 2017; 27:796-799.

Wolburg H, Risau W. Formation of the blood-brain barrier. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press, 1995. P. 763-776.

Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of control release*. 2012; 161:264-273.

Xu Y, Asghar S, Yang L, Chen Z, Li H, Shi W, Li Y, Shi Q, Ping Q, Xiao Y. Nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG containing curcumin: In vitro evaluation and pharmacokinetics in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 102:1083-1091.

Xue L, Chen H, Lu K, Huang J, Duan H, Zhao Y. Clinical significance of changes in serum neuroglobin and HIF-1 α concentrations during the early-phase of acute ischemic stroke. *Journal of the neurological sciences*. 2017; 375:52-57.

Ye C, Chi H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering: C*. 2018; 83:233-246.

You SJ, Udeniwe CC, Aluko RE, Wu J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*. 2010; 43:848-855.

Zhang H, Peng J, Li X, Liu S, Hu Z, Xu G, Wu R. A nano-bio interfacial protein corona on silica nanoparticle'. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018; 167:220-228.

Zhou Y, Penga Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2018; 270:290-303.

Zhou Z, Lu J, Liu WW, Manaenko A, Hou X, Mei Q, Huang JL, Tang J, Zhang JH, Yao H, Hu Q. Advances in stroke pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018; 191:23-42.

Zolni BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*. 2010; 151:458-65.

PÁGINAS WEBS CONSULTADAS:

Arganda C. La penetración de biosimilares en la C. Valenciana, muy desigual, llega al 17%. Consultado mayo 2017. Disponible en: <https://www.diariofarma.com/2016/10/11/la-penetracion-biosimilares-la-c-valenciana-desigual-llega-al-17?id=28164>

Arganda C. Sanidad prepara su plan de genéricos y biosimilares: subastas por descuento, PPA y otras 14 medidas. Consultado en septiembre 2019. Disponible en: <https://www.diariofarma.com/2019/05/29/sanidad-prepara-su-plan-de-genericos-y-biosimilares-subastas-por-descuento-ppa-y-otras-14-medidas>

Biosim blog: ¿Cuánto se puede ahorrar con el uso de medicamentos biosimilares? Asociación Española de biosimilares. Consultado en junio 2017. Disponible en: <https://www.biosim.es/ahorro-con-el-uso-de-biosimilares/>

CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products CHMP/437/04 Rev 1. 2014.

CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of bioequivalence CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/Corr **. 2010.

Consensus Information Paper European Commission. What you need to know about Biosimilar Medicinal Products. 2013. Disponible en: https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2016/03/biosimilars_report_en.pdf

Diego B. La mitad de los médicos de familia no sabe qué es un biosimilar. Consultado en junio 2017. Disponible en: <https://www.diariofarma.com/2016/10/27/la-mitad-los-medicos-familia-no-sabe-biosimilar>

EGA: Manual sobre medicamentos biosimilares de la (European Generic Medicines Association). Consultado en noviembre 2017. Disponible en: https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2016/03/EGA_BIOSIMILARS_handbook_es.pdf

EMA. Pagina Web Agencia Europea del Medicamento EMA. Consultada en septiembre 2019. Disponible en:

https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicine/field_ema_med_status/authorised-36/ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar
for humans and animals. Fecha de acceso: Enero 2018. Disponible en:

<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1326>.

FEI: Federación Española del Ictus. 2015. Fecha de acceso: Agosto 2018. Disponible en: <http://web.archive.org/web/20150910010153/http://www.ictusfederacion.es/el-ictus/>

Hospital Clínic Universitario. 2018. Consultado en septiembre 2019. Disponible en: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/ictus/definicion>

Instituto Nacional del Cáncer de EEUU. Fecha de acceso Mayo 2019. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=426407>

Lo que debe saber sobre los medicamentos biosimilares. Documento informativo de consenso 2013. Proceso sobre responsabilidad corporativa en el ámbito de los farmacéuticos: Acceso a los medicamentos en Europa. Comisión Europea. Consultado en Julio 2017. Disponible en:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwibtIn079rkAhUS-hQKHWZvBFMQFjAAegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fdocsroom%2Fdocuments%2F8242%2Fattachments%2F1%2Ftranslations%2Fes%2Frenditions%2Fnative&usg=AOvVaw0XxOxXSzvHAbVWmCLdHGBj>

mAbxience Blog 1: unidad de biotecnología del Grupo CHEMO. Consultado en noviembre 2017. Disponible en: <http://www.mabxience.com/es/blogs/previsiones-economicas-de-los-biosimilares-segun-los-expertos/>

mAbxience blog 2: Previsiones económicas de los biosimilares según los expertos. Consultado en mayo 2017. Disponible en: <https://www.mabxience.com/es/blogs/previsiones-economicas-de-los-biosimilares-segun-los-expertos/>

Medicamentos biológicos: del síntoma al origen de la enfermedad. Fecha de acceso Octubre 2018. Disponible en: <https://informe21.com/medicamentos/12/06/07/medicamentos-biologicos-del-sintoma-al-origen-de-la-enfermedad>

Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica. Real academia nacional de farmacia. Disponible en: <https://analesranf.com/index.php/mono/issue/view/372>

Nanomedicine. How nanotechnology can be used in the healthcare/drug markets for humans and animals. Consultado Marzo 2017. Disponible en: www.azonano.com

National Nanotechnology Initiative. Consultado en Febrero 2019. Disponible en: <https://www.nano.gov/timeline>

Redacción Médica. Redacción Médica. "Precio dinámico" para los biosimilares en función de su volumen de ventas. 2019. Consultado en septiembre 2019. Disponible en: <https://www.redaccionmedica.com/secciones/industria/-precio-dinamico-para-los-biosimilares-en-funcion-de-su-volumen-de-ventas-8607>

The Global Use of Medicines: Outlook through 2017. Report by the IMS Institute for Healthcare Informatics, página 9. Consultado en Marzo 2017. Disponible en: <http://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato1501906.pdf>