



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

NANOPARTÍCULAS DE RHEIN: DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO*

Profesor Guía: Carolina Pilar Gómez Gaete
Profesor Co-Guía: Alejandra María Paulina Bustos Araya
Profesor Co-Guía: Sigrid Claudia Mennickent Cid

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias
Farmacéuticas

FELIPE ALFONSO FERREIRA VIDAURRE
Diciembre 2017
Concepción - Chile

Resumen

La osteoartritis es una enfermedad caracterizada por la destrucción del cartílago articular, alteraciones óseas e inflamación del tejido sinovial, causando dolor, malformación y limitación funcional de las articulaciones, que eventualmente conducen a la pérdida de movilidad y deterioro de la calidad de vida. En la actualidad, el tratamiento de la osteoartritis se basa en el alivio del dolor y la preservación de la función de la articulación, reduciendo la discapacidad y mejorando la calidad de vida, pero no existe un tratamiento curativo para la enfermedad.

El rheim, metabolito activo de la diacereína perteneciente al grupo de modificadores del curso de la enfermedad, ha recibido gran atención en los últimos años, debido a su actividad condroprotectora y antiinflamatoria. Además de que aun no existen formulaciones en el mercado con este principio activo. Sin embargo, la farmacocinética del rheim después de la administración oral es muy similar a la observada con la diacereína, siendo la escasa solubilidad acuosa responsable de la baja biodisponibilidad exhibida por el compuesto.

Considerando las posibilidades terapéuticas ofrecidas por el rheim, su baja solubilidad acuosa podría ser una ventaja para el desarrollo de sistemas de administración nanoparticulados. El uso de nanopartículas poliméricas en los sistemas de administración de fármacos presenta ventajas que incluyen la mejora de su estabilidad físicoquímica, la regulación del perfil de liberación del fármaco y la focalización terapéutica.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* nanopartículas poliméricas de rheim para una futura administración intraarticular.

Las nanopartículas fueron elaboradas mediante tres métodos: emulsión evaporación de solvente, doble emulsión y nanoprecipitación. Adicionalmente, para la técnica emulsión evaporación de solvente se evaluó la cinética de liberación y los efectos sobre citotoxicidad e inflamación *in vitro*.

El método emulsión evaporación de solvente presentó la mayor eficiencia de encapsulación de las tres técnicas estudiadas, correspondiente a un 38.41 %, así como también presentó un diámetro medio menor a 200 nm y un índice de polidispersidad menor a 0.100, por lo que se decidió continuar el resto de las experiencias con las nanopartículas obtenidas mediante esta técnica.

El porcentaje de liberación de rheim desde las nanopartículas cargadas durante los primeros 5 minutos de "burst" de liberación fue cercano al 50 %. Para luego presentarse una liberación continua hasta los 60 minutos.

Se observó que los macrófagos expuestos a las mayores concentraciones de nanopartículas cargadas y blancas, presentaron la menor viabilidad porcentual, con las menores concentraciones de estas nanopartículas se obtuvo un porcentaje de viabilidad cercano al 100 %. Respecto a la cuantificación de citoquinas, la interleuquina-1 β (IL-1 β) se vio disminuida en presencia de nanopartículas cargadas con rheim. Para el factor de necrosis tumoral α (TNF α) no se pudo cuantificar su concentración, debido a que las lecturas obtenidas estuvieron presentes bajo el primer punto de la curva de calibración. La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) solo se vio inhibida a las dos mayores concentraciones de nanopartículas cargadas de rheim.

En conclusión, fue posible encapsular rheim en nanopartículas poliméricas con una moderada eficiencia de encapsulación, pero una baja carga de fármaco. Adicionalmente estas nanopartículas cargadas con rheim presentaron una alta viabilidad celular, una inhibición en la producción de IL-1 β y no indujeron una disminución estadísticamente significativa en la producción de ROS.

Abstract

Osteoarthritis is a disease characterized by the destruction of articular cartilage, bone alterations and inflammation of synovial tissue, causing pain, malformation and functional limitation of the joints, which eventually lead to loss of mobility and deterioration of quality of life. Currently, the treatment of osteoarthritis is based on pain relief and preservation of joint function, reducing disability and improving quality of life, but there is no curative treatment for the disease.

Rhein, the active metabolite of diacerein belongs to the group of modifiers of the course of the disease, has received great attention in recent years, due to its chondroprotective and anti-inflammatory activity. In addition to that there are still no formulations in the market with this active principle. However, the pharmacokinetics of rhein after oral administration is very similar to the observed with diacerein, being the poor aqueous solubility the responsible for the low bioavailability exhibited by the compound.

Considering the therapeutic possibilities offered by rhein, its low aqueous solubility could be an advantage for the development of nanoparticulate drug delivery systems. The use of polymeric nanoparticles in drug delivery systems has advantages that include the improvement of their physicochemical stability, the regulation of the drug release profile and therapeutic targeting.

The objective of this thesis was to develop, characterize and evaluate *in vitro* rhein polymeric nanoparticles for future intra-articular administration.

The nanoparticles were prepared by three methods, solvent emulsion-evaporation, double emulsion and nanoprecipitation. Additionally, for the solvent emulsion-evaporation technique, the release kinetics and the effects on cytotoxicity and inflammation *in vitro* were evaluated.

The solvent emulsion-evaporation method presented the highest encapsulation efficiency of the three techniques studied, corresponding to 38,41%, as well as having a mean diameter of less than 200 nm and a polydispersity index of less than 0.100, thus it was decided to continue the rest of the experiences with the nanoparticles obtained by this technique.

The rhein release percentage from the charged nanoparticles during the first 5 minutes of the burst release was close to 50%, followed by a continuous release up to 60 minutes.

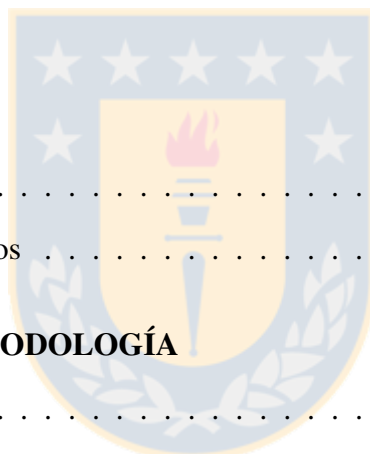
It was observed that the macrophages exposed to the highest concentration of charged and empty nanoparticles showed the lowest percentage viability, with the lowest concentrations of these nanoparticles we obtained a viability percentage close to 100%. Regarding the quantification of cytokines, interleukin-1 β (IL-1 β) was decreased in the presence of rhein-loaded nanoparticles. For the tumor necrosis factor α (TNF α), its concentration could not be quantified, because the readings fell under the calibration curve first point. The production of reactive oxygen species (ROS) was only inhibited at the two highest concentrations of rhein-loaded nanoparticles.

In conclusion, it was possible to encapsulate rhein in polymeric nanoparticles with a moderate encapsulation efficiency, but a low drug loading. Additionally, these nanoparticles loaded with rhein showed a high cell viability, an inhibition in the production of IL-1 β and did not induce statistically significant decrease in ROS production.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción general de la osteoartritis	1
1.2 Prevalencia e incidencia	1
1.3 Factores de riesgo para la OA	2
1.3.1 Factores de riesgo individuales	3
1.3.2 Factores de riesgo de la articulación	5
1.4 Patología de la OA	6
1.5 OA temprana	8
1.6 Progresión a OA clínica	8
1.7 Citoquinas	9
1.8 Enzimas en OA	10
1.9 Inflamación sinovial	10
1.10 Condrocitos	12
1.11 Especies reactivas del oxígeno	13
1.12 Retroalimentación	14
1.13 Tratamientos actuales	15

1.13.1	Fármacos modificadores del curso de la enfermedad	16
1.14	Diacereína y rhein	18
1.14.1	IL-1 β	19
1.14.2	Enzimas degradadoras, óxido nítrico y macromoléculas de la matriz del cartílago	20
1.15	Terapia intraarticular	20
1.15.1	Sistemas para administración intraarticular de fármacos	21
1.16	Sistemas nanoparticulados	22
1.16.1	Nanopartículas poliméricas	23
2	HIPÓTESIS	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo general	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIALES Y METODOLOGÍA	40
4.1	Materiales	40
4.1.1	Reactivos y principios activos	40
4.1.2	Equipos e insumos	41
4.1.3	Software	43
4.2	Optimización de la encapsulación de rhein en nanopartículas poliméricas y caracterización fisicoquímica del sistema resultante	45
4.2.1	Preparación de las nanopartículas cargadas con rhein	45
4.2.2	Optimización de los parámetros de formulación	47
4.2.3	Tamaño de partícula y polidispersidad	49
4.2.4	Eficiencia de encapsulación y carga del rhein	49
4.3	Validación del método cromatográfico	51



4.3.1	Linealidad	51
4.3.2	Límite de detección y límite de cuantificación	51
4.3.3	Precisión	52
4.3.4	Exactitud	53
4.3.5	Selectividad	53
4.4	Liberación <i>in vitro</i>	53
4.5	Ensayos celulares <i>in vitro</i>	54
4.5.1	Evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de rhein	54
4.5.2	Evaluación de citoquinas <i>in vitro</i> : IL-1 β y TNF α	55
4.5.3	Evaluación del efecto oxidativo <i>in vitro</i> de las nanopartículas	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Optimización de los parámetros de formulación	59
5.2	Validación del método cromatográfico	63
5.2.1	Linealidad	63
5.2.2	Límite de detección y límite de cuantificación	64
5.2.3	Precisión	65
5.2.4	Exactitud	66
5.2.5	Selectividad	66
5.3	Liberación <i>in vitro</i> desde nanopartículas cargadas con rhein	67
5.4	Ensayos celulares	68
5.4.1	Ensayo de viabilidad celular MTT	68
5.4.2	Cuantificación de la citoquina IL-1 β	68
5.4.3	Cuantificación de citoquina TNF α	71
5.4.4	Cuantificación de ROS	72
6	DISCUSIÓN	74

6.1	Optimización de los parámetros de formulación	74
6.2	Liberación <i>in vitro</i> desde nanopartículas cargadas con rhein	80
6.3	Ensayos celulares	82
6.3.1	Ensayo de viabilidad celular MTT	82
6.3.2	Cuantificación de la citoquina IL-1 β	83
6.3.3	Cuantificación de citoquina TNF α	84
6.3.4	Cuantificación de ROS	85
7	CONCLUSIONES	88
	BIBLIOGRAFÍA	91



ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Representación esquemática de las principales estructuras de una articulación sana y una desgastada en la OA.	7
1.2	Estructura química de la diacereína y su metabolito rhein	19
1.3	Tipos de nanopartículas biodegradables.	23
1.4	Estructura química del PLGA.	25
4.1	Proceso de elaboración de nanopartículas por la metodología emulsión evaporación de solvente	45
4.2	Proceso de elaboración de nanopartículas por la metodología doble emulsión	46
4.3	Proceso de elaboración de nanopartículas por metodología nanoprecipitación	47
5.1	Gráficos de superficie de respuesta para la metodología emulsión evaporación de solvente.	60
5.2	Gráficos de superficie de respuesta para la metodología doble emulsión. . .	61
5.3	Gráficos de superficie de respuesta para la metodología nanoprecipitación. .	61
5.4	Optimización de los parámetros de formulación para la metodología emulsión evaporación de solvente	62
5.5	Micrografías de fuerza atómica de nanopartículas de PLGA.	63
5.6	Curva de calibración y linealidad	64
5.7	Cromatograma de PLGA y rhein	66

5.8	Perfil de liberación dependiente del tiempo para rhein encapsulado en nanopartículas y rhein como fármaco libre (disolución).	67
5.9	Efecto de la concentración de nanopartículas poliméricas cargadas con rhein y nanopartículas poliméricas blancas sobre la viabilidad celular.	69
5.10	Curva de calibración para la determinación de IL-1 β	70
5.11	Efecto de nanopartículas poliméricas cargadas y nanopartículas poliméricas blancas sobre la producción de IL-1 β	71
5.12	Curva de calibración para la determinación de TNF α	72
5.13	Efecto de nanopartículas poliméricas cargadas y nanopartículas poliméricas blancas en la inducción de formación intracelular de ROS.	73
6.1	Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología emulsión evaporación de solvente.	75
6.2	Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología doble emulsión.	76
6.3	Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología nanoprecipitación.	76

ÍNDICE DE TABLAS

4.1	VARIABLES INDEPENDIENTES DEL DISEÑO FACTORIAL PARA LA TÉCNICA EMULSIÓN EVAPORACIÓN DE SOLVENTE.	48
4.2	VARIABLES INDEPENDIENTES DEL DISEÑO FACTORIAL PARA LA TÉCNICA DOBLE EMULSIÓN.	48
4.3	VARIABLES INDEPENDIENTES DEL DISEÑO FACTORIAL PARA LA TÉCNICA NANOPRECITACIÓN.	48
4.4	VARIABLES DEPENDIENTES PARA TODAS LAS TÉCNICAS EVALUADAS.	49
4.5	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RHEIN.	51
5.1	RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES PARA TODAS LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON RHEIN.	60
5.2	PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON RHEIN OBTENIDAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE EMULSIÓN EVAPORACIÓN DE SOLVENTE.	63
5.3	CURVAS DE CALIBRACION PARA LA OBTENCIÓN DE LOD Y LOQ.	64
5.4	CONCENTRACIONES Y RSD PARA LA DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD.	65
5.5	CONCENTRACIONES Y RSD PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA	65
5.6	PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS PARA LA EXACTITUD.	66

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción general de la osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una de las enfermedades articulares más comunes a nivel mundial, además de ser la forma más común de las enfermedades reumáticas crónicas [1, 2]. Se caracteriza por inflamación e importantes cambios estructurales en la articulación, causando dolor y discapacidad funcional [2]. La OA puede ocurrir en cualquier articulación sinovial del cuerpo, pero es más común en manos, rodillas y cadera [3].

1.2 Prevalencia e incidencia

Las tasas de prevalencia e incidencia reportadas en estudios epidemiológicos varían ampliamente, debido a que estas estimaciones dependen de cómo se hayan definido los casos (OA patológica, radiográfica o clínica), de la población estudiada y la articulación afectada [4]. A nivel mundial, la prevalencia de la OA se encuentra en el rango de 12.3% [5] a 21.6% [6]. La enfermedad es más común en mujeres que en hombres [2, 5]. Se ve incrementada indefinidamente con la edad, debido a que es una condición no reversible [2, 5, 7–9], y es mayor en países desarrollados que en países en vía de desarrollo [2, 10]. En Chile, los datos

de autoreporte obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud realizada el año 2003, revelan que un 3.8% (alrededor de 500.000 pacientes) de la población presentaría algún tipo de artrosis, siendo más frecuente en mujeres y mayores de 60 años. Para el año 2010, en el ámbito nacional, 21.54% de las personas mayores de 55 años presentaron dolor de rodilla no traumático de intensidad mayor o igual a 4 (siendo 0 sin dolor y 10 máximo dolor) en los últimos 7 días, cuya duración se extendió por más de 6 meses. Por otra parte, el dolor de cadera corresponde a un 10.53%; en ambos casos las mujeres presentan significativamente mayor prevalencia que los hombres [11]. El año 2014, un estudio español que incluyó a más de 3 millones de personas, reportó tasas de incidencia para OA clínica de 6.5, 2.4 y 2.1 por cada 1000 personas-año para rodilla, mano y cadera respectivamente [9], lo cual es más alto que las tasas encontradas en estudios de años anteriores [12].

Según el estudio de la OMS sobre la carga global de la enfermedad el año 2010, la prevalencia global de OA de rodilla sintomática confirmada por radiografía se estimó en el 3.8% [2]. La OA de cadera es menos común, la prevalencia global de OA de cadera sintomática confirmada por radiografía fue de 0.85% [2]. Se prevé un aumento sustancial en la incidencia de la OA de cadera y rodilla para las próximas décadas [5, 7, 13], debido al envejecimiento de la población en los países desarrollados y en los países en vía de desarrollo, así como el aumento de los factores de riesgo de la OA, en particular la obesidad y un estilo de vida sedentario [14].

1.3 Factores de riesgo para la OA

La OA es el resultado de una interacción compleja entre factores mecánicos, celulares y bioquímicos, los cuales conducen a una etapa final patológica, ya que una serie de diversos factores de riesgo que actúen en conjunto, pueden causar la aparición de OA en cualquier individuo [15].

Los factores de riesgo de la OA se pueden dividir en factores individuales, incluyendo edad, género, obesidad, genética y dieta, y factores de la articulación los que incluyen lesión y carga anormal de las articulaciones [15].

1.3.1 Factores de riesgo individuales

Edad

La edad puede ser el principal factor de riesgo de la OA [16]. El mecanismo que conduce al daño articular no es completamente conocido, pero probablemente es multifactorial, incluyendo daño oxidativo, adelgazamiento del cartílago y disminución de la propiocepción. Además, los mecanismos celulares básicos que mantienen la homeostasis de los tejidos decaen con el envejecimiento, dando lugar a una respuesta inadecuada al estrés o lesión articular, resultando en la destrucción de tejidos articulares [17].

Género

La prevalencia de OA de rodilla, mano y cadera es mayor en mujeres que en hombres, y la incidencia aumenta alrededor de la menopausia [18]. Varios autores postulan que algunos factores hormonales tienen un rol en el desarrollo de OA. Sin embargo, los resultados son discutibles [19], y la disparidad entre hombres y mujeres podría ser explicada por diferencias en otros factores como volumen de cartílago reducido, alineación de articulaciones, laxitud de ligamentos, resistencia ósea o fuerza neuromuscular [15].

Obesidad

La obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes y mejor establecidos para la OA. Definida como un índice de masa corporal (IMC) $> 30 \text{ kg/m}^2$, está fuertemente asociada con OA de rodilla, mientras que la relación entre el sobrepeso (IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$) y OA de rodilla es menor, sin embargo sigue siendo significativa [20]. Se ha observado

que el aumento de 5 unidades de IMC, incrementa el riesgo asociado de OA de rodilla en un 35%, siendo la magnitud de la asociación significativamente mayor para las mujeres que para los hombres [21]. Se ha estimado que en pacientes con nueva aparición de dolor de rodilla, 24.6% de los casos fueron relacionados a sobrepeso u obesidad [20]. Diversos estudios mostraron que la pérdida de peso mejora el dolor y la función articular, y disminuye la inflamación de bajo grado [22]. El estudio Framingham estimó que una reducción de 5 kg de peso disminuye el riesgo de desarrollar OA de rodilla en un 50% en mujeres con un $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ [23]. La obesidad también es asociada con OA de la mano [24], por lo que el impacto de la obesidad puede no ser solo biomecánico, sino también tener efectos sistémicos metabólicos e inflamatorios. Esta hipótesis es reafirmada por la literatura reciente que muestra una asociación entre la OA y el síndrome metabólico [25]. La relación entre el peso corporal y la OA de cadera es inconsistente y más débil que con OA de rodilla o mano [24].

Genética

Todas las formas de OA parecen estar fuertemente determinadas por factores genéticos, los que representan al menos el 60% de la OA de cadera y mano, y hasta el 40% de OA de rodilla [26]. Muchos genes han sido identificados desempeñando un papel en las vías fisiopatológicas de la OA, y por lo tanto, pueden contribuir al riesgo de OA. Genes para receptores de vitamina D, factores de crecimiento insulínico tipo 1 [16], colágeno tipo 2 [27] y factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5) [28], pueden proporcionar dianas para futuros enfoques farmacéuticos.

Dieta

Un bajo nivel de factores dietéticos, incluyendo el déficit de vitaminas D, C y K pudiesen aumentar el desarrollo de OA [29–32]. Sin embargo, aún no se ha encontrado evidencia

de que una alta ingesta de cualquiera de los mencionados nutrientes antioxidantes reduzca la incidencia de OA de rodilla [30]. Se necesita realizar más estudios para definir mejor la relación entre la OA y estos factores dietéticos.

1.3.2 Factores de riesgo de la articulación

Lesión

Una de las articulaciones más frecuentemente lesionada es la rodilla. La ruptura del ligamento cruzado anterior (ACL) conlleva a la aparición temprana de OA de rodilla en el 13% de los casos después de 10 a 15 años de la lesión inicial. Cuando esta ruptura se asocia a daños en cartílago, hueso subcondral, ligamentos colaterales y/o meniscos, lo cual es observado en aproximadamente el 65 a 75% de lesiones del ACL de rodilla, la prevalencia de OA de rodilla aumenta entre un 21 y 40% [33, 34].

Carga anormal de las articulaciones

El uso repetitivo de la articulación se ha asociado a un mayor riesgo de OA. Individuos cuyas ocupaciones requieren sentarse en cuclillas o arrodillarse tienen el doble de riesgo de desarrollar OA de rodilla en comparación a individuos con ocupaciones que no requieren actividad física, particularmente entre aquellos que presentan sobrepeso o cuyos trabajos involucren mover o levantar objetos [35]. La OA de cadera se ha asociado a ocupaciones que requieran estar de pie por tiempos prolongados o levantar objetos [36]. Actividades en que se necesite una mayor destreza manual se han asociado con OA de la mano [37]. Actividades físicas altamente repetitivas, intensas y de alto impacto pudiesen aumentar el riesgo de desarrollar OA de cadera y rodilla [15].

1.4 Patología de la OA

La articulación sinovial es una estructura intrincada que comprende varios tejidos conectivos, incluyendo cartílago articular, membrana sinovial, hueso subcondral, ligamentos y a algunas veces meniscos (Figura 1.1) [38]. Por lo general, el cartílago articular está constituido por cuatro áreas; superficial, media, profunda y calcificada. El cartílago articular superficial posee un alto contenido de agua y se compone de una red altamente estructurada de proteínas de matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno y proteínas no colágenas. La capa media contiene fibras de colágeno orientadas al azar con condrocitos de mayor tamaño. El estrato profundo está organizado en columnas verticales separadas por fibrillas colágenas. La última capa de cartílago articular se compone de cartílago calcificado con mineralización parcial y condrocitos hipertróficos [38]. La zona calcificada se separa de la zona profunda por un grueso haz de fibrillas de colágeno denominado línea de calcificación (tidemark) [39]. El hueso subcondral es la zona de la epífisis del hueso justo debajo del cartílago articular, e incluye la placa del hueso subcondral y el hueso trabecular subyacente. La placa ósea subcondral incluye la zona más profunda del cartílago articular, el cartílago calcificado y una delgada capa ósea cortical [40].

La primera hipótesis fisiopatológica relacionada con la OA fue ante todo mecánica, basada en un proceso degenerativo asociado a la edad del cartílago articular. Las articulaciones jóvenes, sin embargo, también pueden presentar algunas lesiones erosivas del cartílago clínicamente benignas, caracterizadas por una lenta evolución. La frecuencia y la precocidad de estas lesiones contrastan con el proceso degenerativo lento descrito clásicamente durante el desarrollo de OA en pacientes ancianos. Esta consideración reciente hace que la fisiopatología de la OA sea más compleja que un proceso degenerativo dependiente de la edad del cartílago articular y ya no puede considerarse como una sola enfermedad. Debe ser visto como un grupo y tal vez el término enfermedades osteoartríticas sería más adecuado [41]. Por lo tanto,

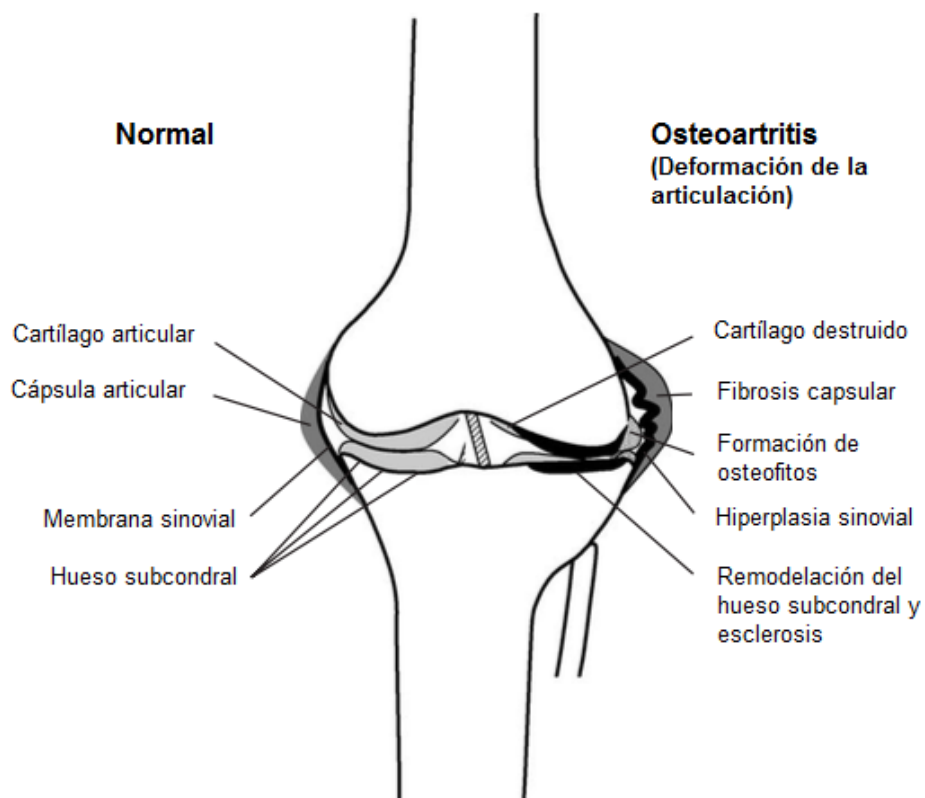


Fig. 1.1 Representación esquemática de las principales estructuras de una articulación sana (izquierda) y una desgastada (derecha) en la OA. Fuente: Osteoarthritis: Pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2006; 58(2): 128-149.

la OA se considera actualmente una enfermedad osteoarticular degenerativa con múltiples objetivos afectados, incluyendo cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral.

1.5 OA temprana

La investigación de la OA temprana ha sido desafiante debido al largo desarrollo de la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas. El primer cambio observado en el desarrollo de la OA es una pérdida de agregado de las capas externas del cartílago articular [42]. Variaciones en los niveles de proteoglicanos provocan cambios en el comportamiento de la tumefacción del cartílago y puede conducir a edema. El edema ocasiona el estiramiento y adelgazamiento del colágeno, lo que hace que las fibras sean más susceptibles a la fractura [43]. El quiebre de las fibras conduce a la formación de grietas superficiales, siendo la fibrilación superficial uno de los primeros cambios macroscópicos observados en la OA [44].

Los condrocitos contrarrestan la disminución de los niveles de proteoglicanos, al aumentar la síntesis y eliminar componentes dañados del cartílago, incrementando los procesos anabólicos y catabólicos en un intento de reparar el cartílago [45].

1.6 Progresión a OA clínica

En la OA temprana se observa aumento en niveles de factores anabólicos que median la reparación del cartílago. Estos incluyen el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) [46, 47]. A medida que la OA avanza, estos factores se ven abrumados por importantes aumentos de las citoquinas catabólicas [48, 49].

Con el tiempo la reparación puede llegar a ser ineficaz, ya sea debido al declive de los condrocitos o al daño adicional al cartílago [50]. Esto causa una declinación en la calidad del cartílago, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a nuevos daños. El daño repetido

puede causar eventualmente una desregulación del proceso de reparación y conducir a una mayor degradación. Se ha sugerido que a un nivel molecular, la activación de MMP-13 es de importancia. La activación se produce debido a la depleción del agregado alrededor de los condrocitos, permitiendo que las fibrillas de colágeno interactúen con un receptor que activa la MMP-13 [51].

1.7 Citoquinas

Un factor de importancia en la OA es la señalización anormal de citoquinas. La interleuquina- 1β (IL- 1β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) son las principales citoquinas presentes en la OA, y se presentan en mayores niveles durante la enfermedad [49, 52]. La IL- 1β y el TNF α provocan destrucción del cartílago tanto de forma individual como sinérgica, ya que sus efectos combinados exceden los individuales [53]. La IL- 1β y el TNF α son expresados por condrocitos y macrófagos sinoviales. Estas citoquinas causan un aumento en la expresión de enzimas degradadoras de la matriz extracelular [46, 54, 55]. También provocan la activación y sobreexpresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los condrocitos [56, 57]. Además inducen la liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo especies reactivas del oxígeno (ROS) [58], prostaglandina E₂ (PGE₂), IL-6, IL-17, IL-18 y factor inhibidor de leucemia (LIF) [52, 59–63].

Otras citoquinas pro-inflamatorias también están implicadas en la OA, incluyendo la oncostatina M (OSM) [64], IL-8 [52, 59, 65], algunas prostaglandinas [61, 66] y el leucotrieno B₄ [60, 66]. Normalmente existe un equilibrio entre las citoquinas pro- y antiinflamatorias. Este balance es interrumpido adicionalmente en la OA debido a reducciones en citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-4, IL-10, IL-13 y antagonista del receptor de IL-1 (IL-1 Ra) [52, 67, 68].

1.8 Enzimas en OA

Las enzimas son responsables de la mayor parte de la degradación observada en la osteoartritis. Estas son, en su mayoría, enzimas naturalmente involucradas en el recambio del cartílago, siendo de mayor responsabilidad, las familias metaloproteinasas de matriz (MMP) y las metaloproteinasas con actividad de desintegrina con motivos de trombospondina (ADAMTS) [48, 69]. Además, existe evidencia de un aumento de enzimas de la familia catepsina en OA [70, 71]. Enzimas glucosidasas pueden participar en menor medida en la degradación de agrecano [72].

Las MMP desempeñan un papel destructivo en la OA al escindir proteínas estructurales de la matriz extracelular. Se ha demostrado que el fluido sinovial en OA contiene fragmentos de agrecano generados por MMP y escisión de agrecanasa [73]. Altos niveles de MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13 están presentes en el fluido sinovial en OA, mientras que no son detectables en fluido sinovial sano [74–76]. ADAMTS-4 y ADAMTS-5 han demostrado desempeñar un papel en la destrucción en la articulación afectada por OA [43, 77].

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) son reguladores naturales de la actividad de MMP [69]. Se conocen cuatro TIMPs que presentan actividad respecto a diferentes MMPs, y además, el TIMP-3 también es activo contra ADAMTS-4 y ADAMTS-5 [78]. TIMP-1 es el más expresado de los TIMPs en la articulación [77], y esta expresión se ve reducida en la OA [77, 43]. El aumento en los niveles de MMP excede la capacidad inhibitoria de los TIMPs, contribuyendo a la degradación observada en la OA.

1.9 Inflamación sinovial

La inflamación es un patrón protector de la respuesta controladora del daño tisular que ocurre como resultado de un daño patógeno, traumático o tóxico. El proceso inflamatorio está gobernado tanto por moléculas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias que requieren tipos

celulares reconocidos y factores diversos que actúan de manera coordinada, para regular la quimiotaxis celular, migración y proliferación que conduce a la reparación tisular [79].

Bajo condiciones fisiológicas normales, la inflamación está estrictamente regulada y modulada por las acciones de proteínas solubles (citoquinas y factores de crecimiento) que actúan en las células inflamatorias, fibroblastos y células del endotelio vascular del sitio afectado [80]. Cuando la inflamación no se regula adecuadamente, el equilibrio se aleja de los procesos de iniciación de la curación hacia la incidencia de inflamación persistente [81].

La OA se caracteriza por una inflamación localizada en una o varias articulaciones, y no causa una inflamación sistémica de éstas como la artritis reumatoide. Sin embargo, durante la OA, una gran cantidad de células del sistema inmune se infiltran en el espacio articular afectado, localizando en esta zona grandes cantidades de citoquinas inflamatorias [61, 75, 82, 67].

La inflamación sinovial puede ser iniciada y controlada por fragmentos moleculares de la destrucción del cartílago [65, 83]. Estos fragmentos pueden conducir a la activación y proliferación de células del revestimiento sinovial [48, 84]. A menudo se observa una hiperplasia sinovial moderada en la OA temprana, la que se convierte en una sinovitis general a medida que la enfermedad progresa [48, 85].

Numerosos estudios demuestran la importancia de las citoquinas y otros factores solubles como mediadores de importancia en la inflamación sinovial. La membrana sinovial inflamada es también una fuente importante de citoquinas y enzimas en la OA [74, 49].

Las células inflamatorias juegan un papel importante en la progresión de la OA. Las articulaciones afectadas por OA primaria presentan una infiltración generalizada de linfocitos T colaboradores (T helper cells), linfocitos T reguladores, linfocitos B, macrófagos y granulocitos [86, 87]. Los mastocitos están presentes naturalmente en la articulación para proporcionar una respuesta inmune [88] y se ha visto que se activan y aumentan en número en la OA [88]. Los mastocitos pueden participar en el mantenimiento de la sinovitis crónica

en OA, ya que la acumulación de éstos está asociada con muchos estados de inflamación crónica [89].

La sinovitis causa una reestructuración dentro de la sinovia. La angiogénesis está estrechamente relacionada con la inflamación en todo el cuerpo y se ha observado en la inflamación de la sinovia osteoartrítica [90]. Esta angiogénesis es impulsada por los factores pro-angiogénicos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [91], y una menor contribución de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia(HIF-1 α) [92]. A medida que el VEGF provoca la remodelación tisular, incrementa la expresión de las MMPs [93]. La remodelación del sistema linfático también se ha observado en la OA al extenderse los vasos linfáticos más hacia la capa subíntima [94].

Las adipocinas o adipocitoquinas (resistina, leptina y adiponectina) son proteínas secretadas por el tejido adiposo blanco, las cuales también presentan un rol en la OA [95, 96]. Son reguladores esenciales de respuestas inmunes e inflamatorias. Estas tres adipocinas han sido detectadas en el líquido sinovial de articulaciones afectadas por OA. Por lo tanto, el tejido graso contribuye en gran medida a los procesos inflamatorios y degenerativos durante la OA.

1.10 Condrocitos

El condrocito es el único tipo de célula que reside en la matriz del cartílago adulto. Presenta una baja actividad metabólica, sobreviviendo bajo condiciones de relativa hipoxia y en ausencia de suministro vascular. El condrocito, que es responsable en última instancia de la remodelación y el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la matriz del cartílago, posee escasa capacidad regenerativa [97].

Los condrocitos en OA pueden cambiar de su forma inactiva, y sufrir apoptosis o división anormal u obtener un fenotipo alterado [48, 98]. El cambio fenotípico más común es la diferenciación, ya que esta puede ser inducida por la IL-1 β y el TNF- α [48, 99]. La diferenciación hace que los condrocitos cambien a una célula más similar a un fibroblasto, lo

que conduce a cambios en la expresión génica. Los genes específicos del cartílago ya no se expresan y otros genes se expresan de manera anómala [100, 101]. Por ejemplo, los colágeno tipo I y III, así como tenascina se han detectado en el cartílago con OA [102, 103].

La proliferación anormal de condrocitos se produce en un intento de reparar el cartílago y conlleva a que las células en OA a menudo se encuentren agrupadas en racimos [98, 104]. La acumulación de componentes de la matriz en los condrocitos puede conducir a su apoptosis [105, 106].

1.11 Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), altamente tóxicas, son producidas por procesos metabólicos en las mitocondrias. En general son radicales libres y contienen un electrón desemparejado, sin embargo algunos ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no son radicales [107]. El superóxido (O_2^-) es un ROS producido en la mitocondria. La cantidad de radical superóxido en la célula es controlada por la superóxido dismutasa (SOD) que la reduce a peróxido de hidrógeno, que a su vez es eliminado por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa [108]. El superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar juntos en presencia de metales de transición para formar los altamente perjudiciales radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y peróxilo ($ROO\cdot$) [108].

Existe abundante evidencia de los efectos de ROS en la OA. El daño oxidativo en el cartílago aumenta con la edad y etapa de la OA [108]. Esto sugiere que ROS y el estrés oxidativo desempeñan un papel en la OA y senescencia de condrocitos [109]. Otra evidencia es la mayor actividad de SOD en el líquido sinovial en OA, la cual es una enzima inducible e indicaría un aumento en los niveles de radicales [110]. $IL-1\beta$, y en menor medida $IL-6$, desregulan las defensas enzimáticas antioxidantes en los condrocitos [58]. Los ROS también están asociados con sitios de inflamación a medida que se producen en la explosión oxidativa

asociada con la fagocitosis [108], por lo que es probable que los ROS tengan un papel en el mantener la sinovitis en OA.

Otro radical producido en las células es el óxido nítrico (NO). Es una especie de nitrógeno reactivo que tiene un papel importante en la señalización celular. El óxido nítrico es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que tiene tres isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). Los condrocitos expresan tanto eNOS como iNOS [109]. Se ha descubierto que los $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-}\beta$ causan sobreexpresión de iNOS en condrocitos [109], Siendo $\text{IL-1}\beta$ de mayor potencia [111]. El estrés mecánico también induce la producción de NO [109]. Estos factores conducen a un aumento de los niveles de NO en la OA. Se ha observado que el NO inhibe la síntesis de colágeno y proteoglicano [109, 111], activa MMPs [111], induce la apoptosis del condrocito [111–113] y causa insensibilidad a los efectos anabólicos de IGF-1 [109].

1.12 Retroalimentación

El desarrollo de la OA avanzada genera un círculo vicioso, el cual propaga y mantiene la enfermedad [65]. Fragmentos de matriz en el líquido sinovial llevan a la activación de condrocitos y sinoviocitos, ocasionando la producción de diversos factores tales como: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y enzimas hidrolíticas [53, 61, 65]. Esto es apoyado por la evidencia de que los fragmentos de colágeno regulan al alza la expresión de MMP-2, MMP-9 y MMP-13 por parte del condrocito [114]; Catepsinas B, L y K [115]; $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-8 [116]. Estos factores solubles causan daño adicional al cartílago, liberando más fragmentos y propagando así el ciclo. Este ciclo puede potenciarse adicionalmente mediante la acción autócrina de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ [117].

1.13 Tratamientos actuales

Actualmente existen tratamientos farmacológicos utilizados contra la OA, pero ninguno es capaz de curar esta enfermedad y revertir el daño de las articulaciones. Entre los tratamientos no farmacológicos, los más ampliamente utilizados son la reducción de peso, fortalecimiento muscular, estimulación nerviosa eléctrica transcutánea y acupuntura [118–121].

Los tratamientos de primera línea más comunes para la OA son el paracetamol y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) tópicos. El paracetamol es la primera opción terapéutica, tanto en OA de cadera como rodilla, el cual debe ser usado en dosis y por tiempo apropiado. Es un analgésico sin efectos antiinflamatorios potentes, es considerado como el fármaco de primera línea en el tratamiento de la OA de rodilla, estando su seguridad comprobada en el uso a largo plazo [122]. Se prefiere a un AINES en su forma oral debido a su mayor perfil de seguridad a largo plazo, particularmente en relación al tracto gástrico [123].

Si estos tratamientos no son suficientes para aliviar el dolor, normalmente se considera un inhibidor de ciclooxigenasa 2 (COX-2) [124]. Estos son fármacos que mediante la inhibición de enzimas COX controlan el proceso inflamatorio y la cascada del dolor. Han demostrado ser más efectivos que placebo y que el paracetamol en el tratamiento del dolor, funcionalidad y rigidez. Las recomendaciones actuales son su utilización en pacientes que no responden al paracetamol, ya que presentan potenciales efectos deletéreos en su uso a largo plazo [125]. Dentro de este grupo de fármacos se encuentra el meloxicam, celecoxib, rofecoxib, entre otros.

Otro tipo de tratamiento comprende la administración complementaria de corticoides intraarticulares [126]. Estos grupo de fármacos son agentes antiinflamatorios utilizados históricamente para la OA por su capacidad de disminuir el fenómeno inflamatorio, y a través de esto disminuir la sintomatología. Estudios en animales han demostrado que bajas dosis de corticoides intraarticulares normalizan la síntesis de proteoglicanos y reducen el

daño condral. Sin embargo, al evaluar el uso clínico los corticoides intraarticulares solo han demostrado un efecto beneficioso en el corto plazo para el alivio del dolor (una semana postratamiento), en comparación con placebo, pero en el largo plazo no demuestra efectos beneficiosos y pudieran incluso inducir un aumento del daño condral e incrementar el riesgo de infección articular [127, 128].

Los opioides sólo se usan cuando otros tratamientos han fracasado o están contraindicados [129]. Finalmente, la capsaicina es un tratamiento tópico alternativo que proporciona alivio del dolor [130].

1.13.1 Fármacos modificadores del curso de la enfermedad

El último objetivo para el tratamiento de la OA ha sido encontrar agentes que puedan reducir o detener la progresión de la enfermedad. Hasta el momento, este tipo de tratamiento no ha sido aprobado por las autoridades reguladoras al no satisfacer la totalidad de directrices y criterios apropiados. Sin embargo, un número de agentes presentan varias propiedades interesantes, incluyendo una baja incidencia de efectos secundarios, un efecto prolongado de varias semanas y algunos tienen un efecto aditivo con los AINES. Estos incluyen la glucosamina [131, 132], el condroitín sulfato [133, 134] y la diacereína [135] en administración oral y el ácido hialurónico en administración intraarticular [136].

La glucosamina y condroitín sulfato son compuestos que participan en la formación de la síntesis de proteoglicanos de la matriz extracelular. Ambos medicamentos son administrados por vía oral. Según la evidencia disponible pudieran tener un rol limitado en el tratamiento sintomático de la OA, pero no hay estudios que demuestren consistentemente la modificación de la progresión de la enfermedad [137].

Otro grupo de fármacos modificadores de enfermedad son los medicamentos de residuos insaponificables, como por ejemplo los lípidos insaponificables aguacate-soya (ASU). Estos fármacos han demostrado *in vitro* la capacidad de inhibir la interleuquina 1 y de estimular la

actividad sintética de los condrocitos articulares. Sin embargo, existen reportes contradictorios en relación con su utilidad en la disminución o detención de la progresión del fenómeno artrósico [138]. Debido a la lógica biológica y a los estudios de ciencias básicas el enfoque actual incluye su utilización con precaución [139].

Los nutraceuticos están dentro de las alternativas terapéuticas naturales con eventuales efectos antiartrósicos, y destacan numerosos compuestos nutraceuticos los cuales comparten entre sus efectos capacidades antioxidantes. Se han reportado estudios *in vitro* en los que se demuestran interesantes efectos en relación con mejorar el ambiente del cartílago articular, principalmente por la estimulación de vías metabólicas anabólicas. Dentro de los que cuentan con mayor evidencia científica está el resveratrol y el té verde, los cuales se han evaluado en modelos de OA. Estos polifenoles inhiben vías de señalización intracelular que estimulan efectos proinflamatorios capaces de inducir daño condral, mecanismo por el cual pudieran ser útiles [140]. No han sido considerados en varios esquemas terapéuticos actuales debido a la falta de estudios de mejor calidad.

El ácido hialurónico (HA) es un glucosaminoglucano no sulfatado encontrado en grandes cantidades en la matriz extracelular y el líquido articular. Es producido principalmente por condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos. Su función es captar moléculas de agua, otorgándole elasticidad y contribuyendo así a la función de distribución de la carga propia de las articulaciones. Posee efectos lubricantes, de barrera mecánica, antiinflamatorio, analgésico y condroprotector demostrados por estudios *in vitro* e *in vivo*, promoviendo la proliferación condral y la síntesis de componentes de la matriz extracelular. La evidencia disponible señala que el HA por vía intraarticular es efectivo en aproximadamente el 60% de los pacientes con OA de rodilla en generar una mejoría sintomática [141, 142]. Existen diversos esquemas de tratamiento (inyección única versus ciclos de menor dosis repetidos), pero se acepta que puede ser repetido el tratamiento cada 6 meses. Es una buena alternativa terapéutica, siendo su alto costo un factor limitante para su uso masivo.

El plasma rico en plaquetas es una fuente natural de citoquinas obtenidas a partir de las plaquetas, las cuales almacenan más de 60 factores de crecimiento en sus gránulos- α , los que posteriormente son liberados al medio extracelular regulando diferentes procesos biológicos. En relación con la OA de rodilla existe evidencia de que sintomáticamente tiene mejores resultados que el HA en los pacientes con OA [143, 144], sin embargo su alto costo hace compleja su utilización en la práctica clínica actual.

1.14 Diacereína y rhein

Se ha demostrado que la diacereína, un derivado antraquinónico, inhibe *in vitro* e *in vivo* la producción y la actividad de la citoquina IL-1 β [145, 146]. Esto evita que el efecto de IL-1 β reduzca la producción de macromoléculas específicas del cartílago. La diacereína disminuye igualmente la secreción estimulada por IL-1 β de metaloproteinasas y agreganasas, y de este modo evita la descomposición del cartílago producida por estas enzimas [147]. Sin embargo, en su administración por vía oral, se asocia con un mayor riesgo de diarrea severa y los beneficios sintomáticos después de 6 meses sigue siendo desconocidos [145].

La diacereína debe ser metabolizada en su totalidad a rhein, su metabolito activo (Figura 1.2), antes de alcanzar la circulación sistémica para ejercer su efecto terapéutico. El rhein se elimina por la vía renal (20%) o es conjugado en el hígado a rhein glucurónido (60%) y rhein sulfato (20%). Estos metabolitos son eliminados mayormente también via renal [148].

El rhein (ácido antraquinon-4,5-dihidroxi-2-carboxílico) es una antraquinona lipofílica encontrada extensamente en hierbas medicinales, tales como *Rheum palmatum L.*, *Cassia tora L.*, *Polygonum multiflorum* y *Aloe barbadensis*. Presenta variados efectos farmacológicos, incluyendo actividad hepatoprotectora [149–152], actividad nefroprotectora [153–155], actividad condroprotectora [156–162], actividad antiinflamatoria [163, 164], actividad antioxidante [165, 166], actividad anticancerígena [167–169], actividad antidiabética [170–172] y actividad antimicrobiana [173, 174].

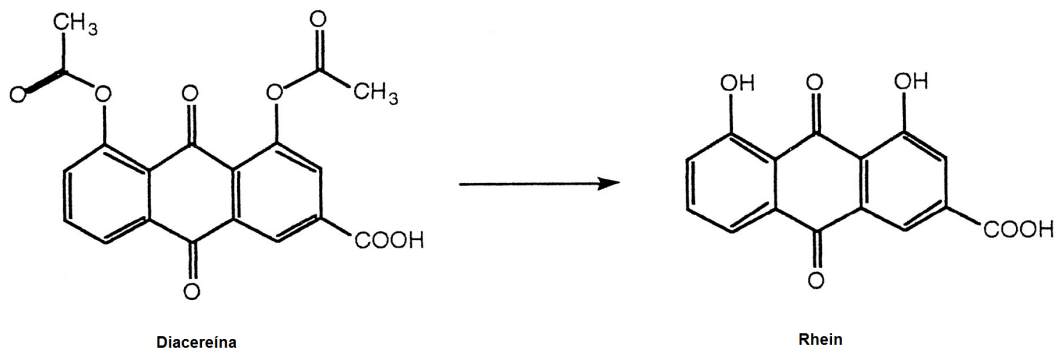


Fig. 1.2 Estructura química de la diacereína y su metabolito rhein. Fuente: Elucidation of Phase I and Phase II Metabolic Pathways of Rhein: Species Differences and Their Potential Relevance. *Drug Metab Dispos.*, 1997; 25(4): 442-452.

1.14.1 IL-1 β

La evaluación de los efectos del rhein, en la producción de IL-1 β en la membrana sinovial y en el cartílago en OA humana, mostró que ambas moléculas (diacereína y rhein), disminuían significativamente la síntesis de esta citoquina [175]. La IL-1 β se sintetiza en la célula como un precursor biológicamente inactivo, el que requiere una escisión proteolítica para permitir su activación y la salida de la célula. Esto se consigue a través de una proteasa altamente selectiva, la enzima convertidora de IL-1 (ICE), también denominada caspasa-1. En consecuencia, la acción de ICE en IL-1 β parece ser un factor limitante clave para la secreción y actividad de esta citoquina. ICE ha demostrado ser expresado y sintetizado por la membrana sinovial humana y el cartílago y sus niveles son elevados durante el proceso de OA [176]. Rhein disminuye notable y significativamente la producción de ICE en el cartílago [160]. La activación biológica de las células por citoquinas está mediada por una asociación con receptores específicos de la superficie celular. Para la IL-1 β , esto ocurre a través de la unión a dos tipos de receptores específicos de membrana, los receptores tipos I y II, y se ha demostrado que el receptor tipo I es responsable de la mediación de la señal. Además se encontró que los niveles de este tipo de receptor aumentan marcadamente en los condrocitos y fibroblastos sinoviales en OA, potenciando así el efecto de la actividad de

IL-1 β [117, 177, 178]. La investigación de los efectos del rhein sobre los niveles de unión y receptores en los condrocitos humanos en OA muestra que, a concentraciones terapéuticas, éste inhibe significativamente el nivel de unión a IL-1. El análisis de los experimentos de unión competitiva revela que tanto los condrocitos en OA tratados, como los no tratados tienen afinidades de unión a IL-1 similares, pero la densidad del receptor, o el número de receptores, se reduce significativamente por acción del principio activo [175].

1.14.2 Enzimas degradadoras, óxido nítrico y macromoléculas de la matriz del cartílago

Estudios muestran que el rhein inhibe significativamente la actividad de MMP-3 y colagenasa estimulada por IL-1 β [156, 162, 179, 180]. Respecto a los ADAMTS, rhein provoca una marcada inhibición de ADAMTS-4 y ADAMTS-5 estimulada por IL-1 β [156].

Rhein disminuye marcada y significativamente la producción de óxido nítrico inducida por IL-1 β [162, 175]. Además, reduce la expresión y los niveles de producción de iNOS [175].

Rhein disminuye el efecto inhibitorio de IL-1 sobre la síntesis de colágeno y proteoglicanos [162, 181–183], mediante la estimulación de la expresión del TGF- β 1 [184], debido a que contrarresta la regulación a la baja de la síntesis de matriz por IL-1 β [185].

1.15 Terapia intraarticular

La administración intraarticular es una vía de administración de interés para la OA y actualmente es utilizada en la terapia de primera línea. La inyección intraarticular ha permitido la administración local de fármacos en el espacio articular y, en consecuencia, reducir la toxicidad sistémica y mejorar la biodisponibilidad del fármaco. La reducción de los efectos secundarios es de particular importancia para la OA, ya que esta es una enfermedad crónica

por lo que existe una necesidad de tratamientos bien tolerados a largo plazo [186]. Sin embargo, sigue siendo inadecuada debido a la rápida salida de los fármacos del espacio articular. Las moléculas pequeñas salen a través de la abundante red capilar sinovial, mientras las macromoléculas de gran tamaño son eliminadas por el sistema linfático [187, 188]. La breve vida media de los AINES en el líquido sinovial ha sido reportada entre 1 y 4 horas [189, 190]. Además, la inyección intraarticular puede requerir dosis altas de fármaco para conseguir un gradiente de concentración lo suficientemente alto para la difusión del fármaco hacia el cartílago.

La administración intraarticular es una vía físicamente complicada para la administración de moléculas activas, incluso con profesionales experimentados existe el riesgo de infección o que la inyección sea situada incorrectamente. La correcta localización de las inyecciones puede asegurarse mediante técnicas de imagen, sin embargo esto aumenta el costo y la complejidad [191]. La aspiración del líquido sinovial antes de la inyección intraarticular es un medio más fácil de asegurar una correcta localización y presenta varios beneficios, ya que reduce el edema en la articulación, reduciendo así la presión y el malestar [191, 192]. Una buena práctica estéril y el evitar la inyección a través de piel inflamada pueden reducir el riesgo de infección a niveles aceptables [186, 192]. Estos desafíos significan que es recomendable limitar la frecuencia de administración por inyección intraarticular, lo que crea una necesidad de formulaciones de liberación sostenida que actualmente no se ha alcanzado [193].

1.15.1 Sistemas para administración intraarticular de fármacos

Se han investigado varios sistemas avanzados de administración de fármacos para la entrega intraarticular, entre ellos las nanopartículas, microesferas y liposomas. Estos sistemas han seguido varios métodos para mejorar la administración de fármacos, desde dirigir el sistema para su captación por macrófagos sinoviales y así evitar la liberación a la circulación sistémica,

hasta intentos de proveer una liberación sostenida de fármaco, ya sea aumentando el tiempo de permanencia en el líquido sinovial, lo que en la mayoría de los casos se realizó utilizando partículas demasiado grandes para ser incorporadas por fagocitosis, aunque también se han generado sistemas que se adhieren o penetran en la matriz del cartílago o en el líquido sinovial [194–199].

Los sistemas de administración de fármacos para la administración intraarticular basados en partículas, se han centrado principalmente en micropartículas diseñadas para evitar la fagocitosis debido a su tamaño. Estudios han demostrado que el límite de tamaño para la fagocitosis en la articulación es de alrededor de 10 a 15 μm [195–197]. Partículas de 15 μm son escasamente incorporadas por una minoría de células y partículas de 45 μm no son incorporadas en lo absoluto [196].

Se ha encontrado que diversos materiales utilizados en la producción de partículas son compatibles en la articulación, entre ellos el copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA)[193, 200], el poliácido-L-láctico (PLLA) [193, 201] y la albúmina [193, 201]. Algunos materiales que no son bien tolerados, por ejemplo, ciertos materiales sintéticos causan la síntesis de colagenasa, lo que conduciría a daños adicionales en las articulaciones [196].

1.16 Sistemas nanoparticulados

Los sistemas terapéuticos coloidales han sido ampliamente investigados por su potencial para mejorar la administración de una variedad de fármacos. Los fármacos encapsulados dentro de un portador coloidal pueden proporcionar un suministro de fármaco sostenido o dirigido. Hay muchos sistemas que se incluyen dentro de la categoría de portadores coloidales, siendo los sistemas más investigados los liposomas, micelas y nanopartículas poliméricas [202].

1.16.1 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales sólidos que varían aproximadamente entre 10 a 1000 nm de tamaño [203], y dependiendo del método de preparación, pueden obtenerse nanoesferas o nanocápsulas, con el agente terapéutico disuelto, atrapado, encapsulado o unido a la matriz polimérica (Figura 1.3). Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, en los que el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una capa de polímero, mientras que las nanoesferas son sistemas de tipo matricial donde el fármaco está física y uniformemente disperso [204]. Además, la sustancia activa también puede ser adsorbida en la superficie de ambos tipos de nanopartículas.

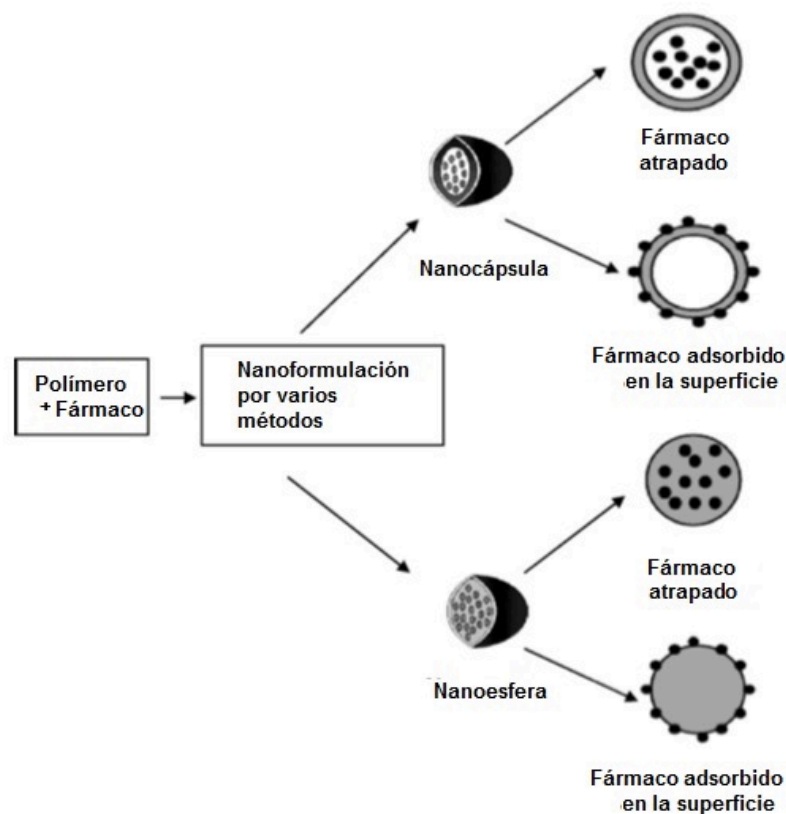


Fig. 1.3 Tipos de nanopartículas biodegradables. Según la organización estructural las nanopartículas biodegradables se pueden clasificar como nanocapsulas y nanoesferas. Las moléculas de fármaco se encuentran atrapadas en el interior o adsorbidas en la superficie. Fuente: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B.* 2010; 75(1): 1-18.

El rol de las nanopartículas poliméricas en los sistemas de administración de fármacos abarca múltiples aspectos, incluyendo la mejora de su estabilidad físicoquímica, la regulación del perfil de liberación del fármaco y la focalización terapéutica [205]. Además, la modificación de las propiedades fisicoquímicas y/o composición de su superficie hacen posible el desarrollo de nanopartículas multifuncionales con capacidad de dirigir y liberar controladamente agentes terapéuticos y diagnósticos. En consecuencia, mediante el uso de nanopartículas poliméricas se puede conseguir un amplio número de aplicaciones farmacéuticas y médicas, imposibles de alcanzar con los fármacos tradicionales.

Polímeros utilizados para la preparación de nanopartículas

Se han empleado diferentes polímeros, tanto sintéticos como naturales, para preparar nanopartículas poliméricas. Idealmente, todos los polímeros aplicados en el campo biomédico deben ser biocompatibles, no tóxicos, libres de impurezas lixiviables y fácilmente procesables [206]. En comparación con los polímeros naturales que tienen una duración relativamente corta de liberación del fármaco, los polímeros sintéticos presentan una liberación sostenida del agente terapéutico durante un período de días a varias semanas. Por el contrario, los polímeros sintéticos se ven limitados generalmente por la necesidad de utilizar solventes orgánicos y condiciones severas de formulación [207, 208]. Entre los polímeros naturales, los más utilizados son el quitosano y la albúmina. También se utilizan polímeros sintéticos tales como poli (ésteres), poli (alquil cianoacrilatos) y poli (anhídridos) [208].

Copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico

El copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) (Figura 1.4), es un tipo de poli (éster) que está aprobado por las principales agencias reguladoras (Food and Drug Administration, European Medicines Agency) y es empleado extensamente para la preparación de nanopartículas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [209, 210]. El PLGA se usa amplia-

mente como vehículo para diversos fármacos debido a su razón de degradación y sus buenas propiedades mecánicas, que pueden controlarse con precisión cambiando el peso molecular y la relación entre las porciones de ácido láctico y ácido glicólico. El PLGA es un copolímero biocompatible ya que los productos de degradación (ácidos monoméricos), son metabolitos que participan de los ciclos de asimilación clásicos, siendo eliminados posteriormente como dióxido de carbono y agua. Por lo tanto, el uso de PLGA se asocia a una toxicidad sistémica mínima para aplicación de biomateriales o administración de fármacos [207, 211].

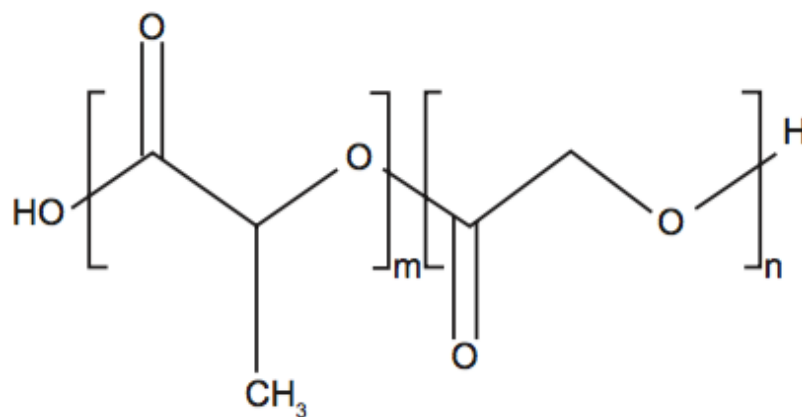


Fig. 1.4 Estructura química del PLGA. Donde la letra m, corresponde al número de unidades de ácido láctico, y la letra n, equivale al número de unidades de ácido glicólico. Fuente: polysciences.com

Dependiendo de la relación de copolímero y su peso molecular, el tiempo de degradación puede variar desde unos pocos meses hasta años. Esta capacidad de modificar la tasa de degradación del polímero conduce a otra característica atractiva de los nanosistemas basados en PLGA, que es la posibilidad de una liberación sostenida del fármaco y la adaptación de la cinética de liberación de acuerdo con la farmacocinética del fármaco encapsulado [211].

El PLGA se puede procesar en casi cualquier forma y tamaño, y puede encapsular moléculas de prácticamente cualquier tamaño. Es soluble en una amplia gama de solventes comunes, incluidos solventes clorados, tetrahydrofurano, acetona o acetato de etilo [212, 213].

Además de la composición y el peso molecular, la temperatura de transición vítrea de los copolímeros de PLGA, es una propiedad muy importante que se ha de tener en cuenta en la

preparación de las nanopartículas y es esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación. La temperatura de transición vítrea tiene relación directa con el peso molecular del biopolímero, ya que disminuye al reducir el peso molecular y el contenido láctico. La presencia de solventes orgánicos residuales o humedad en estos sistemas puede alterar la temperatura de transición vítrea en varios grados centígrados y llegar a un valor cercano a la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las nanopartículas y por consiguiente al perfil de liberación del fármaco [213, 214].

La resistencia mecánica del PLGA se ve afectada por propiedades físicas tales como el peso molecular y el índice de polidispersidad del polímero. Estas propiedades también afectan la capacidad de realizar una formulación como un dispositivo de administración de fármacos y pueden controlar la velocidad de degradación e hidrólisis del sistema. Sin embargo, estudios han encontrado que el tipo de fármaco también juega un papel en establecer la tasa de liberación [215].

Otra característica de las nanopartículas poliméricas de sumo interés es el potencial zeta, el cual es una medida de la carga de la partícula, como tal, y cuanto mayor es el valor absoluto del potencial zeta mayor es la cantidad de carga de la superficie. En cierto sentido, representa un índice de la estabilidad de las partículas. Para el caso de partículas cargadas, cuando el potencial zeta aumenta, las interacciones repulsivas serán de mayor magnitud lo que puede llevar a la obtención de nanosuspensiones más estables, ya que este efecto de repulsión va a evitar la formación de posibles agregados. Refleja el potencial eléctrico de las partículas y está influenciado por la composición de la partícula y el medio en el que se dispersa. Existen estudios que demuestran que la adición de polietilenglicol en la superficie de las nanopartículas provoca una reducción del potencial zeta negativo, lo que se traduce en un aumento de la estabilidad de las nanopartículas [216].

Las nanopartículas idealmente deben tener una alta eficacia de encapsulación, es decir, un alto porcentaje de fármaco cargado relativo a la cantidad total de fármaco utilizado para la formulación. Además necesitan presentar una alta carga de fármaco, es decir, un alto porcentaje de fármaco cargado relativo a la cantidad total de nanopartículas [207]. Uno de los principales inconvenientes de las nanopartículas basadas en PLGA se relaciona con una carga deficiente. En efecto, a pesar de que las nanopartículas basadas en PLGA presentan con frecuencia altas eficiencias de encapsulación, la carga de fármaco es generalmente escasa (alrededor del 1%). Esta baja carga constituye un problema importante para algunos fármacos al momento de diseñar nanopartículas basadas en PLGA.

El vehículo específico de suministro de fármaco, es decir el PLGA, debe ser capaz de administrar su carga útil con una duración, biodistribución y concentración apropiadas para el efecto terapéutico pretendido. Por lo tanto, los elementos esenciales del diseño, incluidos el material, la geometría y la ubicación, deben incorporar mecanismos de degradación y eliminación del vehículo, así como ingredientes farmacéuticos activos. Además, estudios sugieren que tanto el aclaramiento de sangre como la captación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) pueden depender de la dosis y la composición de los sistemas portadores de PLGA [217]. Además, algunas formulaciones de PLGA, como las nanopartículas, se acumulan rápidamente en el hígado, la médula ósea, los nódulos linfáticos, el bazo y los macrófagos peritoneales. Tras administración parenteral, la degradación de los portadores de PLGA es rápida en la etapa inicial (alrededor del 30%) y disminuye con el tiempo para ser eliminada por la respiración en el pulmón [218].

Un inconveniente de importancia descrito para la mayoría de las nanopartículas basadas en PLGA, consiste en un “burst” de liberación inicial del fármaco. En consecuencia, es posible que el fármaco no llegue al tejido o células objetivo, lo que conllevaría a una pérdida de eficacia. Debido a la aplicación de nanopartículas en la administración de fármacos de liberación sostenida, los mecanismos de liberación de este son importantes de

comprender. Existen cinco mecanismos de liberación del fármaco, la desorción del fármaco unido a la superficie, la difusión a través de la matriz polimérica, la difusión a través de la pared polimérica de nanocápsulas, la erosión de la matriz de nanopartículas y un proceso combinado de erosión-difusión. Los mecanismos de liberación del fármaco dependen del polímero utilizado y de la eficacia de carga. En general, el “burst” inicial se atribuye al fármaco adsorbido a la superficie de las nanopartículas [207].

El copolímero de PLGA sufre degradación por hidrólisis o biodegradación a través de la escisión de sus enlaces éster de la cadena principal en oligómeros y, finalmente, monómeros. Esto se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* para varios tipos de fármacos y proteínas con diferentes proporciones de polímero [219, 220]. El proceso de degradación para estos polímeros se produce principalmente a través de la degradación uniforme de la matriz, lo que ocurre en todo el material polimérico a la vez (erosión "bulk"), donde la penetración de agua en la matriz es mayor que la tasa de degradación del polímero. Además, el aumento de los grupos carboxílicos como resultado de la biodegradación autocataliza el proceso. La degradación del copolímero de PLGA es el proceso colectivo de difusión "bulk", difusión superficial, erosión "bulk" y erosión superficial. Dado que hay muchas variables que influyen en el proceso de degradación, el patrón de la tasa de liberación es a menudo impredecible. La velocidad de biodegradación de los copolímeros de PLGA depende de la relación molar de los ácidos láctico y glicólico en la cadena del polímero, el peso molecular del polímero, el grado de cristalinidad y la temperatura de transición vítrea del polímero. La liberación del fármaco desde la matriz degradada homogéneamente es más complicada. Se ha demostrado que una curva bifásica para la liberación de fármaco como resultado de la biodegradación de PLGA muestra el siguiente patrón [219–221]: Primero, el burst inicial de liberación del fármaco está relacionado con el tipo de fármaco, la concentración del fármaco y la hidrofobicidad del polímero. El principio activo en la superficie, en contacto con el medio, se libera en función de la solubilidad y la penetración del agua en la matriz polimérica. La escisión aleatoria

del PLGA disminuye significativamente el peso molecular del polímero, pero no se forman pérdidas apreciables de peso y ningún producto monomérico soluble se forma en esta fase. En la segunda fase, el fármaco se libera progresivamente a través de la capa más gruesa y agotada. El agua dentro de la matriz hidroliza el polímero en productos oligoméricos y monoméricos solubles. Esto crea un paso para que el fármaco se libere por difusión y erosión hasta la completa solubilización del polímero. El tipo de fármaco también juega un papel importante en esta fase al atraer la fase acuosa a la matriz.

Preparación de nanopartículas poliméricas

Existen varios métodos para preparar nanopartículas poliméricas, y la selección de un método determinado depende de la naturaleza del material polimérico que formará las nanopartículas resultantes y de las propiedades de las moléculas del fármaco empleadas para ser cargadas en las nanopartículas. Los métodos de nano-emulsión derivan de técnicas de preparación de micropartículas [222]. El primer paso requiere la formación de una emulsión y su homogeneización, que puede conseguirse mediante el uso de homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores y sonicadores. Los métodos basados en la emulsificación difieren dependiendo de las propiedades del polímero y de la miscibilidad entre el solvente orgánico y la fase acuosa. Por lo tanto, cuando se usan polímeros hidrófobos, algunos métodos implican el uso de solventes volátiles e inmiscibles en agua que tienen que eliminarse por evaporación simple, lo que lleva a la precipitación del polímero, entre estos se encuentra los métodos de emulsión evaporación de solvente y doble emulsión. En otros métodos, la precipitación del polímero se produce como resultado de procesos de difusión controlada mediante el uso de solventes orgánicos parcial o totalmente miscibles en agua, como por ejemplo el método de nanoprecipitación.

Una de las técnicas más comúnmente utilizadas es la técnica emulsión evaporación de solvente, la cual permite la encapsulación de fármacos hidrofóbicos. Brevemente, consiste en

la disolución del polímero y el fármaco en un solvente orgánico, la que después se emulsiona en una solución acuosa que contiene un estabilizador. La emulsión se produce por una posterior exposición a una fuente de alta energía, tales como un dispositivo ultrasónico o un homogenizador. La fase orgánica es luego evaporada, dando como resultado una fina dispersión acuosa de nanopartículas, las que son recolectadas por centrifugación. La técnica emulsión evaporación de solvente puede usarse para la preparación de partículas con tamaños que varían desde unos pocos nanómetros hasta micrómetros al controlar las tasas y condiciones de agitación, y muestra una alta eficacia para la incorporación de fármacos lipofílicos [223]. Sin embargo, este método no es adecuado para la encapsulación de fármacos hidrofílicos. La emulsión doble permite que fármacos hidrofílicos sean encapsulados en nanopartículas de PLGA, este método se basa en la disolución del PLGA en un solvente orgánico y la emulsión de una solución acuosa que contiene el fármaco hidrófilo dentro de la fase orgánica. Esta emulsión primaria se transfiere después a una solución acuosa externa que contiene un tensioactivo para estabilizar la doble emulsión, bajo agitación vigorosa. De manera similar, el solvente orgánico es evaporado y las nanopartículas pueden ser recolectadas tras la centrifugación [207, 211].

El método de nanoprecipitación es un procedimiento de un solo paso y se suele emplear para incorporar fármacos lipofílicos en portadores basándose en la deposición interfacial de un polímero [224]. La nanoprecipitación se realiza usando sistemas que contienen tres componentes básicos, el polímero, el solvente del polímero y el no solvente del polímero. El solvente debe ser orgánico, miscible en agua y de fácil eliminación por evaporación. El polímero y el fármaco se disuelven en un solvente semipolar miscible en agua. Luego, la solución se vierte o inyecta en una solución acuosa que contiene estabilizante bajo agitación magnética. Las nanopartículas se forman de manera inmediata por medio de una rápida difusión del solvente. Finalmente, el solvente es eliminado de la suspensión [225, 210]. Debido a que no es esencial un aporte de energía externa para la formación de nanopartículas,

la nanoprecipitación puede ser considerado un procedimiento fácil y sensible, con requisitos modestos de equipamiento y bajos costos de energía [226]. El tamaño y la forma de las partículas es de difícil predicción, pero es relativamente fácil influir en la formación de partículas cambiando la concentración, el solvente/no solvente y la técnica de preparación. A diferencia de la técnica emulsión evaporación de solvente, la que normalmente implica el uso de solventes orgánicos altamente volátiles como el diclorometano o el hexano, la técnica de nanoprecipitación también puede utilizar solventes no volátiles, los que pueden no ser eliminados fácilmente ya sea mediante agitación o evaporación con calentamiento ligero.

El método *salting out* es otra técnica utilizada para la fabricación de nanopartículas poliméricas. En primer lugar, el polímero se disuelve en la solución orgánica, que generalmente es miscible en agua, los solventes típicos son tetrahidrofurano y acetona. La fase acuosa consiste en el surfactante y la solución saturada de electrolito. Los electrolitos no deben ser solubles en el solvente orgánico. Por lo general, las sales más comúnmente usadas son cloruro de magnesio o acetato de magnesio. Posteriormente se añade agua hasta que el volumen es suficiente para permitir la difusión de la acetona en el medio acuoso, lo que resulta en la formación de nanopartículas. Esta suspensión se purifica por filtración de flujo transversal y liofilización. Sin embargo, una desventaja de este procedimiento es que usa grandes cantidades de sales que son incompatibles con muchos compuestos bioactivos [227].

El método de polimerización interfacial utiliza las ventajas de ciertos polímeros con rápida velocidad de polimerización. Utilizando ciertos monómeros, como el cianoacrilato, que se disuelven junto con el fármaco en éter de petróleo y etanol absoluto, se forma una mezcla que luego lentamente es extruida a través de una aguja sobre una solución acuosa del surfactante. En este caso las nanocápsulas se forman espontáneamente por polimerización del monómero después de iniciar el contacto con los iones presentes en el agua. La suspensión coloidal resultante puede concentrarse por evaporación a presión reducida. Ejemplos de fármacos encapsulados son la insulina, calcitonina, indometacina, y compuestos citotóxicos

utilizados en la terapia fotodinámica de tumores. Una de las ventajas de esta técnica es la alta eficiencia de encapsulación de fármacos. Además, otra ventaja es la obtención de nanocápsulas ya que por este método el polímero se forma *in situ*, lo que permite la constitución de una membrana de polímero que puede rodear el contorno de la fase interior de una emulsión aceite/agua o agua/aceite. En este caso, la principal desventaja es el uso de solventes orgánicos necesarios para la fase externa. El lavado de solventes y la sustitución por el agua representa un procedimiento largo y difícil [228].

Las nanopartículas también pueden ser obtenidas por el método de difusión de emulsificación. Se utiliza un solvente parcialmente soluble en agua como acetona o carbonato de propileno. Los polímeros y compuestos bioactivos se disuelven en el solvente y luego se emulsionan en la fase acuosa que contiene el estabilizador. Este último evita la agregación de las gotas de la emulsión por adsorción en la superficie de las mismas. El agua es agregada a la emulsión, para permitir la difusión del solvente en el agua. La solución se agita, produciéndose la precipitación de las partículas. Posteriormente se recogen por centrifugación, o el solvente puede eliminarse por diálisis [229].

Otro método utilizado es el de emulsificación con membranas. Primeramente, las dos fases de la emulsión se encuentran separadas por una membrana. La fase dispersa se inyecta mediante una bomba o un recipiente presurizado hacia la fase continua a través de los poros de la membrana, de manera que se forman gotas. La formación de gotas suele tener lugar a causa del esfuerzo cortante producido sobre la superficie de la membrana, generado por el flujo de fase continua. La emulsión resultante está sujeta al proceso de eliminación del solvente, generándose de este modo las nanopartículas. Las propiedades de la membrana tales como, tamaño de poro, distribución espacial y tortuosidad, juegan un papel decisivo en el tamaño de las gotas y/o nanopartículas de la emulsión. Mediante la emulsificación con membranas, se pueden preparar emulsiones monodispersas con tamaño de gota controlado, bajo consumo energético y pequeño esfuerzo cortante. No obstante, la principal desventaja de este método

es que las propiedades de la membrana determinan la calidad de las nanopartículas. Además, los tamaños de las nanopartículas son relativamente mayores (≥ 200 nm) [230, 231].

El método de secado por atomización (*spray-drying*) es utilizado para la micro y nanoencapsulación de fármacos. En este proceso, la emulsión es atomizada directamente en forma de gotas sobre una corriente de aire caliente, en la cual el solvente orgánico se evapora y las partículas solidificadas se recogen mediante un sistema de aspiración ciclónico. Este método es muy simple, rápido y particularmente interesante para el escalado del proceso de micro y nanoencapsulación. A pesar de estas ventajas, el rendimiento del secado por atomización a escala de laboratorio, con secadores por pulverización convencionales no es óptimo debido a la pérdida de producto en las paredes de la cámara de secado y la baja capacidad del ciclón para separar las partículas finas [232].

Los métodos microfluídicos están diseñados para manipular fluidos en microcanales que tienen al menos una dimensión menor a $1,000 \mu\text{m}$ [233]. Los dispositivos microfluídicos son capaces de lograr una transferencia de masa rápida y una mezcla eficiente [234]. El patrón de flujo de líquido se controla mediante la geometría de microcanal y la velocidad de flujo. Las bombas de jeringa son generalmente utilizadas para activar el flujo de fluido impulsado por presión a través de microcanales. El uso de dispositivos microfluídicos para la síntesis de nanopartículas presenta variadas ventajas, incluyendo una mayor precisión sobre la formación de nanopartículas y una alta eficiencia de encapsulación para fármacos hidrofílicos. Su principal limitación es la escalabilidad, limitando la producción a una escala comercial.

Caracterización de nanopartículas

La caracterización de nanopartículas es esencial para una comprensión profunda de sus propiedades previo a su desarrollo como una futura aplicación farmacéutica. El tamaño de las nanopartículas es crítico, no solo para determinar el perfil de liberación y el comportamiento

de degradación, sino también para determinar la eficacia del agente terapéutico en términos de penetración de tejido y captación celular [235]. El peso molecular del polímero influye en el tamaño de la nanopartícula, la eficiencia de encapsulación y la velocidad de degradación del polímero, en consecuencia, afectando la velocidad de liberación del agente terapéutico [236].

Varios estudios han demostrado que nanopartículas de tamaño submicrónico tienen numerosas ventajas sobre las micropartículas como sistemas de entrega de fármacos [237]. Generalmente, las nanopartículas tienen una captación intracelular relativamente mayor en comparación con las micropartículas y están disponibles para un rango más extenso de objetivos biológicos debido a su menor tamaño y movilidad relativa. Un estudio encontró que las nanopartículas de 100 nm tenían una captación 2.5 veces mayor que las micropartículas de 1 μm , y una captación 6 veces mayor que las micropartículas de 10 μm en una línea celular Caco-2 [238]. La liberación del fármaco también se ve afectada por el tamaño de la partícula. Las partículas más pequeñas tienen un área de superficie mayor, por lo tanto, la mayor parte del fármaco asociado estaría en o cerca de la superficie de la partícula, lo que lleva a una liberación rápida del fármaco. Mientras que, las partículas más grandes tienen núcleos grandes que permiten encapsular más fármaco y difundirlo lentamente [239]. Las partículas de menor tamaño también tienen un mayor riesgo de agregación de partículas durante el almacenamiento.

La forma de una nanopartícula determina cómo puede entrar ésta en una célula. Las partículas de forma oblonga pueden no llegar efectivamente a un sitio receptor en la membrana, ya que requieren más energía para los procesos de endocitosis, o serían menos favorables a la inclusión en el fagocito, que las nanopartículas de formas más simétricas. En un estudio que investigó nanorods y nanoesferas de diferentes tamaños, se concluyó que los niveles de interacción dependían de la forma, ya que la captación de nanopartículas de estructura oblonga era más baja que sus contrapartes esféricas [240].

El peso molecular del polímero es indicativo de la longitud de la cadena del polímero, y cuanto mayor sea el peso molecular, mayor será el largo de la cadena. Además, la longitud de la cadena refleja la hidrofiliidad o lipofilia del polímero. Un aumento en la longitud de la cadena aumenta la lipofilia y disminuye la velocidad de degradación del polímero. Por lo tanto, variando el peso molecular, se puede controlar la velocidad de degradación del polímero y la cinética de liberación del fármaco [210, 241].

El estado físico tanto del fármaco como del polímero debe ser determinado ya que tendrá una influencia de importancia sobre las características de liberación del fármaco tanto *in vitro* como *in vivo*. El potencial zeta puede influir en la estabilidad de las partículas y la mucoadhesión, así como en el tráfico intracelular de nanopartículas en función del pH. La hidrofobicidad determina la distribución de nanopartículas en el cuerpo después de la administración. Las partículas hidrofílicas tienden a permanecer en la sangre durante mayor tiempo [225, 242, 243].

La cantidad de carga de fármaco en la matriz juega un papel importante en la velocidad y duración de la liberación de la molécula encapsulada. Las matrices que tienen un mayor contenido de fármaco poseen una "burst" de liberación inicial mayor que las matrices con un contenido inferior debido a su menor relación de polímero-fármaco. Sin embargo, este efecto del contenido de fármaco se atenúa cuando el contenido del fármaco alcanza un cierto nivel dependiendo del tipo de principio activo [244]. Idealmente, un sistema nanoparticulado exitoso debiese tener una alta capacidad de carga de fármaco, reduciendo así la cantidad de materiales de matriz para la administración.

La eficiencia de la modificación de la superficie puede ser estimada midiendo la carga superficial. Un método consiste en determinar el potencial zeta de las nanopartículas por medio de la movilidad de partículas cargadas monitorizadas por un potencial eléctrico. Dependiendo del polímero y la modificación de superficie, los valores del potencial zeta pueden ser positivos, neutros o negativos [243]. El diámetro medio de partícula y el índice

de polidispersidad pueden medirse por dispersión dinámica de luz. Esta técnica se basa en la dispersión de la luz causada por el movimiento browniano de las partículas [235]. Las técnicas de imagen como la microscopía electrónica de barrido o transmisión y la microscopía de fuerza atómica brindan información sobre la morfología y el tamaño de las nanopartículas.

Las propiedades fisicoquímicas, tales como el tamaño de partícula, la forma y la carga superficial, juegan un papel clave en la captación celular de nanopartículas. La captación de nanopartículas por las células se puede ver como un proceso de dos pasos: primero, un paso de enlace en la membrana celular y, segundo, el paso de internalización [245]. La unión de las nanopartículas a la membrana celular parece ser la más afectada por la carga superficial de las partículas [246, 247]. La variación de la carga superficial de la partícula podría controlar potencialmente la unión al tejido y dirigir las nanopartículas a los compartimentos celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. Las superficies celulares están dominadas por moléculas de proteoglicanos sulfatados cargados negativamente que juegan un papel fundamental en la proliferación celular, la migración y la motilidad [248, 249]. Los proteoglicanos de la superficie celular consisten en una proteína central anclada a la membrana y unida a una o más cadenas laterales de glicosaminoglicanos para producir una estructura que se extiende alejándose de la superficie de la célula. Los glicosaminoglicanos son altamente aniónicos, y la interacción entre los proteoglicanos y el revestimiento de las nanopartículas, si están cargados positivamente, tienden a ser en gran medida iónicos [237]. Una vez dentro de la célula, puede producirse la degradación de los polímeros, pero es posible atacar organelos intracelulares específicos en función de la carga superficial y los ligandos anexos [250]. Las nanopartículas con mayor carga superficial se unen fuertemente a la membrana celular y muestran una mayor captación celular, donde las interacciones electrostáticas entre la membrana aniónica y las nanopartículas catiónicas facilitan la captación. Después de la adsorción de las nanopartículas en la membrana celular, la absorción se produce a través

de varios mecanismos posibles, como pinocitosis, endocitosis no específica o mediada por receptor o fagocitosis [251, 252].

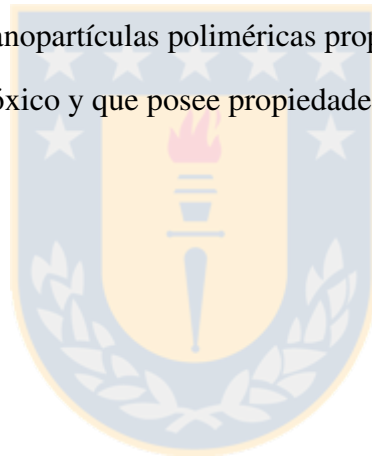
Teniendo en cuenta que no existen tratamientos óptimos para la OA, que rheim es una molécula que ha demostrado tanto actividad condroprotectora como antiinflamatoria, principalmente por la inhibición de la producción y la actividad de la citoquina IL-1 β , y que las nanopartículas constituyen sistemas que pueden entregar de manera controlada al fármaco en el sitio de inyección, surge la necesidad de desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* nanopartículas de rheim para una futura administración intraarticular.



Capítulo 2

HIPÓTESIS

La encapsulación de rhein en nanopartículas poliméricas proporciona un vector de liberación controlada que no es citotóxico y que posee propiedades antiinflamatorias en cultivos celulares *in vitro*.



Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* nanopartículas de rhein para una futura administración intraarticular

3.2 Objetivos específicos

1. Optimizar una metodología de elaboración de nanopartículas de rhein y caracterizar las nanopartículas resultantes.
2. Validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de rhein encapsulado y liberado desde las nanopartículas.
3. Evaluar la cinética de liberación *in vitro* de rhein desde las nanopartículas.
4. Evaluar *in vitro* la citotoxicidad, efecto antiinflamatorio y efecto oxidativo de las nanopartículas de rhein.

Capítulo 4

MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos y principios activos

- Acetona pa., Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Acetonitrilo pa., Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Buffer HEPES, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) Resomer® RG752s, Evonik Industries Inc. (Darmstadt, Alemania)
- Diclorometano pa., Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Kit Human IL-1beta ELISA Ready-SET-Go!®, eBioscience Inc. (CA, USA)
- Kit Human TNFalpha ELISA Ready-SET-Go!®, eBioscience Inc. (CA, USA)

- Kit MTT Vibrant®, Invitrogen (CA, USA)
- Lipopolisacárido de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Medio RPMI 1640, Invitrogen (CA, USA)
- Metanol pa., Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- 2, mercaptoetanol, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- N,N-dimetilformamida pa., Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Penicilina/Estreptomicina 100X, Invitrogen (CA, USA)
- Peróxido de hidrógeno, Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Piruvato de sodio 100X, Invitrogen (CA, USA)
- Polivinilalcohol (PVA) hidrolizado 87-90%, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Rhein 98%, AK Scientific Inc (CA, USA)
- Sonda DFCH-DA, Invitrogen (CA, USA)
- Suero bovino fetal, Invitrogen (CA, USA)

4.1.2 Equipos e insumos

- Agitador magnético multistirrer 6, Velp Scientifica, (España)
- Balanza analítica AA-200 Denver Instrument Company, USA
- Balanza Precisa XB120A, Precisa Instruments, Suiza.
- Baño de ultrasonido Branson 1200. (Alemania)
- Bomba de vacío Gast® (Benton Harbor, USA).

- Bomba Elite LaChrom L-2130, Merck Hitachi. (Tokio, Japón)
- Cámara de flujo ESCO Class II BSC Streamline, Esco Micro Pte. Ltd. (Singapur)
- Centrífuga Eppendorf 5702, Eppendorf. (USA)
- Centrífuga Eppendorf 5810r, Eppendorf. (USA)
- Centrífuga MiniSpin, Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)
- Centrífuga Z320, Hermle Scientific. (Alemania)
- Columna LiChroCart 250-4 mm, LiChrospher RP-18, Tamaño de partícula 5µm, Merck Co, (Darmstadt, Alemania)
- Congelador Nuaire -85°C Ultralow Freezer. (USA)
- Detector UV de longitud de onda programable Merck Hitachi LaChrom L-2400, Merck Co. (Tokio, Japón)
- Equipo de filtración por vacío Supelco® (Supelco Inc., Bellefonte, USA)
- Equipo Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd. (Malvern, UK)
- Evaporador Pierce Reacti-ThermTM con corriente de nitrógeno, Pierce Chemical Company. (IL, USA).
- Filtro para jeringa MS® PVDF de 0,22 µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (TX, USA)
- Homogenizador de alta velocidad, Heipdolph Elektro GMBg & Co. (Alemania)
- Jeringas desechables NIPRO de 1, 5 y 10 mL
- Lector de placas BioTek Synergy 2, BioTek Instruments. (USA)

- Material de vidrio clase A
- Micropipetas Transferpette
- Microscopio de luz invertida, Nikon. (Japón)
- Parafilm “M”® (USA)
- Peachímetro pH 500 series pH/mV/°C meter, Oakton. (Singapur)
- Pipetas pasteur plásticas estériles de 1 y 3 mL
- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10 mL
- Precolumna LichroCart 4-4mm, LiChrospher RP-18, Tamaño de partícula 5µm, Merck Co. (Darmstadt, Alemania)
- Puntas de micropipeta de 0.05, 0.1, 1 y 5 mL
- Tubos falcon estériles de 15 y 50 mL
- Válvula de inyección Rheodyne 7725i equipada con Loop Rheodyne de 20 µL (Darmstadt, Alemania)
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc. USA

4.1.3 Software

- GraphPad Prism 6.0®, Graphpad. (CA, USA)
- Software Star Chromatography Workstation, versión 6.20, 2002, Varian Inc.
- Software Statgraphics Centurion XV, versión 15.1.02. 2007 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

- Zetasizer Software, versión 6.34, 2012, Malvern Instruments Ltd. (Malvern, UK)



4.2 Optimización de la encapsulación de rhein en nanopartículas poliméricas y caracterización fisicoquímica del sistema resultante

4.2.1 Preparación de las nanopartículas cargadas con rhein

Emulsión evaporación de solvente

Se realizó una emulsión (Figura 4.1) por medio de la adición de dos fases, una orgánica, constituida por los solventes metanol (1.00 mL), acetona (1.50 mL) y diclorometano (2.50 mL), además de rhein en metanol 0.033 mg/mL y PLGA RG 752s. La fase acuosa consistió de una solución de polivinil alcohol (PVA) 0.5% más 50 μ L de ácido clorhídrico 1 N. La emulsión fue generada por 1 minuto de agitación mediante vórtex y posterior sonicación en homogeneizador de ultrasonido en baño de hielo, durante 3 minutos y a una amplitud de 80%. La emulsión resultante fue evaporada bajo campana de extracción usando un agitador magnético a 600 rpm por 3 horas a temperatura ambiente, para completa eliminación de los solventes orgánicos.

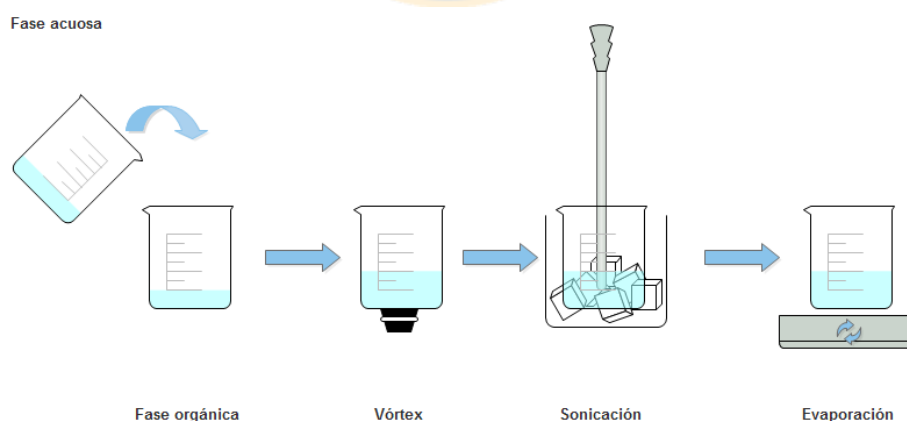


Fig. 4.1 Proceso de elaboración de nanopartículas por la metodología emulsión evaporación de solvente. Fuente: Elaboración propia.

Doble emulsión

Nanopartículas poliméricas cargadas con rhein fueron preparadas por la técnica de doble emulsión descrita por McCall and Sirianni [253] con ligeras modificaciones. Una emulsión primaria fue realizada por la adición de una fase orgánica, conteniendo los solventes acetona y diclorometano (500 μL de cada uno de los solventes), más PLGA RG 752s, a una fase acuosa que consistió en 2 mL de una solución de PVA 0.50% y 100 μL de solución de rhein 1 a 2 mg/mL en buffer HEPES pH 7.4, isotónico. La emulsión primaria fue generada por 10 segundos de sonicación en un homogeneizador de ultrasonido en baño de hielo, a una amplitud de 80%. Luego, la emulsión secundaria fue formada por la adición de la emulsión primaria, por goteo con pipeta pasteur, a una solución acuosa de PVA 0.50 o 1% más 50 μL de ácido clorhídrico 1 N, bajo agitación en vórtex durante 30 segundos, y luego llevada a sonicación en baño de hielo por medio de un homogeneizador de ultrasonido, realizando pulsos de 10 segundos de sonicación a una amplitud de 80%, seguidos de 5 segundos de enfriamiento durante 3 ciclos. La suspensión resultante fue evaporada bajo campana de vapores, usando un agitador magnético a 600 rpm por 3 horas a temperatura ambiente, para la completa eliminación de los solventes orgánicos (Figura 4.2).

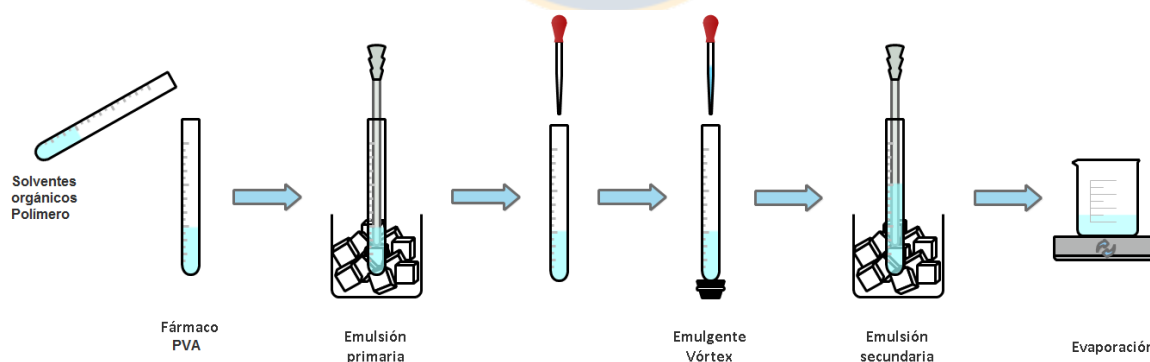


Fig. 4.2 Proceso de elaboración de nanopartículas por la metodología de doble emulsión. Fuente: Elaboración propia.

Nanoprecipitación

Se obtuvieron nanopartículas poliméricas cargadas con rhein mediante la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi et al. [254]. con ligeras modificaciones. Una cantidad de PLGA RG 752s, en un rango de 25.00 y 50.00 mg, y rhein en un rango de 1.00 a 2.5 mg, fueron pesados con exactitud y disueltos en 5 mL de n,n-dimetilformamida. La solución anterior formó la fase orgánica, la cual se agregó mediante goteo constante por medio de una jeringa Hamilton® de 5.00 mL, a una fase acuosa consistente de 25 mL de PVA 0.25%, y agitada magnéticamente a 500 rpm a temperatura ambiente, bajo campana de vapores durante una noche hasta la completa evaporación del solvente orgánico (Figura 4.3).

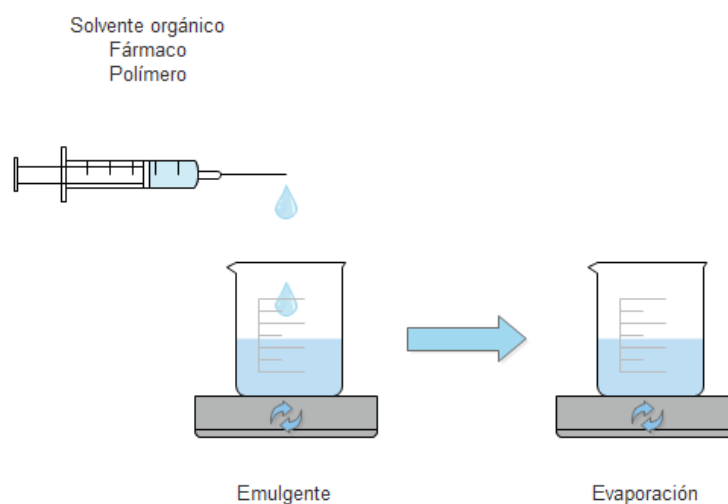


Fig. 4.3 Proceso de elaboración de nanopartículas por metodología nanoprecipitación. Fuente: Elaboración propia

4.2.2 Optimización de los parámetros de formulación

Se utilizaron diseños factoriales completos para determinar las interacciones y efectos principales de los parámetros de formulación de las técnicas emulsión evaporación de solvente, doble emulsión y nanoprecipitación.

Un diseño factorial de dos-factores, tres-niveles fue empleado para la optimización de la técnica emulsión evaporación de solvente, usando la masa del polímero PLGA RG 752s y el volumen de la solución de rhein/metanol como las dos variables independientes (Tabla 4.1). Para la técnica de doble emulsión, se usó un diseño factorial de tres-factores, dos-niveles, y las variables independientes fueron masa de polímero PLGA RG 752s, concentración de solución rhein/buffer y concentración de PVA (Tabla 4.2). Finalmente un diseño factorial de dos-factores, tres niveles fue realizado para la técnica de nanoprecipitación, las variables independientes fueron la masa de rhein y PLGA RS 752s (Tabla 4.3). Como valores de respuesta para las tres técnicas evaluadas, se midió el diámetro medio de nanoparticulas, índice de polidispersidad (PDI) y eficiencia de encapsulación (%EE) (Tabla 4.4).

Tabla 4.1 Variables independientes del diseño factorial para la técnica emulsión evaporación de solvente. Fuente: Elaboración propia.

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	+1
X ₁ : Masa de polímero PLGA RG752s (mg)	50	75	100
X ₂ : Volumen de solución rhein/metanol (mL)	0.50	0.75	1.00

Tabla 4.2 Variables independientes del diseño factorial para la técnica doble emulsión. Fuente: Elaboración propia.

Variables independientes	Niveles	
	-1	+1
X ₁ : Masa de polímero PLGA RG752s (mg)	50	100
X ₂ : Solución rhein/buffer (µg/mL)	1	2
X ₃ : PVA (%)	0.50	1

Tabla 4.3 Variables independientes del diseño factorial para la técnica nanoprecipitación. Fuente: Elaboración propia.

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	+1
X ₁ : Masa de polímero PLGA RG752s (mg)	25.50	37.50	50.0
X ₂ : Masa de rhein (mg)	1.00	1.75	2.50

Tabla 4.4 Variables dependientes para todas las técnicas evaluadas. Fuente: Elaboración propia.

VARIABLES DEPENDIENTES	VALOR ÓPTIMO
Y ₁ : Tamaño de partícula	< 200 nm
Y ₂ : Polidispersidad	< 0.1
Y ₃ : Eficiencia de encapsulación	Maximizar

4.2.3 Tamaño de partícula y polidispersidad

El diámetro medio e índice de polidispersidad de las nanopartículas obtenidas fueron medidos usando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK). Estos dos parámetros fueron evaluados en triplicado, por dilución de 50 µL de suspensión de nanopartículas resuspendidas en 950 µL de agua Milli-Q a una temperatura de 25 °C.

4.2.4 Eficiencia de encapsulación y carga del rhein

La incorporación del fármaco en las nanopartículas poliméricas es un factor clave para su uso como un sistema de administración de fármacos. Es deseable un alto nivel de carga de fármaco ya que se requerirá una cantidad menor de nanopartículas para administrar la dosis de fármaco deseada.

Cuando se investiga la carga del fármaco se pueden calcular dos parámetros. La eficiencia de encapsulación se refiere a la proporción de fármaco que está encapsulado dentro de las partículas, en relación a la cantidad incorporada al inicio y se puede calcular usando la fórmula:

$$EE(\%) = \frac{M_{FN}}{M_{FU}} \times 100 \quad (4.1)$$

Donde, *EE* es la eficiencia de encapsulación, *M_{FN}* es la masa de fármaco en las nanopartículas y *M_{FU}* es la masa de fármaco utilizado.

La carga de fármaco se refiere a la proporción de fármaco por masa de partícula y puede ser calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$CF(\%) = \frac{M_{FN}}{M_N} \times 100 \quad (4.2)$$

Donde CF es la carga de fármaco y M_N es la masa de nanopartículas.

La eficiencia de la encapsulación es de mayor interés en relación a la fabricación de partículas. El nivel de carga del fármaco es una medida de mayor utilidad terapéutica, ya que hace referencia a la dosis de fármaco disponible en las nanopartículas.

Para la extracción del rhein encapsulado, 10.00 mL de suspensión de nanopartículas fueron centrifugadas a 15,000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y el pellet de nanopartículas fue disuelto con 1.00 mL de acetona, más 2.00 mL de metanol. Se tomó una alícuota de 1.00 mL de la solución previa, la que se evaporó por flujo de gas nitrógeno a una temperatura de 40 °C. Finalmente, se reconstituyó con 1.00 mL de metanol y se filtró a través de un filtro de membrana PVDF de tamaño de poro 0.22 μ m. La cantidad de rhein en la nanopartículas fue cuantificada por el método por HPLC desarrollado y validado (Tabla 4.5). El sistema cromatográfico (Merck Hitachi LaChrom Elite L-2130, Merck), contó con una válvula de inyección Rheodyne 7725i (Sigma Aldrich) y un detector de absorbancia ultravioleta programable (Merck Hitachi LaChrom Elite L-240, Merck). El análisis se realizó a una longitud de onda de 257 nm. Se inyectaron 20.00 o 50.00 μ L de la solución filtrada a una columna de fase reversa LiChrospher C18 (5 μ m, 250 x 4.00 mm, Merck) utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol (80.00%) y ácido acético 2.00% (20.00%), a un flujo de 1.00 mL por minuto. El análisis fue realizado a temperatura ambiente.

Tabla 4.5 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de rhein. Fuente: Elaboración propia.

Fase móvil	Solución de metanol:ácido acético 2% (80:20 v/v)
Columna	LiChrospher C-18 (5 µm, 250 mm)
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Flujo	Isocrático (1.00 mL/min)
Volumen de inyección	20 - 50 µL
Detector	Ultravioleta
Longitud de onda	257 nm

4.3 Validación del método cromatográfico

Se validó, para la matriz utilizada, un método analítico por HPLC para cuantificación de rhein desde micropartículas desarrollado por Chávez [255], para cuantificar rhein encapsulado en las nanopartículas y liberado cuando estas son sometidas a un medio de liberación isotónico y pH fisiológico.

4.3.1 Linealidad

Se preparó una solución madre de rhein 0.10 mg/mL en metanol, de la cual se obtuvieron 5 soluciones de rhein en niveles de concentración creciente, 1 - 2 - 5 - 10 - 20 µg/mL, las que fueron inyectadas al sistema cromatográfico por triplicado. Se obtuvo una gráfica de concentración del analito versus área promedio de los picos cromatográficos. Se obtuvo una gráfica de concentración versus área de los peaks para cada solución, se determinó la linealidad mediante el cálculo de la pendiente de la curva de calibración y el valor del coeficiente de determinación (r^2)

4.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Se prepararon 3 curvas de calibración con niveles de concentración bajo y sobre el valor límite de linealidad (0.50 - 0.75 - 1.00 µg/mL). Se realizaron los gráficos de concentración

del analito versus área promedio de los picos cromatográficos para obtener las pendientes e interceptos, con lo cual se calcularon el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) en base a la desviación de los interceptos (σ) y los promedios de las pendientes (S), mediante la utilización de las siguientes formulas.

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (4.3)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (4.4)$$

4.3.3 Precisión

La precisión se estableció mediante la realización de ensayos de precisión instrumental, ensayos de repetibilidad o precisión intra-ensayo y precisión intermedia o precisión inter-ensayo.

La precisión instrumental se evaluó mediante 6 inyecciones de una solución estándar de rhein de 10 $\mu\text{g/mL}$. Las condiciones en las que se realizó el ensayo fueron las mismas para cada inyección. Los resultados obtenidos se calcularon por medio de la desviación estándar relativa de los resultados del área promedio de los picos cromatográficos (RSD).

Para el estudio de la repetibilidad se prepararon 3 soluciones estándar de rhein en concentraciones 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (límite inferior, punto medio, y límite superior de la curva de calibración). Las condiciones bajo las que se realizó el ensayo fueron las mismas para cada experiencia, las inyecciones fueron realizadas en triplicado y en el periodo de un día. Se calculó la RSD de los resultados del área promedio de los picos cromatográficos para cada concentración del analito.

Para el estudio de la precisión intermedia se prepararon 3 soluciones estándar de rhein en concentraciones 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Las inyecciones fueron realizadas en triplicado y el estudio

se repitió durante 3 días diferentes. Se calculó la RSD de los resultados del área promedio de los picos cromatográficos para concentración del analito.

4.3.4 Exactitud

Para determinar la exactitud se adicionaron concentraciones conocidas de rhein (3, 7 y 14 $\mu\text{g/mL}$) a nanopartículas blancas y se calculó el porcentaje de recuperación a través de la curva de calibración concentración versus área promedio de los picos. Las inyecciones se realizaron por triplicado.

4.3.5 Selectividad

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés.

Se compararon las lecturas de soluciones de concentración conocida de PLGA y rhein.

4.4 Liberación *in vitro*

El estudio de la liberación *in vitro* de rhein desde las nanopartículas fue llevado a cabo en condiciones sink. 20.00 g de suspensión de nanopartículas fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de remover el sobrenadante, las nanopartículas fueron resuspendidas en 1 mL de HEPES buffer salino 10 mM, pH 7.4. Un tubo eppendorf fue preparado para cada punto correspondiente a un tiempo determinado, y llevado a 37 °C bajo agitación constante a 100 rpm. A intervalos de tiempo correspondientes, se recolectó la totalidad del medio y se llevaron a tubos de centrifugación con membrana, con un tamaño de poro de 0.10 μm (Ultrafree®-CL Centrifugal Filter Device, Millipore), y fueron centrifugados a 6,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante

obtenido de la centrifugación fue recolectado y almacenado a 4 °C hasta su cuantificación por HPLC. La liberación *in vitro* de rhein desde las nanopartículas fue comparada contra la incorporación de una cantidad equivalente de fármaco en suspensión, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

4.5 Ensayos celulares *in vitro*

Habiendo optimizado los parámetros de formulación para la metodología de emulsión evaporación de solvente, además de su completa caracterización, se procedió a estudiar los efectos de las nanopartículas obtenidas, mediante ensayos celulares *in vitro*.

4.5.1 Evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de rhein

En este trabajo se realizó la evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad de las nanopartículas. Los métodos de citotoxicidad *in vitro* son más simples, más rápidos, más rentables y no plantean problemas éticos en comparación con los enfoques *in vivo*.

La evaluación de la viabilidad celular se realizó utilizando la línea celular THP-1 (monocitos de leucemia mieloide aguda humana), diferenciada a macrófagos. Las células fueron incubadas en condiciones estandarizadas, a 37 °C y en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10%, una mezcla de antibióticos penicilina (100 IU/mL) y estreptomycinina (100 µg/mL), 1% de glucosa, 1% de HEPES, 1% de piruvato de sodio y 0,10% de 2-mercaptoetanol.

Para estimar el número de células en un frasco de cultivo se utilizó la técnica de tinción con azul de tripán, en conjunto a una cámara Neubauer, para determinar el volumen de la alícuota de suspensión celular necesaria para sembrar 1×10^5 células por pocillo, en una placa de cultivo de 96 pocillos, luego se realizó la diferenciación a macrófagos con 200 ng/mL de acetato miristato de forbol (PMA), en medio RPMI suplementado durante 24 horas.

Esta placa fue incubada en una atmósfera a 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C. Luego, las células fueron tratadas con lipopolisacárido de *E. coli* de concentración 5 ng/mL, durante 24 horas, en medio RPMI suplementado y en una atmósfera de CO₂ al 5% y 37 °C.

La citotoxicidad celular fue determinada mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Vibrant®), el cual es una sal de tetrazolio de un color amarillo pálido, que es reducido sólo por células vivas y metabólicamente activas, transformándolo en un colorante de formazán de color púrpura. Como la cantidad reducida es dependiente del número de células viables, este ensayo permite estimar la viabilidad celular, al medir la densidad óptica del producto de formazán púrpura producido por las células. La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la exposición de los macrófagos a nanopartículas cargadas con rhein y nanopartículas blancas, en un rango de concentración de 0 a 5 µM, durante 24 horas bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 37 °C, tras lo cual se realizó el ensayo MTT, donde las células fueron expuestas a 10 µL de reactivo MTT durante 2 horas, hasta completo desarrollo de la reacción, posteriormente se agregó dodecilsulfato sódico (SDS) (0.1g/mL) y se incubó a 37 °C durante 12 horas para lograr la disolución de los cristales de formazán reducido. Como último paso, se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas y se calculó el porcentaje de viabilidad considerando un 100% de viabilidad para las células que no estuvieron en presencia de nanopartículas.

4.5.2 Evaluación de citoquinas *in vitro*: IL-1 β y TNF α

Se cuantificó la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF α presentes en los sobrenadantes de cultivo recolectados a las 24 horas, previa exposición a nanopartículas cargadas y blancas. Se determinaron las concentraciones mediante un ensayo inmunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent assay o ELISA), para lo cual se contó con un Kit de cuantificación ELISA tipo “sandwich” para IL-1 β y TNF α . Fueron recolectados los

sobrenadantes del cultivo celular de la línea THP-1 diferenciada a macrófago, los que habían sido expuestos previamente a la presencia de lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) durante 24 horas y luego a concentraciones en el rango de 1.25 a 5 μM , de nanopartículas cargadas con rhein y nanopartículas blancas, durante 24 horas, en una atmósfera de CO_2 al 5% y 37 °C. Los sobrenadantes recolectados fueron almacenados a -20 °C hasta la realización del ensayo.

Cuantificación de IL-1 β

Se sensibilizaron las placas de ELISA (Nunc Maxisorp ®) con 100 μL de anticuerpo de captura anti IL-1 β humana durante la noche, a 4 °C. Las placas fueron lavadas entre 3 a 5 veces con > 250 μL de buffer de lavado (PBS 1x, 0.05% Tween-20) por pocillo, dejando 3 minutos para cada lavado. Luego se adicionaron 200 μL de solución de bloqueo por pocillo, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lavó cada placa entre 3 a 5 veces. Se añadieron 100 μL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo, y se reservaron dos columnas en las que se sembró la curva de calibración, la cual consistió en 8 concentraciones del estándar IL-1 β humana recombinante en el rango de 0 a 150 pg/mL, para luego ser incubados durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa de 3 a 5 veces, y se adicionaron 100 μL del anticuerpo de detección anti IL-1 β humana conjugada con biotina por pocillo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó entre 3 a 5 veces y se agregó 100 μL de Avidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y se incubaron las placas por 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual fueron lavadas 7 veces. Se utilizó como sustrato 100 μL por pocillo de la solución del cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), y se incubó hasta el completo desarrollo de la reacción colorimétrica, correspondiente a 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 μL por pocillo de ácido sulfúrico 2 N. Finalmente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm, por medio de un lector de microplacas BioTek.

Se determinó la concentración de cada muestra mediante la interpolación de los valores de absorbancia en la curva de calibración.

Cuantificación de TNF α

Se ejecutó un ensayo ELISA siguiendo los pasos del procedimiento descrito para la cuantificación de IL-1 β . Para el cual se sembró una curva de calibración, la cual correspondió a 8 concentraciones del estándar TNF α en el rango de 0 a 500 pg/mL. Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm, por medio de un lector de microplacas BioTek.

Se determinó la concentración de cada muestra mediante la interpolación de los valores de absorbancia en la curva de calibración, la cual presentó un comportamiento lineal.

4.5.3 Evaluación del efecto oxidativo *in vitro* de las nanopartículas

Se cuantificó la producción de ROS mediante fluorimetría por medio del uso de la sonda diacetato de 2', 7' -dihidro diclorofluoresceína (DFCH-DA), la cual emite fluorescencia cuando es oxidada por ROS, al producirse el compuesto altamente fluorescente 2', 7' -diclorofluoresceína (DCF), siendo la intensidad de fluorescencia emitida por las células, proporcional a la cantidad presente de ROS. Se incubó en placas de cultivo negras de 96 pocillos, la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos en una concentración de 1×10^5 células por pocillo, las que fueron expuestas a la presencia de LPS durante 24 horas y luego tratadas con las suspensiones de nanopartículas poliméricas cargadas y nanopartículas poliméricas blancas. Tras 24 horas de incubación bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C, se lavó con tampón PBS estéril 1X y fueron tratadas con 200 μ L de la sonda DFCH-DA (10 μ M) sin presencia de luz. Las placas se incubaron por 30 minutos bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C, tras lo cual fueron lavadas dos veces con tampón PBS estéril 1X. Se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 540 nm de emisión en un lector de microplacas. Se consideró como control

positivo las células expuestas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 500 μM . Finalmente, los resultados obtenidos fueron normalizados por cuantificación de proteínas luego de completar la lisis celular con hidróxido de potasio (KOH) 0.50 N en la totalidad de los pocillos de cultivo. Se normalizaron los resultados de fluorescencia de acuerdo a la concentración de proteínas (mg/mL), para que los resultados obtenidos en la cuantificación de ROS fueran comparables respecto a las diferentes experiencias evaluadas. Se utilizó la metodología colorimétrica de Lowry, donde la intensidad de la coloración que es medida por densidad óptica es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución.



Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 Optimización de los parámetros de formulación

Se formularon nanopartículas poliméricas cargadas con rhein, utilizando las técnicas emulsión evaporación de solvente, doble emulsión y nanoprecipitación, evaluándose los valores óptimos de formulación usando diseños factoriales completos.

Un total de 18 experimentos fueron formuladas a través de un diseño factorial de dos factores con tres niveles para la metodología emulsión evaporación de solvente. Para la técnica doble emulsión se formularon 16 experimentos por un diseño factorial de tres factores con dos niveles, mientras que por nanoprecipitación se elaboraron 18 experimentos a través de un diseño factorial de dos factores con tres niveles cada uno. Todas las nanopartículas elaboradas estuvieron sujetas a caracterización de diámetro medio de nanopartícula, índice de polidispersidad y eficiencia de encapsulación. Se investigaron los efectos de las variables independientes sobre las características de las nanopartículas obteniéndose los respectivos gráficos de superficie de respuesta.

La tabla 5.1 muestra el resumen de los resultados de las variables dependientes para las tres técnicas evaluadas en la obtención de nanopartículas cargadas con rhein. La figura 5.1a muestra la fluctuación del diámetro medio de las nanopartículas elaboradas mediante la

técnica de emulsión evaporación de solvente, la figura 5.2a para el procedimiento de doble emulsión, y la figura 5.3a para la técnica de nanoprecipitación. Los gráficos de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación del método emulsión evaporación de solvente, doble emulsión y nanoprecipitación se muestran en la figura 5.1b, figura 5.2b, y la figura 5.3b, respectivamente.

Tabla 5.1 Resumen de los resultados de las variables dependientes para todas las técnicas utilizadas en la obtención de nanopartículas poliméricas cargadas con rhein. Fuente: Elaboración propia.

Técnica	Diámetro medio de nanopartículas (nm)	PDI	EE (%)
Emulsión evaporación de solvente	186.83 - 228.97	0.035 - 0.110	20.27 - 39.55
Doble emulsión	227.90 - 319.23	0.022 - 0.075	0.00 - 15.16
Nanoprecipitación	182.30 - 238.96	0.033 - 0.154	0.10 - 6.46

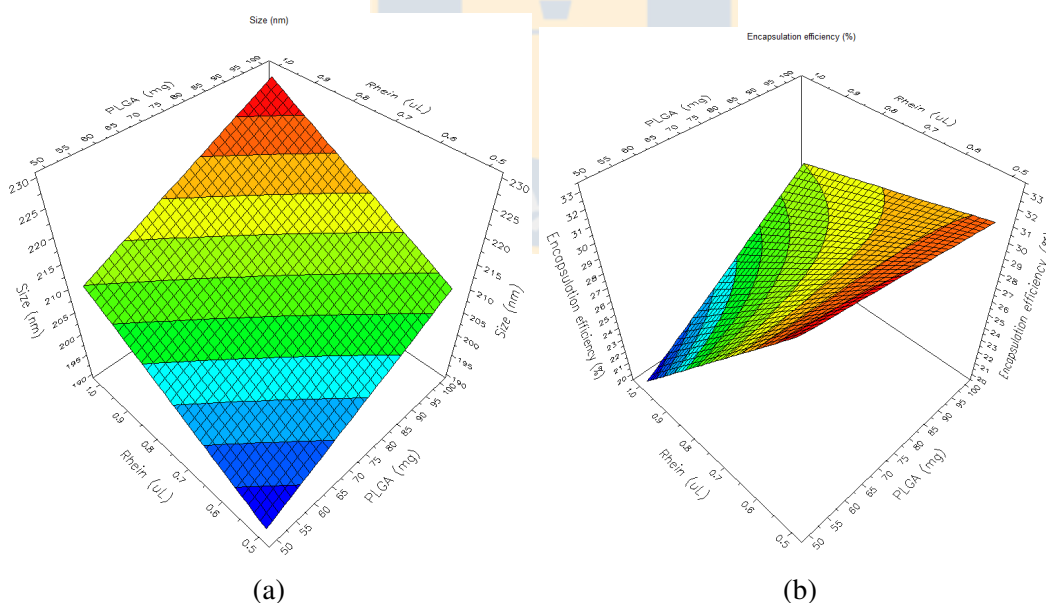


Fig. 5.1 Gráficos de superficie de respuesta para la metodología emulsión evaporación de solvente. (a): superficie de respuesta obtenida para la optimización del diámetro medio de nanopartículas. (b): superficie de respuesta obtenida para la optimización de la eficiencia de encapsulación de nanopartículas. Fuente: Elaboración propia.

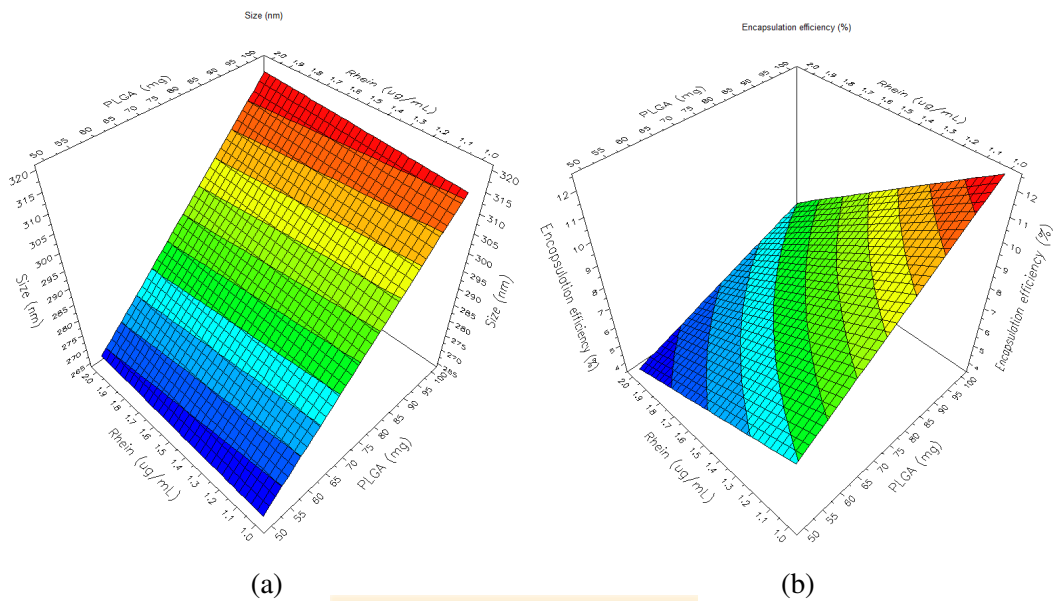


Fig. 5.2 Gráficos de superficie de respuesta para la metodología doble emulsión. (a): superficie de respuesta obtenida para la optimización del diámetro medio de nanopartículas. (b): superficie de respuesta obtenida para la optimización de la eficiencia de encapsulación de nanopartículas. Fuente: Elaboración propia.

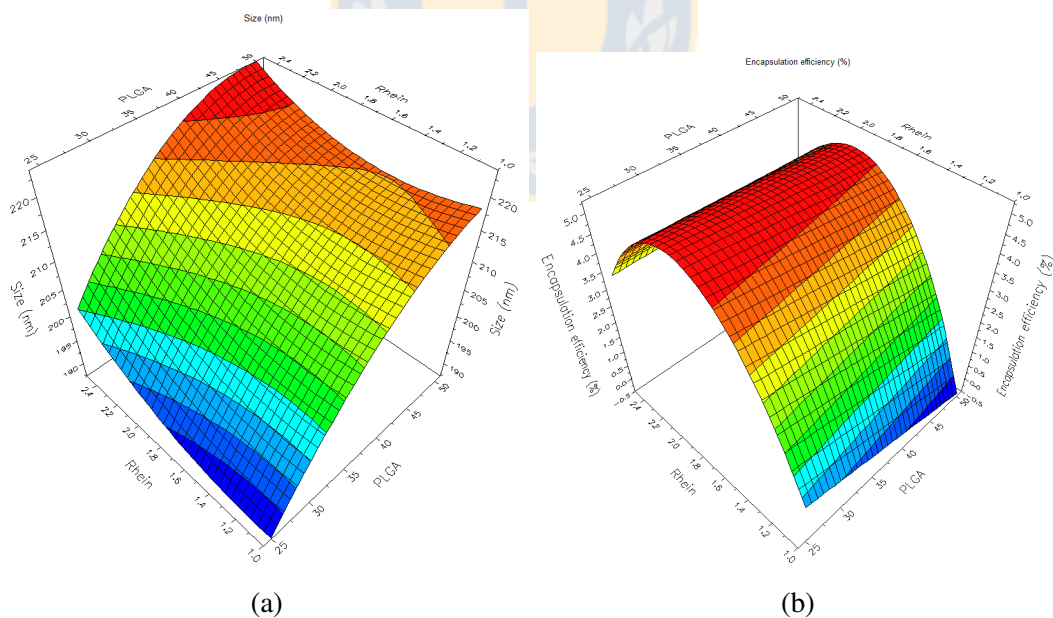


Fig. 5.3 Gráficos de superficie de respuesta para la metodología nanoprecipitación. (a): superficie de respuesta obtenida para la optimización del diámetro medio de nanopartículas. (b): superficie de respuesta obtenida para la optimización de la eficiencia de encapsulación de nanopartículas. Fuente: Elaboración propia.

Considerando los resultados mencionados anteriormente, se decidió continuar el resto de las experiencias con las nanopartículas obtenidas mediante la técnica de emulsión evaporación de solvente, siendo las variables óptimas para esta, una masa de 50.00 mg de polímero PLGA RG752s y un volumen de 0.50 mL de la solución rhein/metanol 0.033 mg/mL (Figura 5.4), ya que esta presenta la mayor eficiencia de encapsulación de las tres técnicas estudiadas, así como también presenta un diámetro medio menor a 200 nm y un índice de polidispersidad menor a 0.100.

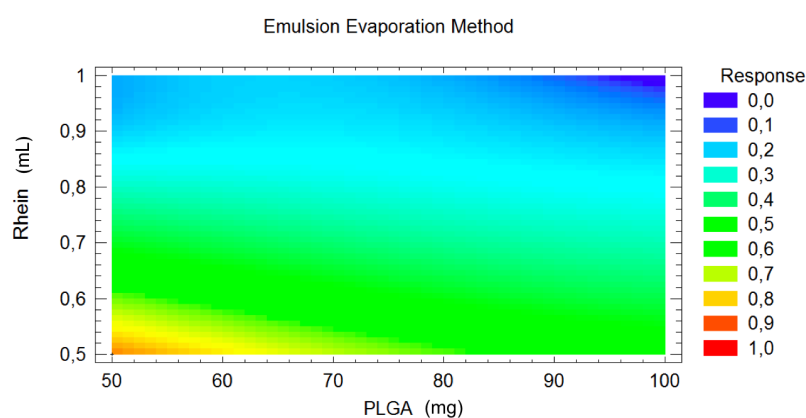


Fig. 5.4 Optimización de los parámetros de formulación para la metodología emulsión evaporación de solvente. Fuente: Elaboración propia

La tabla 5.2 muestra las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein obtenidas mediante la metodología emulsión evaporación de solvente optimizada.

La microscopía de fuerza atómica (AFM) permitió la confirmación de los resultados obtenidos por dispersión de luz dinámica sobre el tamaño de partícula. Las micrografías (Figura 5.5a y Figura 5.5b) muestran una población monodispersa de partículas cuasi esféricas con tamaños bien definidos, que estaban en todo momento por debajo de 200 nm, corroborando los resultados previamente obtenidos de la caracterización de las nanopartículas. Para la muestra observada en la figura 5.5a se usó una imagen obtenida del contacto con la

punta, en cambio para la muestra observada en la figura 5.5b se utilizó una imagen obtenida de la deflexión de la punta.

Tabla 5.2 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein obtenidas mediante la técnica de emulsión evaporación de solvente. Los datos representan el promedio \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes. Fuente: Elaboración propia.

Técnica	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE (%)	Carga (μg rhein/ 50 mg PLGA)
Emulsión Evaporación de solvente	189.33 ± 2.92	0.078 ± 0.04	-8.49 ± 0.32	38.41 ± 1.60	6.92 ± 0.22

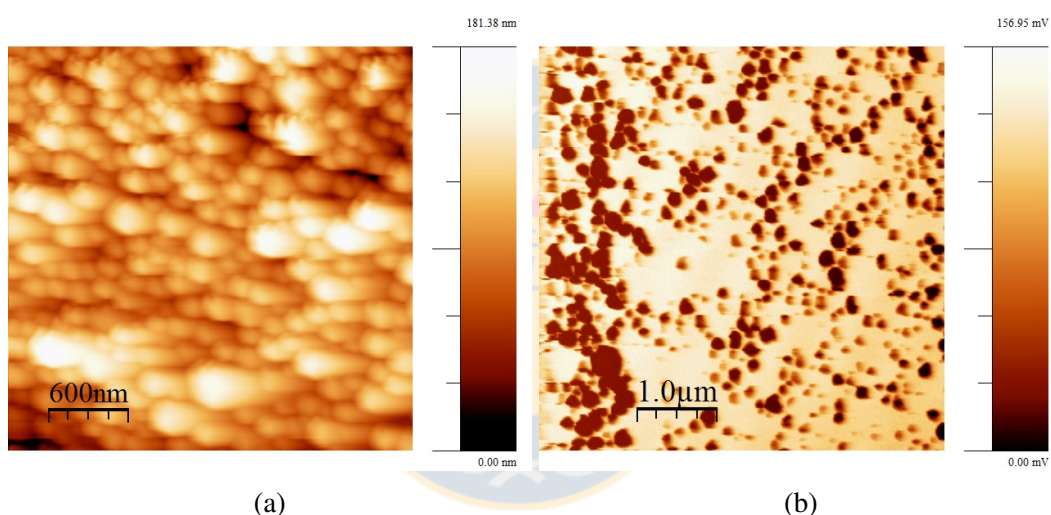


Fig. 5.5 Micrografías de fuerza atómica de nanopartículas de PLGA. (a): micrografía de fuerza atómica de nanopartículas de PLGA, la barra de escala corresponde a 600 nm. (b): Micrografía de fuerza atómica de nanopartículas de PLGA. La barra de escala corresponde a 1 μm . Fuente: Elaboración propia

5.2 Validación del método cromatográfico

5.2.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración con concentraciones de rhein de 1 - 2 - 5 - 10 - 20 $\mu\text{g/mL}$. En la figura 5.6 se puede observar que la correlación entre la concentración del analito

en las soluciones y el área promedio de los picos cromatográficos, fue lineal, presentando un coeficiente de determinación $R^2 > 0.99$, por lo que se puede considerar que existe una correlación positiva entre las variables área y concentración [256].

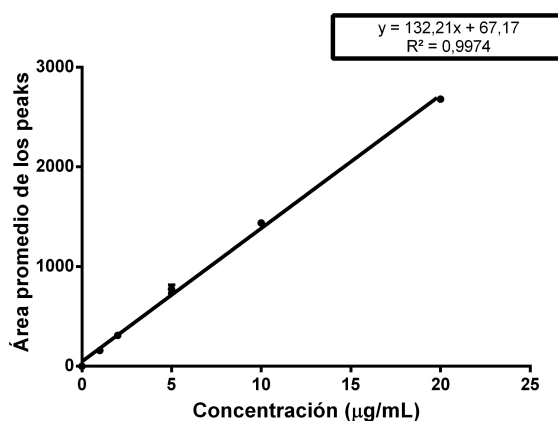


Fig. 5.6 Curva de calibración y linealidad. Fuente: Elaboración propia.

5.2.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Los resultados obtenidos para las 3 curvas de calibración, correspondientes a las concentraciones 0.50 - 0.75 - 1.00 µg/mL, se muestran en la tabla 5.3. Con los datos obtenidos para σ y S, se obtuvo un valor de 0.11 µg/mL para el LOD y 0.34 µg/mL para el LOQ.

Tabla 5.3 Curvas de calibración para la obtención de LOD y LOQ. Fuente: Elaboración propia.

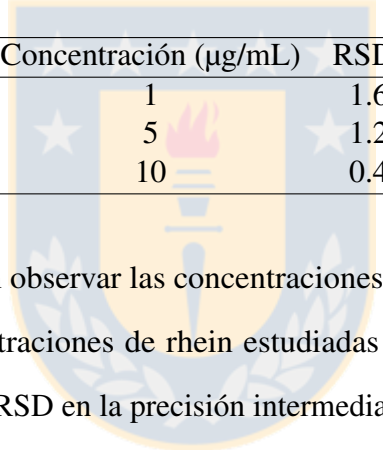
Curva de calibración	Pendientes	Interceptos
1	164.81	-3.05
2	154.60	7.19
3	161.45	4.83
Promedios	160.28	2.92
Desviación estándar	5.20	5.37

5.2.3 Precisión

Para la precisión instrumental se obtuvo una RSD de 2.13% para una serie de 6 inyecciones de una solución de 10 µg/mL de rhein.

En la tabla 5.4 se observan las concentraciones y valores porcentuales de RSD obtenidas para las concentraciones de rhein de 1, 5 y 10 µg/mL, estudiadas en la repetibilidad. Se observa que los valores de RSD porcentual obtenidos para cada concentración son iguales o menores a un 2%, siendo este el valor máximo aceptado para el análisis de especialidades farmacéuticas y materias primas [256].

Tabla 5.4 Concentraciones y RSD para la determinación de la repetibilidad. Fuente: Elaboración propia.



Concentración (µg/mL)	RSD%
1	1.61
5	1.24
10	0.42

En la tabla 5.5 se pueden observar las concentraciones y valores porcentuales de RSD obtenidas para las 3 concentraciones de rhein estudiadas en la precisión intermedia. Se sugiere que los valores de la RSD en la precisión intermedia sean menores al doble del valor de RSD obtenido para repetibilidad [256], en este caso 4.64% para la concentración de 1 µg/mL, 4.34% para la concentración de 5 µg/mL y 3.02 para la concentración de 10 µg/mL. Este criterio se cumple para cada una de las concentraciones estudiadas en este ensayo.

Tabla 5.5 Concentraciones y RSD para la determinación de la precisión intermedia. Fuente: Elaboración propia.

Concentración (µg/mL)	RSD (%)
1	4.17
5	4.12
10	2.27

Tabla 5.6 Porcentajes de recuperación obtenidos para la exactitud. Fuente: Elaboración propia.

Concentración de rhein evaluada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de rhein encontrada (%) \pm S.D.
3	97.68 ± 2.31
7	99.64 ± 1.48
14	98.82 ± 1.24

5.2.4 Exactitud

En la tabla 5.6 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las concentraciones estudiadas. Se puede observar que todos los porcentajes de recuperación son cercanos a un 100%, considerándose como valores adecuados de recuperación los que estén entre un 97 y un 103% para formas farmacéuticas [256], criterio que se ve cumplido en la totalidad de los casos.

5.2.5 Selectividad

Para el estudio de la selectividad se compararon los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a soluciones de concentración conocida de PLGA y de rhein. En la figura 5.7 se puede observar que el PLGA no presenta un pico que esté cercano al del rhein y por lo tanto no interfiere en su medición. El pico cromatográfico observado corresponde a rhein, con un tiempo de retención (t_R) de 7 minutos.

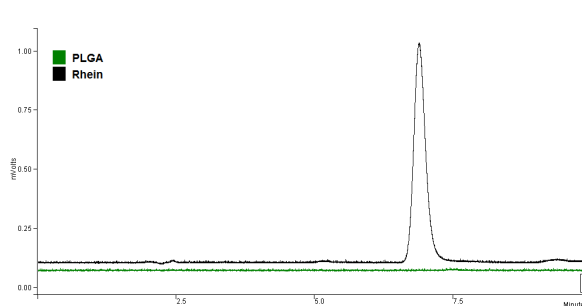


Fig. 5.7 Cromatograma de PLGA y rhein. Peak de rhein, con un $t_R = 7$ minutos. Fuente: Elaboración propia.

5.3 Liberación *in vitro* desde nanopartículas cargadas con rhein

Los perfiles de liberación de rhein desde nanopartículas y suspensión de rhein fueron graficados en la Figura 5.8. El perfil de liberación de rhein desde nanopartículas mostró un "burst" inicial durante los primeros 5 minutos y una liberación continua entre los 5 y 60 minutos estudiados. El porcentaje de liberación de rhein desde nanopartículas cargadas durante los primeros 5 minutos de liberación repentina fue cercano al 50%. Sin embargo, se observó alrededor de un 90% de rhein disuelto a partir de la suspensión de fármaco libre a los 5 minutos, la cual es completada a los 15 minutos.

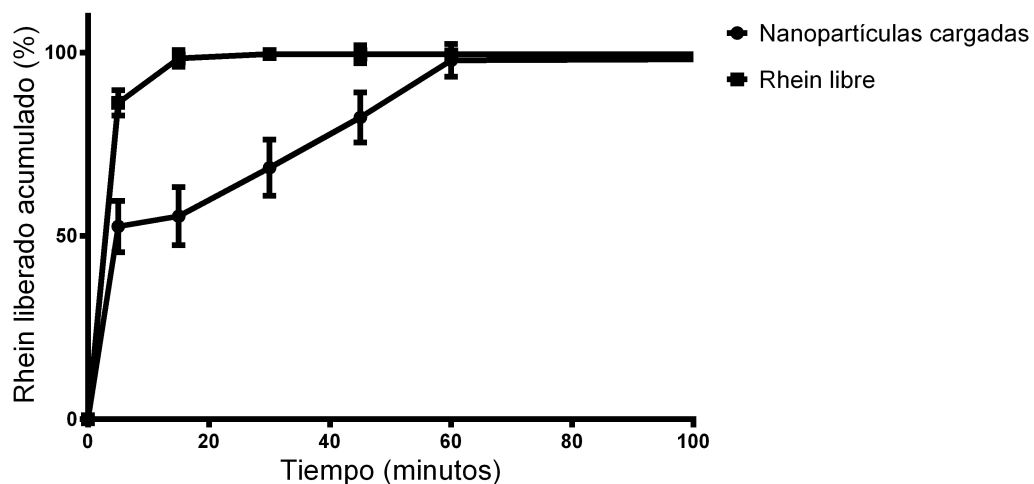


Fig. 5.8 Perfil de liberación dependiente del tiempo para rhein encapsulado en nanopartículas y rhein como fármaco libre (disolución). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Fuente: Elaboración propia.

5.4 Ensayos celulares

5.4.1 Ensayo de viabilidad celular MTT

Se evaluó la citotoxicidad tanto de nanopartículas estériles cargadas con rhein como de nanopartículas blancas, en células THP-1 diferenciadas a macrófagos.

Siguiendo las 24 horas de exposición, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. La influencia de la concentración de los dos grupos de nanopartículas se muestra en la Figura 5.9. Se observa que los macrófagos expuestos a la mayor concentración de nanopartículas cargadas y blancas (5.00 μM) presentan la menor viabilidad porcentual de 12.73 ± 5.41 y 45.60 ± 7.78 , respectivamente. A partir de la tercera mayor concentración de nanopartículas cargadas (1.25 μM) y la cuarta para las nanopartículas blancas (0.60 μM) se llega a un porcentaje de viabilidad mayor a 80%, 87.75 ± 7.34 y 81.24 ± 5.96 para cada una, por lo que a partir de estas concentraciones de nanopartículas se considerarían como biocompatibles y no citotóxicas.

5.4.2 Cuantificación de la citoquina IL-1 β

Se realizó una curva estándar consistente en siete concentraciones de citoquina IL-1 β , la cual comprendía un rango entre 3.90 y 150 pg/mL, según lo especificado en el protocolo del kit de ELISA. La correlación entre la absorbancia leída y la concentración de IL-1 β , fue ajustada con una función polinómica de segundo grado (Figura 5.10).

En la Figura 5.11 se puede observar que existe una diferencia significativa con un $p < 0.0001$ en la concentración de IL-1 β de los sobrenadantes de cultivos de las células tratadas con nanopartículas cargadas con rhein vs nanopartículas blancas para las concentraciones de 5.00 y 1.25 μM , y una diferencia significativa con un $p < 0.001$ para la concentración 2.50 μM . Además, se presentó una diferencia significativa con un $p < 0.0001$ en la concentración de IL-1 β de los sobrenadantes de cultivos de las células tratadas con nanopartículas cargadas

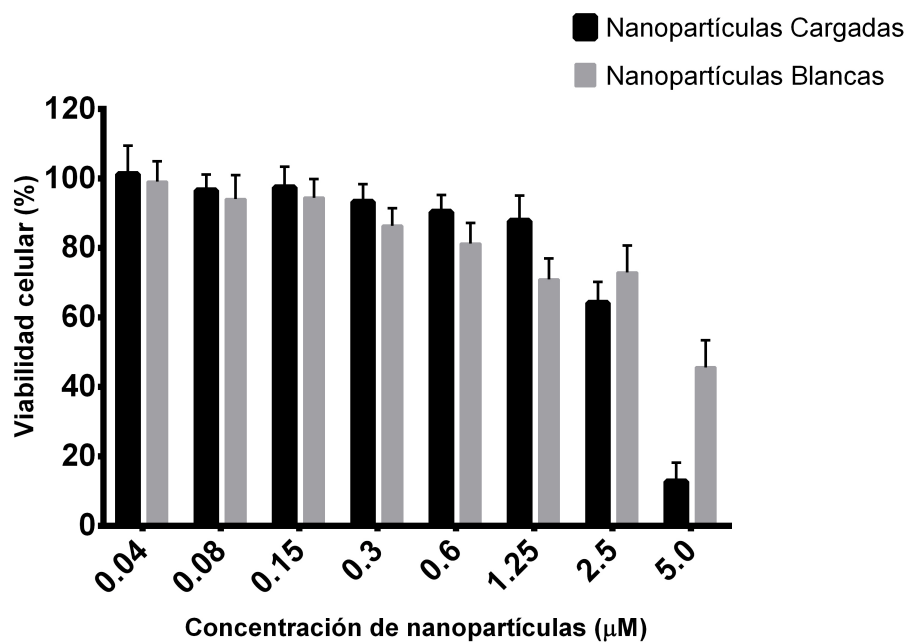


Fig. 5.9 Efecto de la concentración de nanopartículas poliméricas cargadas con rhein y nanopartículas poliméricas blancas sobre la viabilidad celular. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno llevado a cabo con cinco replicados. Fuente: Elaboración propia.

con rhein vs el control, para las tres concentraciones de nanopartículas estudiadas, mientras que entre las nanopartículas blancas y el control no existe una diferencia significativa en la disminución en la concentración de IL-1 β . Esto confirma que estas concentraciones de rhein en las nanopartículas presentan un efecto significativo en la disminución de la síntesis de IL-1 β , por los macrófagos THP-1 activados por LPS. A concentraciones de nanopartículas cargadas menores a 1.25 μ M, los valores de IL-1 β estuvieron presentes bajo la sensibilidad del ensayo.

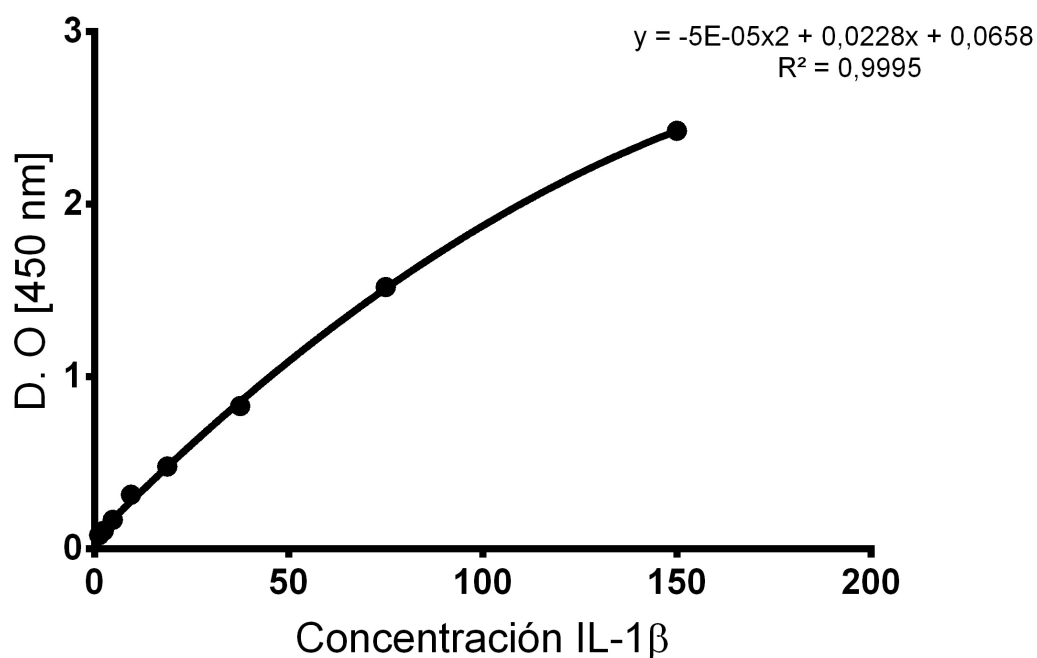


Fig. 5.10 Curva de calibración para la determinación de IL-1 β . Fuente: Elaboración propia.

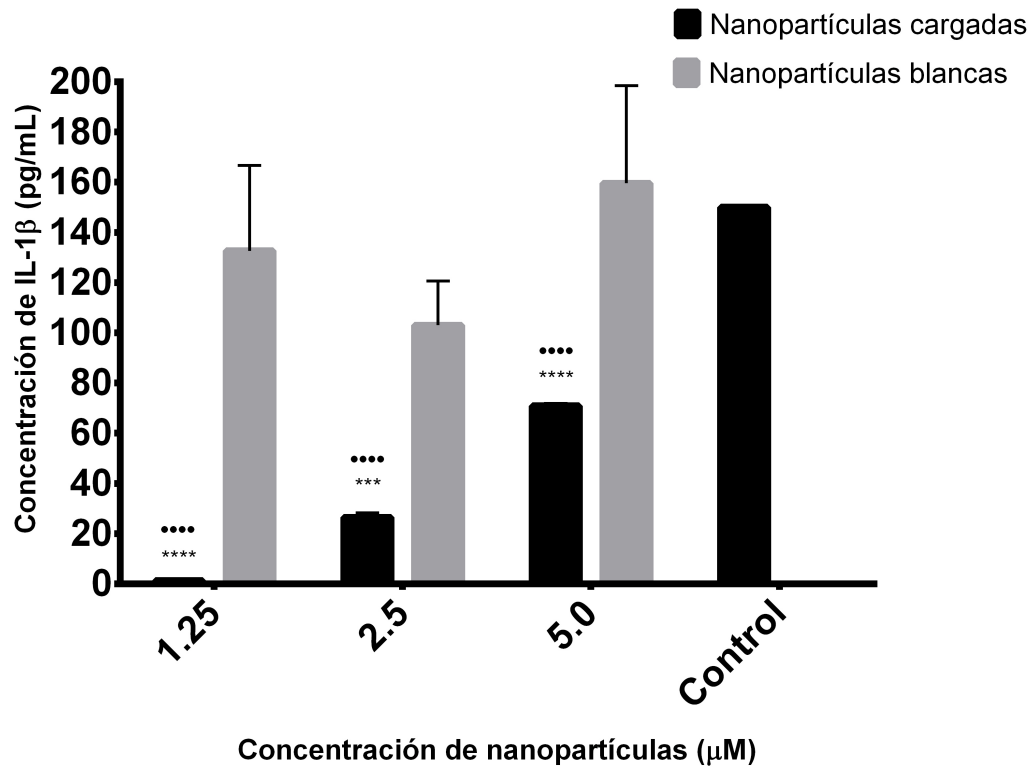


Fig. 5.11 Efecto de nanopartículas poliméricas cargadas y nanopartículas poliméricas blancas sobre la producción de IL-1 β . Los datos representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo con cinco replicados. Donde, *** es una diferencia significativa con un $p < 0.0001$ entre nanopartículas cargadas con rhein vs nanopartículas blancas y **** es una diferencia significativa con un $p < 0.001$ entre nanopartículas cargadas con rhein vs nanopartículas blancas. ●●●● corresponde a una diferencia significativa con un $p < 0.0001$ entre nanopartículas cargadas con rhein vs el control. Fuente: Elaboración propia.

5.4.3 Cuantificación de citoquina TNF α

Se realizó una curva estándar consistente en siete concentraciones de citoquina TNF α , la cual comprendió un rango entre 3.90 y 500 pg/mL, según lo especificado por el protocolo del kit ELISA. La correlación entre la absorbancia leída y la concentración de TNF α , fue ajustada con una función lineal (Figura 5.12). No se pudo cuantificar la concentración de citoquina TNF α en ninguno de los sobrenadantes de cultivo, tanto de las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein como para las nanopartículas poliméricas blancas, debido a

que las lecturas obtenidas estuvieron presentes bajo el primer punto de la curva de calibración, correspondiente a 3.90 pg/mL, y por lo tanto, bajo la sensibilidad del ensayo.

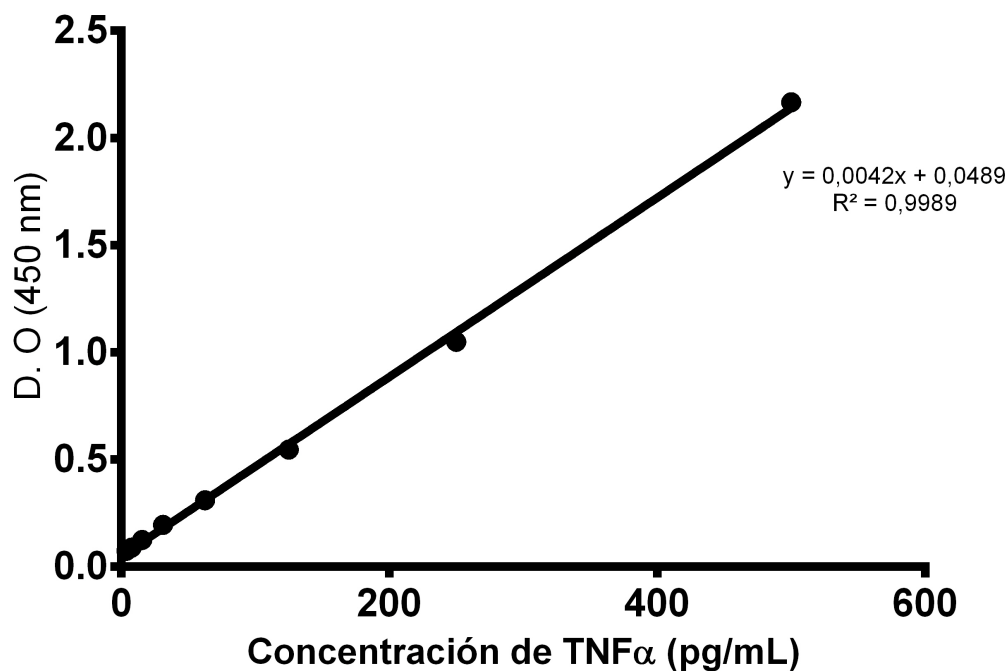


Fig. 5.12 Curva de calibración para la determinación de TNF α . Fuente: Elaboración propia.

5.4.4 Cuantificación de ROS

La producción de ROS y el estrés oxidativo desempeñan un papel importante en la formación y perduración del ambiente inflamatorio en la OA. Se cuantificó la producción de ROS mediante fluorimetría por medio del uso de la sonda DFCH-DA y los resultados obtenidos fueron normalizados en base a la concentración de proteínas.

Se puede observar que la producción de ROS en los macrófagos THP-1 activados con LPS solo se vio inhibida a las dos mayores concentraciones de nanopartículas cargadas de rein, equivalentes a una concentración de 2.50 y 5.00 μ M, respecto al control,

Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la disminución de ROS entre las nanopartículas cargadas y las nanopartículas blancas a excepción de la concentración de

2.50 μM , con un $p < 0.1$ (Figura 5.13). En el caso de la mayor concentración estudiada, se observa una menor presencia de la formación de ROS, pero este efecto se repite para las nanopartículas blancas y puede deberse a la menor presencia de células en la placa, debido a que a esta concentración se presentó una disminución de la viabilidad celular y, por lo tanto, una menor presencia de ROS.

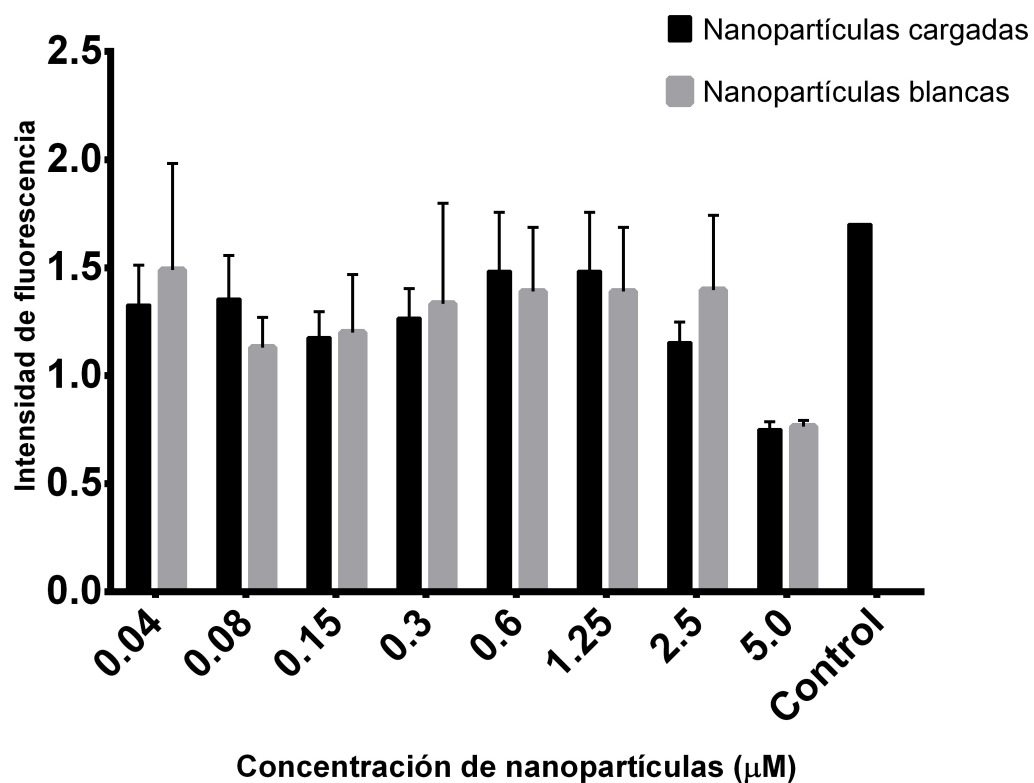


Fig. 5.13 Efecto de nanopartículas poliméricas cargadas y nanopartículas poliméricas blancas en la inducción de formación intracelular de ROS. Los datos representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo con cinco replicados. Fuente: Elaboración propia.

Capítulo 6

DISCUSIÓN

6.1 Optimización de los parámetros de formulación

Los resultados obtenidos de los diseños factoriales completos para el tamaño de las nanopartículas muestran que para la metodología emulsión evaporación de solvente la interacción entre los factores masa de polímero PLGA y volumen de solución rheim/metanol tienen un efecto significativo inversamente proporcional a la respuesta con un nivel de confianza del 95%, disminuyendo el diámetro medio de las nanopartículas, al igual que el efecto cuadrático de la masa de polímero PLGA (Figura 6.1a). La disminución en la concentración de PLGA conduce a la disminución de la viscosidad de la fase orgánica, lo que reduce la tensión cortante neta y promueve la formación de gotas de menor tamaño. Además, la viscosidad decreciente podría facilitar la rápida dispersión de la solución de PLGA en la fase acuosa, dando como resultado gotas de menor tamaño las que forman nanopartículas de menor diámetro medio tras la eliminación del solvente orgánico [257]. Para la metodología doble emulsión tanto el factor concentración de PVA, la masa de polímero PLGA como la interacción entre estos dos factores tienen un efecto significativo a la respuesta con un nivel de confianza del 95%, sobre el tamaño de las nanopartículas (Figura 6.2a). Con respecto al PVA, aumentos en la concentración disminuyen significativamente el tamaño de la nanopartícula, esto se debe

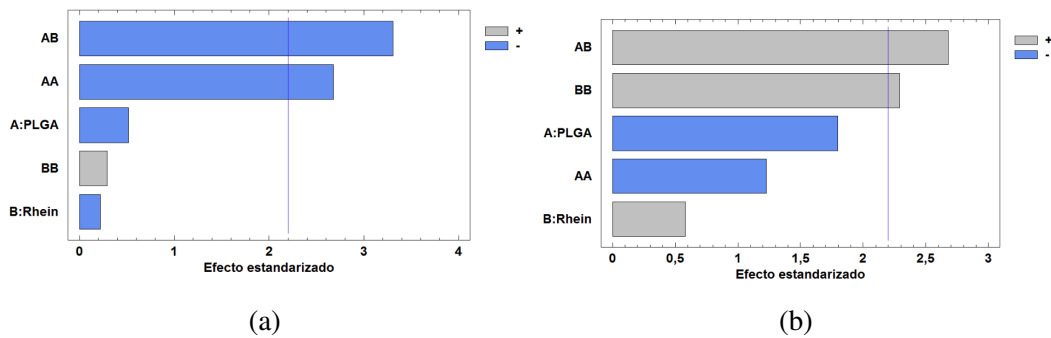


Fig. 6.1 Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología emulsión evaporación de solvente (la línea vertical representa $\alpha = 0.05$). (a): gráfico de Pareto estandarizado para el diametro medio. (b): gráfico de Pareto estandarizado para la eficiencia de encapsulación. Fuente: Elaboración propia.

a que el tensioactivo ayuda a conseguir partículas de menor tamaño debido a su capacidad para estabilizar partículas reducidas en tamaño disminuyendo la tensión superficial de la fase continua [258]. El tamaño de partícula aumentó significativamente y de forma proporcional a la cantidad de polímero. Esto se debe a que al aumentar la concentración de PLGA, aumenta la viscosidad de la solución orgánica, una viscosidad más alta implica una reducción de la tensión tangencial o cortante neta, lo que conduce a la formación de gotas de mayor tamaño [259]. La interacción entre la concentración de PVA y la masa de polímero tienen un efecto significativo en la disminución del diámetro medio de las nanopartículas. En la metodología nanoprecipitación el único factor significativo al nivel de confianza del 95% y con un efecto directamente proporcional, es la masa de polímero PLGA (Figura 6.3a), el cual aumenta el tamaño de las nanopartículas debido al aumento en la viscosidad de la solución orgánica, esto provoca una ralentización en la difusión del solvente orgánico en la fase acuosa, haciendo que se formen gotas más grandes, lo que a su vez produce nanopartículas más grandes [259]. Por otra parte, una mayor concentración de PLGA favorece las interacciones polímero-polímero, por lo tanto más cadenas de polímeros permanecen asociadas durante la difusión del disolvente al medio acuoso [257].

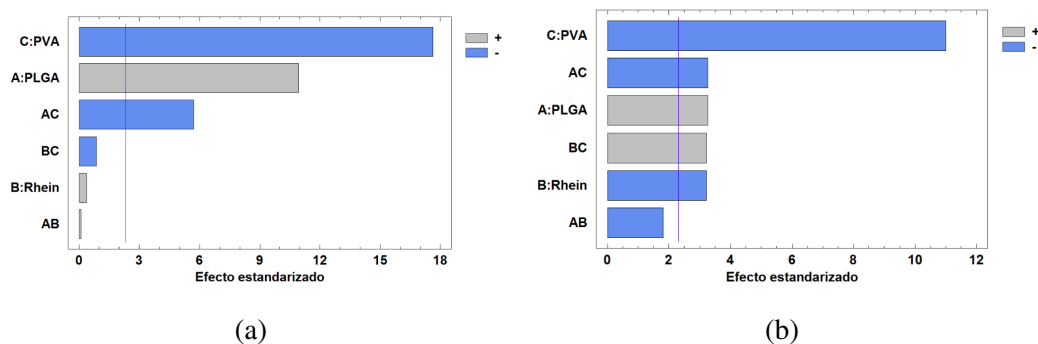


Fig. 6.2 Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología doble emulsión (la línea vertical representa $\alpha = 0.05$). (a): Gráfico de Pareto estandarizado para el diámetro medio. (b): Gráfico de Pareto estandarizado para la eficiencia de encapsulación. Fuente: Elaboración propia.

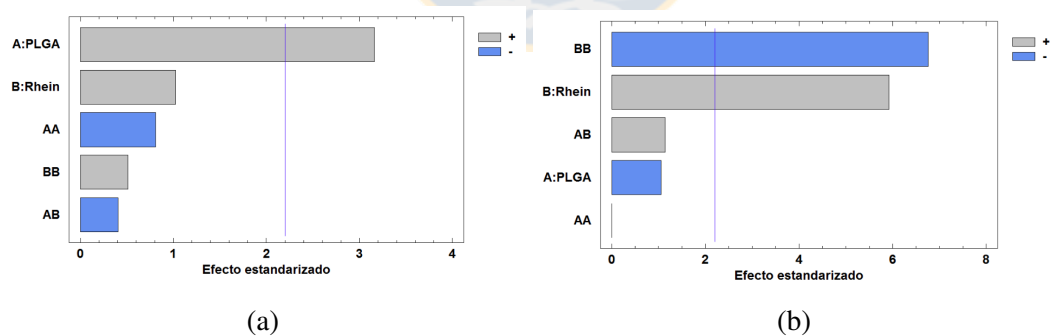


Fig. 6.3 Gráficos de Pareto estandarizados para las respuestas después del diseño factorial completo para la metodología nanoprecipitación (la línea vertical representa $\alpha = 0,05$). (a): Gráfico de Pareto estandarizado para el diámetro medio. (b): Gráfico de Pareto estandarizado para la eficiencia de encapsulación. Fuente: Elaboración propia.

Respecto a la eficiencia de encapsulación, se observa que para la metodología emulsión evaporación de solvente, la interacción entre los factores masa de polímero PLGA y volumen de solución rhein/metanol tienen un efecto significativo directamente proporcional al nivel de confianza del 95%, aumentando la eficiencia porcentual, lo cual se repite para el efecto cuadrático del volumen de solución rhein/metanol (Figura 6.1b). Un aumento en la cantidad de fármaco en la fase orgánica tiene una influencia notable en la eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco, ya que una mayor cantidad de moléculas de fármaco pueden interactuar con las moléculas de PLGA, lo que resulta en un aumento de las cantidades rhein atrapado [260]. En la metodología doble emulsión se presentan efectos significativos en la disminución de la eficiencia de encapsulación al nivel de confianza del 95% por parte de los aumentos en los niveles de concentración de PVA, la interacción entre la concentración de PVA y la cantidad de polímero PLGA, y la concentración de rhein. Por otra parte aumentos en la masa de polímero PLGA y la interacción entre la concentración del fármaco y la concentración de PVA generan un aumento en la eficiencia de encapsulación (Figura 6.2b). Sin embargo el factor de mayor importancia es la disminución de la eficiencia de encapsulación por acción de un aumento en la concentración de PVA, ya que los aumentos en la concentración del tensioactivo aumentan la solubilidad del fármaco en la fase acuosa externa, dejando menos rhein para ser atrapado en las nanopartículas poliméricas [261]. Para la metodología nanoprecipitación (Figura 6.3b), la cantidad de rhein afecta significativamente en un nivel de confianza del 95%, el aumento de la eficiencia de encapsulación. En cambio el efecto cuadrático de este mismo factor de formulación afecta de una manera inversamente proporcional, disminuyendo la eficiencia de encapsulación, debido a que la relación entre la cantidad de rhein y la eficiencia de encapsulación es cuadrática lo que implica que existe un punto de inflexión, en este caso un vértice máximo antes del cual los valores de eficiencia aumentan al aumentar los valores de rhein y después del cual los valores de eficiencia disminuyen.

Los sistemas de administración de fármacos para el suministro intraarticular basados en partículas, se han centrado principalmente en el diseño de micropartículas para evitar la fagocitosis por medio de su tamaño. Estudios han demostrado que el tamaño límite para la fagocitosis en la articulación es de alrededor de 10 a 15 μm [195–197]. Aunque se han usado partículas más grandes para potenciar la administración del fármaco a través del tamaño, también se ha demostrado que nanopartículas de tamaños entre 100 a 200 nm presentan un gran potencial, especialmente cuando se usan junto con ligandos dirigidos que mejoran la unión y retención dentro de las articulaciones en la OA [198]. Se han encontrado que las partículas inyectadas, en general penetran o se asocian a la membrana sinovial [200, 262]. En un estudio realizado por Horisawa et al. [263], una suspensión coloidal de nanoesferas de PLGA, fue fagocitada en la membrana sinovial por los macrófagos infiltrados a través de los tejidos sinoviales. Las nanoesferas fagocitadas se administraron a los tejidos subyacentes profundos. En cambio, una suspensión acuosa de microesferas de PLGA, no fue fagocitada en los macrófagos. Los macrófagos proliferaron ligeramente en el revestimiento epitelial de las células sinoviales y las microesferas se cubrieron con una granulación de células gigantes multinucleadas. Por lo tanto, las nanopartículas de PLGA debiesen ser más adecuadas para el suministro al tejido sinovial inflamado que las microesferas, debido a su capacidad para penetrar en la membrana sinovial. Los sistemas particulados de PLGA que presenten biocompatibilidad en la articulación pueden proporcionar una acción de terapia local en la enfermedad articular de un modo diferente según el tamaño del sistema.

La medición del potencial zeta es actualmente la forma más simple y directa de caracterizar la superficie de los coloides cargados, y se pueden extraer conclusiones fácilmente del análisis de sus datos con respecto a la concentración, distribución, adsorción e ionización [264]. Con respecto a la carga de las nanopartículas obtenidas, la formulación mostró valores de potencial zeta levemente negativos. Una carga negativa es típica de nanopartículas con terminación carboxilo debido a la contribución de los grupos $-\text{COOH}$ y su desprotonación a pH

fisiológico, o en este caso particular, al pH de agua Milli-Q [265]. Aunque las nanopartículas cargadas negativamente pueden enfrentar mayores dificultades en la captación celular, debido a la repulsión electrostática de las membranas celulares, los valores potencial zeta negativos alejados del cero contribuyen a la estabilidad de las partículas en solución evitando la formación de aglomerados y estabilizando así el tamaño de partícula. Adicionalmente, las nanopartículas con carga negativa presentan ventajas sobre sus equivalentes catiónicos, al esperarse que sean menos citotóxicas, ya que con las nanopartículas cargadas positivamente existe el riesgo de causar lisis celular al provocar perturbaciones de la membrana [266, 267]. El potencial zeta puede afectar tanto las propiedades farmacocinéticas de los nanosistemas en el cuerpo [268, 269] como la fagocitosis de las nanopartículas [270, 271]. Nanopartículas con un potencial zeta entre -10 y +10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las nanopartículas con potenciales zeta superiores a +30 mV o inferiores a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y fuertemente aniónicas, respectivamente [272]. En la literatura se sugiere que las partículas cargadas negativamente se unen a los sitios catiónicos en forma de racimos [247] debido a sus interacciones repulsivas con los extensos dominios de carga negativa de la superficie celular. Además, las nanopartículas, ya unidas a la superficie de la célula, presentan una densidad de carga reducida que puede favorecer la adsorción de otras partículas libres. Al parecer, la alta captación celular de nanopartículas cargadas negativamente se relaciona en primer lugar con el proceso no específico de adsorción de nanopartículas en la membrana celular y en segundo lugar con la formación de racimos de nanopartículas. La adsorción de las partículas cargadas negativamente en los sitios con carga positiva a través de la interacción electrostática puede conducir a la neutralización localizada y una posterior flexión de la membrana que favorece a su vez la endocitosis para la captación celular [273]. Por lo tanto considerando la información anteriormente mencionada se puede inferir que las nanopartículas obtenidas debiesen ser captadas principalmente vía la formación de racimos de nanopartículas cargadas negativamente.

La eficiencia de encapsulación obtenida fue menor a otras nanopartículas cargadas con rhein observadas en la literatura. En un estudio realizado por Feng et al. [274], obtuvieron una eficiencia de encapsulación del $90,20\% \pm 2,10\%$, para nanopartículas sólidas lipídicas. En otro estudio, realizado por Wei et al. [275], la eficiencia de encapsulación correspondió a un $62.71\% \pm 3.02\%$, para nanopartículas obtenidas mediante la técnica EES y elaboradas con poli(ácido láctico) y polietilenglicol. En un estudio realizado por Yuan and Gu [276], la eficacia de encapsulación fue del $84,50\% \pm 6,20\%$ para nanopartículas de PLGA obtenidas mediante una metodología EES modificada. La carga igualmente fue menor a lo encontrado en otros estudios, la cual se ha informado entre un rango desde $1.56\% \pm 0.15\%$ hasta un $3.90\% \pm 0.70\%$ [275, 276]. La carga del fármaco puede ser influenciada por el polímero, ya que cuanto más largas son las cadenas de polímero, más fuerte es la hidrofobia, aumentando la compatibilidad con el rhein y así también la carga del fármaco. En el estudio realizado por Yuan and Gu [276], se utilizó un polímero de PLGA de mayor masa molecular relativa, lo que condujo a un aumento en la cantidad de fármaco cargado.

6.2 Liberación *in vitro* desde nanopartículas cargadas con rhein

La liberación de rhein desde las nanopartículas poliméricas cargadas durante los minutos iniciales sugiere la presencia de rhein en la superficie o en la proximidad de la superficie de la nanopartícula [277], el cual difundió rápidamente en el medio de liberación después de su adición en la solución HEPES. En la segunda etapa, la liberación del rhein atrapado fue más lenta y sostenida. Se ha informado que la liberación de fármacos hidrófobos de nanopartículas de PLGA es mediada por la difusión en las primeras etapas, seguida de la liberación mediada por difusión-erosión en las etapas posteriores [219–221]. Esto se relaciona con los resultados del estudio de micropartículas cargadas con rhein realizado por

Gómez-Gaete et al. [278]. En esta investigación se sugiere que una fracción importante del rhein se adsorbe en la superficie o se encapsula en las capas externas de la micropartícula. Este hallazgo está en concordancia con los resultados obtenidos en los estudios de difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido, los que sugieren que el rhein podría estar presente probablemente disperso en la matriz polimérica y una fracción de rhein todavía se puede encontrar en estado cristalino.

Los sistemas de escala múltiple, es decir, de nanopartículas en micropartículas se denominan partículas troyanas, estas ofrecen nuevas posibilidades en el aumento de la carga del fármaco. Otro punto importante de estos sistemas reside en la cinética de liberación del fármaco, la cual puede ser modificada usando esta tecnología. La mayoría de los estudios que tratan con partículas troyanas para la administración de fármacos extienden una nueva posibilidad en la disminución del efecto “burst” de la liberación del fármaco, e incluso en la reducción de la cinética de liberación [279, 280]. Desde el punto de vista biofarmacéutico, se pueden atribuir varias ventajas a esta tecnología particulada, tales como, una reducción de la dosis administrada, aumento de la biodisponibilidad de fármacos poco solubles y de poca absorción, una acción prolongada del fármaco luego de una administración, mejora del índice terapéutico y, por lo tanto, reducción de la toxicidad, mejora en la adherencia al tratamiento farmacológico, posibilidad de uso de vías de administración no invasivas para fármacos que tienen propiedades biofarmacéuticas y/o propiedades farmacocinéticas inadecuadas y la reducción de la exposición general del huésped al agente activo [281].

A pesar de la rápida liberación del rhein desde las nanopartículas poliméricas, sigue siendo una mejora en comparación al fármaco libre. Por lo tanto un sistema troyano, en este caso una formulación microparticulada con nanopartículas en su interior pudiese ser una opción que las proteja y permita así una liberación más controlada del principio activo.

6.3 Ensayos celulares

6.3.1 Ensayo de viabilidad celular MTT

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. El ensayo de reducción del MTT es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables [282]. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular, permitiendo obtener información acerca de la toxicidad del compuesto evaluado, en este caso, la molécula de rhein.

Se han realizado varios estudios que evaluaron el efecto del rhein sobre la viabilidad celular en diversos tipos de células, entre ellas condrocitos, fibroblastos, neutrófilos humanos y THP-1. Se ha evidenciado que la viabilidad celular es cercana al 100% al ser tratadas con rhein en concentraciones que van desde 0.10 a 100 μM , y en un tiempo de exposición a la molécula de 24 y 48 horas de duración [160, 162, 183, 283, 284].

El estudio realizado por Yaron et al. [183], que evaluó la viabilidad celular en presencia de rhein en concentraciones de 10^{-5} a 10^{-7} M, fue realizado en cultivos de fibroblastos sinoviales humanos. Rhein, en el rango de concentraciones de 10^{-6} a 10^{-5} M no mostró ningún efecto perjudicial sobre la viabilidad celular, la cual permaneció mayor a 90% en comparación con los controles. Otro estudio, realizado por Gao et al. [283], mostró que el rhein no afectó la viabilidad celular hasta una concentración de 40 μM , en la línea celular RAW 264.7 y macrófagos estimulados con LPS, manteniendo una viabilidad celular cercana al 100% respecto al control para todas las concentraciones evaluadas (0 a 40 μM).

Por lo tanto, los resultados de los estudios mencionados anteriormente se relacionan con los valores obtenidos en este trabajo, para las concentraciones que se encuentran desde 0.04 μM hasta la tercera mayor concentración de nanopartículas poliméricas cargadas con rhein, correspondiente a 1.25 μM y desde 0.04 μM hasta 0.60 μM , la cuarta mayor concentración para las nanopartículas poliméricas blancas, ya que estas presentan una viabilidad celular porcentual cercana al 100%. En general, los materiales se consideran biocompatibles cuando presentan una viabilidad celular superior al 80% [285].

6.3.2 Cuantificación de la citoquina IL-1 β

En un estudio realizado por Yaron et al. [183], se investigó el efecto de rhein sobre la secreción de IL-1 en tejido sinovial osteoartrítico humano, en presencia y ausencia de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Rhein indujo una disminución dependiente de la dosis en la producción de IL-1 β estimulada por LPS en el cultivo de cartílago humano, con una significación estadística en el rango de 10^{-6} y 10^{-5} M. Otros estudios, como el de Martel-Pelletier et al. [286], Moldovan et al. [160], Sanchez et al. [162] y Tamura et al. [287], realizados en condrocitos humanos, sinoviocitos y células THP-1, también demostraron una disminución de la producción de IL-1 β , concluyendo así que el rhein inhibe significativamente la producción y la función de IL-1 en cultivos de membrana sinovial y cartílago osteoartrítico humano y, por lo tanto, inhibiría los efectos nocivos de IL-1 en OA, al afectar uno de los principales mecanismos por el cuál se desarrolla esta patología.

Cuando la membrana sinovial y el cartílago son tratados con LPS, se induce la producción de IL-1. Rhein inhibe significativamente esta estimulación de la producción de IL-1 a dosis terapéuticas. Esto confirma los hallazgos que indican que la diacereína y su metabolito, el rhein, inhiben la síntesis de IL-1 [286]. Adicionalmente, el rhein produce una disminución en el número de receptores de IL-1 en condrocitos en OA, y esto es de importancia ya que se ha informado un aumento en el número de receptores de IL-1 por célula en condrocitos y

sinoviocitos en OA, lo que produce síntesis de matriz de cartílago OA humana sensible a la inhibición por IL-1 [288]. Estos hallazgos junto con la capacidad del rhein para estimular al antagonista del receptor de IL-1 en el cultivo de cartílago pueden explicar por qué el rhein también tiene una acción inhibitoria sobre la función de la IL-1 en el cartílago.

Los mecanismos intracelulares por los cuales $1L-1\beta$ y $TNF\alpha$ ejercen sus efectos pro-inflamatorios y de inhibición catabólica, son por medio de la regulación a la baja de la activación de algunas MAP quinasas (MAPK). Aunque también se han encontrado otras vías de señalización para diferentes células, incluyendo la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y del factor nuclear- κB (NF- κB) en condrocitos [156, 158] y p38 sobre osteoblastos [289]. En todas las células articulares, rhein reduce las vías catabólicas de OA a través de la inhibición de la vía de señalización MEK/ERK [289, 181, 156, 158].

Considerando que existe una diferencia significativa en la inhibición de $1L-1\beta$ por parte de las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein, en comparación a las nanopartículas poliméricas blancas para las concentraciones 1.25, 2.50 y 5.00 μM , además de presentarse una diferencia significativa para las tres concentraciones de nanopartículas poliméricas cargadas con rhein vs el control, se puede concluir que el rhein inhibe significativamente la producción de $1L-1\beta$ y, por lo tanto, pueden inhibir los efectos nocivos de IL-1 en OA. El mayor efecto en la inhibición de $1L-1\beta$ a la concentración de 1.25 μM , se debe a la mayor viabilidad celular presente a esta concentración, la cual es mayor al 80%, en cambio, para los niveles 2.50 y 5.00 μM se presenta una viabilidad celular disminuida y por lo tanto hay menos cantidad de células por pocillo de la placa, reduciéndose así en menor medida los niveles de $1L-1\beta$.

6.3.3 Cuantificación de citoquina $TNF\alpha$

Se ha demostrado que el rhein disminuye la producción de $TNF\alpha$ en varias líneas celulares, por medio de la regulación a la baja de la activación de algunas MAP cinasas (MAPK) y la supresión de la activación del factor NF- κB mediada por IKKbeta en condrocitos [283].

Las citoquinas son un grupo diverso de proteínas solubles de bajo peso molecular efectivas a concentraciones picomolares. Las citoquinas tienen vidas medias cortas, por lo tanto, se secretan principalmente a demanda para actuar inmediatamente en las células blanco. Debido a sus efectos en muchos tipos de células diferentes, la medición precisa de los niveles de citoquinas es crucial para la comprensión de la fisiopatología de una amplia gama de enfermedades [290].

En un estudio realizado por Ozbey et al. [291], la estabilidad de TNF alfa se vio afectada por el almacenamiento. TNF α fue la citoquina más lábil de todas las estudiadas (MIP-2, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-17A), presentando degradación bajo todas las condiciones de almacenamiento utilizadas (Muestra fresca, congelamiento en nitrógeno líquido, almacenamiento a 4° C durante 48 horas, 1, 2 y 4 semanas, almacenamiento a -80° C y descongelada en múltiples ocasiones). Del estudio se concluyó que los niveles de TNF α deben determinarse en muestras frescas. Además, diferencias similares en la estabilidad de las citoquinas también se han informado en otros estudios [292].

En este trabajo, todos los sobrenadantes de cultivo mostraron valores bajo la sensibilidad del ensayo. Considerando la baja vida media de la citoquina TNF α soluble y que para la realización de este ensayo algunos de los sobrenadantes estuvieron congelados a -20° C durante un periodo cercano a las tres semanas y además tuvieron que pasar por un proceso de descongelamiento al momento de la realización del ensayo, es posible que la citoquina se haya visto afectada por este almacenamiento y debido a su baja estabilidad, no se logró determinar su presencia en los sobrenadantes de cultivo incluso considerando la alta sensibilidad del ensayo (3.90 pg/mL).

6.3.4 Cuantificación de ROS

Como se mencionó anteriormente, la liberación de IL-1 β , HMGB1 y TNF α esta regulada por caspasa-1, cuya actividad puede ser inhibida específicamente por el aumento en las

concentraciones de superóxido a través de la oxidación reversible y la glutationilación de los residuos de cisteína Cys397 y Cys362 sensibles a redox [293]. Rhein, un compuesto fenólico que contiene grupos hidroxilo, y podría inhibir la producción de anión superóxido de neutrófilos humanos [294].

Un estudio realizado por Gao et al. [283], demostró que el rhein puede disminuir marcadamente los niveles de ROS intracelular inducidos por LPS, ya sea por eliminación directa de superóxido así como por la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa [283, 284]. Estos resultados evidenciaron que rhein reduce significativamente la especie radical superóxido, que a su vez amplificó la liberación de IL-1 β y HMGB1, sin afectar la liberación de TNF α [283]. El efecto proinflamatorio y catabólico del TNF α está mediado por la activación de la señalización del factor NF- κ B. El NF- κ B media la expresión de varios genes inflamatorios, los que codifican iNOS, COX-2 y quimioquinas, y también contribuye a la inducción de MMP-1, MMP-9, MMP-13 y ADAMTS-4 [295].

Se observó que la producción de ROS solo se vio inhibida a las dos mayores concentraciones de nanopartículas cargadas de rhein, equivalentes a 2.50 y 5.00 μ M, respecto al control, lo cual estaría relacionado a la inhibición de la producción de la especie radical superóxido. Esto se relaciona en cierta medida con lo encontrado en el estudio de Gómez-Gaete et al. [278], donde a concentraciones mayores a 6.90 μ M, y hasta 55.00 μ M existe una inhibición de ROS. Por lo tanto se puede inferir que debido a que la estimulación de los macrófagos induce la producción de ROS, un aumento en los niveles de O₂⁻ puede inhibir la actividad caspasa-1 mediante la regulación de la oxidación y glutationilación de residuos específicos de cisteína [293]. Rhein inhibe la producción de aniones O₂⁻ desde neutrófilos humanos [294] y este efecto inhibitor explicaría su actividad terapéutica. Para la concentración de 5.00 μ M y las menores a 2.50 μ M, no se observó una diferencia significativa en la producción de ROS respecto a las nanopartículas blancas, esto se puede deber a la baja carga del fármaco en las nanopartículas, no alcanzándose niveles necesarios para producir la inhibición en la

producción de ROS *in vitro*, sin embargo la significancia estadística de estos resultados no es suficiente para concluir con certeza, la disminución en la producción de ROS, siendo necesaria la realización de más ensayos de cuantificación para corroborar los resultados de este experimento.

Es de importancia que no exista un incremento en la producción de ROS respecto al control, ya que existe evidencia de que las nanopartículas pueden inducir un aumento de los niveles de ROS, lo que eventualmente activaría rutas inflamatorias [296].



Capítulo 7

CONCLUSIONES

En este estudio se elaboraron exitosamente nanopartículas de PLGA cargadas de rhein mediante metodologías de emulsión evaporación de solvente, doble emulsión y nanoprecipitación. Se emplearon diseños factoriales completos para optimizar las variables que afectan la formulación midiendo como respuestas el diámetro medio, la polidispersidad y la eficiencia de encapsulación.

Como resultado del estudio se obtuvo que la emulsión evaporación de solvente fue el mejor método para obtener nanopartículas con las especificaciones deseadas, al obtenerse valores óptimos de diámetro medio, polidispersidad y maximización de eficiencia de encapsulación. El tamaño de las nanopartículas poliméricas fue confirmado mediante microscopía de fuerza atómica. Las micrografías mostraron una población monodispersa de partículas cuasi esféricas con tamaños bien definidos, que estaban en todo momento por debajo de 200 nm.

Se realizó la validación de una técnica de HPLC para cuantificar nanopartículas de rhein y el fármaco desde la cinética de liberación *in vitro*. Se evaluó linealidad, LOQ y LOD, precisión, exactitud y selectividad, que demuestran que el método cumple los requisitos técnicos establecidos bajo guías de formulación farmacéutica.

Se evaluó la cinética de liberación de las nanopartículas poliméricas, mediante un estudio *in vitro*, el que comparó la liberación del principio activo desde las nanopartículas y la disolución del rhein libre. La disolución del fármaco libre es casi total a los 5 minutos, en cambio para las nanopartículas la liberación es cercana a la totalidad a la primera hora del ensayo.

Adicionalmente se realizaron estudios *in vitro* del efecto de las nanopartículas poliméricas desarrolladas sobre la línea celular THP-1. Las nanopartículas poliméricas blancas no fueron citotóxicas para las células THP-1 entre las concentraciones 0.04 y 0.60 μM . Las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein no afectaron la viabilidad celular tras 24 horas de incubación, en el rango de 0.04 a 1.25 μM .

La cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias evidenció que a todas las concentraciones estudiadas, tanto las nanopartículas poliméricas blancas como las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein, no inducen una respuesta inflamatoria. Con respecto a las IL-1 β , se observó que las nanopartículas poliméricas cargadas con rhein inhiben su producción significativamente con respecto al control y las nanopartículas poliméricas blancas en concentraciones desde 1.25 y 5.00 μM .

La producción de ROS por las nanopartículas cargadas con rhein se inhibió solo en la concentración 2.50 μM vs nanopartículas blancas, y entre las concentraciones 2.50 y 5.00 μM vs el control, sin embargo la significancia estadística de estos resultados no es suficiente para concluir con certeza, la disminución en la producción de ROS *in vitro*. No existió un incremento en la producción de ROS respecto al control para todas las nanopartículas estudiadas.

La hipótesis de este trabajo se acepta parcialmente puesto que si bien se obtuvieron nanopartículas de rhein que no fueron citotóxicas y que tuvieron propiedades antiinflamatorias, éstas no liberaron el fármaco de manera controlada. Lo anterior deja como perspectiva

idear estrategias para mejorar este aspecto, lo cual otorgaría reales potencialidades terapéuticas al sistema desarrollado.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Theo Vos, Abraham D Flaxman, Mohsen Naghavi, Rafael Lozano, Catherine Michaud, Majid Ezzati, and Kenji Shibuya. et al. Years lived with disability (ylds) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet*, 380(9859):2163 – 2196, 2012. ISSN 0140-6736. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617292>.
- [2] Marita Cross, Emma Smith, Damian Hoy, Sandra Nolte, Ilana Ackerman, Marlene Fransen, Lisa Bridgett, Sean Williams, Francis Guillemin, Catherine L Hill, Laura L. Laslett, Graeme Jones, Flavia Cicuttini, Richard Osborne, Theo Vos, Rachelle Buchbinder, Anthony Woolf, and Lyn March. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7):1323–1330, 2014. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204763. URL <http://ard.bmj.com/content/73/7/1323>.
- [3] David J Hunter and David T Felson. Osteoarthritis. *BMJ*, 332(7542):639–642, 2006. ISSN 0959-8138. doi: 10.1136/bmj.332.7542.639. URL <http://www.bmj.com/content/332/7542/639>.
- [4] Kelvin P Jordan, Anna Jöud, Charlotte Bergknut, Peter Croft, John J Edwards, George Peat, Ingemar F Petersson, Aleksandra Turkiewicz, Ross Wilkie, and Martin Englund. International comparisons of the consultation prevalence of musculoskeletal conditions using population-based healthcare data from england and sweden. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(1):212–218, 2013. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202634. URL <http://ard.bmj.com/content/73/1/212>.
- [5] Clémence Palazzo, Jean-François Ravaud, Agathe Papeard, Philippe Ravaud, and Serge Poiraudau. The burden of musculoskeletal conditions. *PLOS ONE*, 9(3):1–9, 03 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0090633. URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090633>.
- [6] Charles G. Helmick, David T. Felson, Reva C. Lawrence, Sherine Gabriel, Rosemarie Hirsch, C. Kent Kwok, Matthew H. Liang, Hilal Maradit Kremers, Maureen D. Mayes, Peter A. Merkel, Stanley R. Pillemer, John D. Reveille, John H. Stone, and National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the united states: Part i. *Arthritis and Rheumatism*, 58(1):15–25, 2008. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.23177. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.23177>.
- [7] Richard Birtwhistle, Rachael Morkem, George Peat, Tyler Williamson, Michael E. Green, Shahriar Khan, and Kelvin P. Jordan. Prevalence and management of os-

- teoarthritis in primary care: an epidemiologic cohort study from the canadian primary care sentinel surveillance network. *CMAJ Open*, 3(3):E270–E275, 2015. doi: 10.9778/cmajo.20150018. URL <http://cmajopen.ca/content/3/3/E270.abstract>.
- [8] Paul Dieppe. Epidemiology of the rheumatic diseases. *International Journal of Epidemiology*, 31(5):1079, 2002. doi: 10.1093/ije/31.5.1079-a. URL <http://dx.doi.org/10.1093/ije/31.5.1079-a>.
- [9] Daniel Prieto-Alhambra, Andrew Judge, M Kassim Javaid, Cyrus Cooper, Adolfo Diez-Perez, and Nigel K Arden. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(9):1659–1664, 2014. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203355. URL <http://ard.bmj.com/content/73/9/1659>.
- [10] Arvind Chopra. The copcord world of musculoskeletal pain and arthritis. *Rheumatology*, 52(11):1925, 2013. doi: 10.1093/rheumatology/ket222. URL <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ket222>.
- [11] Ministerio de Salud. Encuesta nacional de salud (ens) chile 2009-2010. 2010.
- [12] Susan A. Oliveria, David T. Felson, John I. Reed, Priscilla A. Cirillo, and Alexander M. Walker. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis and Rheumatism*, 38(8):1134–1141, 1995. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.1780380817. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780380817>.
- [13] Harry Kotlarz, Candace L. Gunnarsson, Hai Fang, and John A. Rizzo. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the us: Evidence from national survey data. *Arthritis and Rheumatism*, 60(12):3546–3553, 2009. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.24984. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.24984>.
- [14] Gino De Angelis and Yue Chen. Obesity among women may increase the risk of arthritis: observations from the canadian community health survey, 2007–2008. *Rheumatology International*, 33(9):2249–2253, 2013. ISSN 1437-160X. doi: 10.1007/s00296-013-2712-5. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-013-2712-5>.
- [15] Victoria L. Johnson and David J. Hunter. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 28(1):5 – 15, 2014. ISSN 1521-6942. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2014.01.004>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694214000059>. Osteoarthritis: Moving from Evidence to Practice.
- [16] D. Felson, R. Lawrence, P. Dieppe, and et al. Osteoarthritis: New insights. part 1: the disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*, 133(8):635–646, 2000. doi: 10.7326/0003-4819-133-8-200010170-00016. URL <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-133-8-200010170-00016>.
- [17] Anna Litwic, Mark H. Edwards, Elaine M. Dennison, and Cyrus Cooper. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*, 105(1):185, 2013. doi: 10.1093/bmb/lds038. URL <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/lds038>.

- [18] Velandai K. Srikanth, Jayne L. Fryer, Guangju Zhai, Tania M. Winzenberg, David Hosmer, and Graeme Jones. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(9):769–781, 2017/06/17 2005. doi: 10.1016/j.joca.2005.04.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.014>.
- [19] Bianca M. de Klerk, Dieuwke Schiphof, Frans P. M. J. Groeneveld, Bart W. Koes, Gerjo J. V. M van Osch, Joyce B. J. van Meurs, and Sita M. A. Bierma-Zeinstra. No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review. *Rheumatology*, 48(9):1160, 2009. doi: 10.1093/rheumatology/kep194. URL [+http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kep194](http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kep194).
- [20] V. Silverwood, M. Blagojevic-Bucknall, C. Jinks, J.L. Jordan, J. Protheroe, and K.P. Jordan. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(4):507 – 515, 2015. ISSN 1063-4584. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458414013429>.
- [21] Liying Jiang, Wenjing Tian, Yingchen Wang, Jiasheng Rong, Chundan Bao, Yupeng Liu, Yashuang Zhao, and Chaoxu Wang. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*, 79(3):291 – 297, 2012. ISSN 1297-319X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.05.015>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X11001370>.
- [22] Pascal Richette, Christine Poitou, Patrick Garnero, Eric Vicaut, Jean-Luc Bouillot, Jean-Marc Lacorte, Arnaud Basdevant, Karine Clément, Thomas Bardin, and Xavier Chevalier. Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(1):139–144, 2010. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.2010.134015. URL <http://ard.bmj.com/content/70/1/139>.
- [23] Robin Christensen, Else Marie Bartels, Arne Astrup, and Henning Bliddal. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(4):433–439, 2007. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.2006.065904. URL <http://ard.bmj.com/content/66/4/433>.
- [24] Margreth Grotle, Kare B. Hagen, Bard Natvig, Fredrik A. Dahl, and Tore K. Kvien. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 9(1): 132, 2008. ISSN 1471-2474. doi: 10.1186/1471-2474-9-132. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-9-132>.
- [25] S. Kluzek, J. L. Newton, and N. K. Arden. Is osteoarthritis a metabolic disorder? *British Medical Bulletin*, 115(1):111, 2015. doi: 10.1093/bmb/ldv028. URL [+http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldv028](http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldv028).
- [26] Tim D. Spector and Alex J. MacGregor. Risk factors for osteoarthritis: genetics¹. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12:39–44, 2017/06/18 2004. doi: 10.1016/j.joca.2003.09.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2003.09.005>.

- [27] Aarno Palotie, Jürg Ott, Kati Elima, Kathryn Cheah, Pirjo Väisänen, Lasse Ryhänen, Miikka Vikkula, Eero Vuorio, and Leena Peltonen. Predisposition to familial osteoarthritis linked to type ii collagen gene. *The Lancet*, 333(8644): 924–927, 2017/06/19 1989. doi: 10.1016/S0140-6736(89)92507-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92507-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92507-5).
- [28] Kay Chapman, Atsushi Takahashi, Ingrid Meulenbelt, Chris Watson, Julio Rodriguez-Lopez, Rainer Egli, Aspasia Tsezou, Konstantinos N. Malizos, Margreet Kloppenburg, Dongquan Shi, Lorraine Southam, Ruud van der Breggen, Rachelle Donn, Jianghui Qin, Michael Doherty, P. Eline Slagboom, Gillian Wallis, Naoyuki Kamatani, Qing Jiang, Antonio Gonzalez, John Loughlin, and Shiro Ikegawa. A meta-analysis of european and asian cohorts reveals a global role of a functional snp in the 5 utr of gdf5 with osteoarthritis susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 17(10):1497, 2008. doi: 10.1093/hmg/ddn038. URL [+http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn038](http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn038).
- [29] David T. Felson, Jingbo Niu, Margaret Clancy, Piran Aliabadi, Burton Sack, Ali Guermazi, David J. Hunter, Shreyasee Amin, Gail Rogers, and Sarah L. Booth. Low levels of vitamin d and worsening of knee osteoarthritis: Results of two longitudinal studies. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1):129–136, 2007. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.22292. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.22292>.
- [30] Timothy E. McAlindon, Paul Jacques, Yuqing Zhang, Marian T. Hannan, Piran Aliabadi, Barbara Weissman, David Rush, Daniel Levy, and David T. Felson. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis and Rheumatism*, 39(4):648–656, 1996. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.1780390417. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780390417>.
- [31] McAlindon T, LaValley M, Schneider E, and et al. Effect of vitamin d supplementation on progression of knee pain and cartilage volume loss in patients with symptomatic osteoarthritis: A randomized controlled trial. *JAMA*, 309(2):155–162, 2013. doi: 10.1001/jama.2012.164487. URL [+http://dx.doi.org/10.1001/jama.2012.164487](http://dx.doi.org/10.1001/jama.2012.164487).
- [32] McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, and et al. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin d to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the framingham study. *Annals of Internal Medicine*, 125(5):353–359, 1996. doi: 10.7326/0003-4819-125-5-199609010-00001. URL [+http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-125-5-199609010-00001](http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-125-5-199609010-00001).
- [33] J. R. Slauterbeck, P. Kousa, B. C. Clifton, S. Naud, T. W. Tourville, R. J. Johnson, and B. D. Beynon. Geographic mapping of meniscus and cartilage lesions associated with anterior cruciate ligament injuries. *J Bone Joint Surg Am*, 91(9):2094–2103, Sep 2009.
- [34] Britt Elin Øiestad, Lars Engebretsen, Kjersti Storheim, and May Arna Risberg. Winner of the 2008 systematic review competition: Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury. *The American Journal of Sports Medicine*, 37(7):1434–1443, 2009. doi: 10.1177/0363546509338827. URL <http://dx.doi.org/10.1177/0363546509338827>. PMID: 19567666.
- [35] S. P. Messier, C. Legault, S. Mihalko, G. D. Miller, R. F. Loeser, P. DeVita, M. Lyles, F. Eckstein, D. J. Hunter, J. D. Williamson, and B. J. Nicklas. The Intensive Diet and

- Exercise for Arthritis (IDEA) trial: design and rationale. *BMC Musculoskelet Disord*, 10:93, Jul 2009.
- [36] Peter Croft, Cyrus Cooper, C. Wickham, and David Coggon. Osteoarthritis of the hip and occupational activity. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, (1): 59—63, Feb 1992. URL http://www.sjweh.fi/show_abstract.php?abstract_id=1608.
- [37] Nortin M. Hadler, Dennis B. Gillings, Harold R. Imbus, Peter M. Levitin, Diane Makuc, Peter D. Utsinger, William J. Yount, Derwood Slusser, and Nancy Moskovitz. Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis and Rheumatism*, 21 (2):210–220, 1978. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.1780210206. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780210206>.
- [38] Johann Clouet, Claire Vinatier, Christophe Merceron, Marianne Pot-vaucel, Yves Maugars, Pierre Weiss, Gaël Grimandi, and Jérôme Guicheux. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discovery Today*, 14(19): 913 – 925, 2009. ISSN 1359-6446. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.012>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644609002566>.
- [39] A. Robin Poole, Toshi Kojima, Tadashi Yasuda, Fackson Mwale, Masahiko Kobayashi, and Sheila Laverty. Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391:S26–S33, 2001. URL http://journals.lww.com/corr/Fulltext/2001/10001/Composition_and_Structure_of_Articular_Cartilage_.4.aspx.
- [40] David B Burr. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12:20 – 30, 2004. ISSN 1063-4584. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2003.09.016>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458403002553>. The Role of Bone in the Treatment of Osteoarthritis: Proceedings of the 2001 Coral Gables Symposium.
- [41] P Dieppe and J Kirwan. The localization of osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 33(3): 201–203, Mar 1994. ISSN 0263-7103 (Print); 0263-7103 (Linking).
- [42] Jin Nam, Priyangi Perera, Jie Liu, Bjoern Rath, James Deschner, Robert Gassner, Timothy A Butterfield, and Sudha Agarwal. Sequential alterations in catabolic and anabolic gene expression parallel pathological changes during progression of monoiodoacetate-induced arthritis. *PLoS ONE*, 6(9):e24320, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0024320. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3172226/>.
- [43] Linda J. Sandell and Thomas Aigner. Articular cartilage and changes in arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 3(2):107, Jan 2001. ISSN 1478-6362. doi: 10.1186/ar148. URL <https://doi.org/10.1186/ar148>.
- [44] K. P. H. Pritzker, S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J. P. Pelletier, P. A. Revell, D. Salter, and W. B. van den Berg. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1):13–29, 2006. doi: 10.1016/j.joca.2005.07.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>.

- [45] Leonore C Dijkgraaf, Lambert G. M de Bont, Geert Boering, and Robert S. B Liem. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53(8):924–929, 2017/07/26 1995. doi: 10.1016/0278-2391(95)90283-X. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0278-2391\(95\)90283-X](http://dx.doi.org/10.1016/0278-2391(95)90283-X).
- [46] Mary B. Goldring and Steven R. Goldring. Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3):626–634, 2007. ISSN 1097-4652. doi: 10.1002/jcp.21258. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21258>.
- [47] Arjen B. Blom, Peter L. E. M. van Lent, Astrid E. M. Holthuysen, Peter M. van der Kraan, Johannes Roth, Nico van Rooijen, and Wim B. van den Berg. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(8):627–635, 2017/07/26 2004. doi: 10.1016/j.joca.2004.03.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2004.03.003>.
- [48] T. Aigner, A. Sachse, P.M. Gebhard, and H.I. Roach. Osteoarthritis: Pathobiology—targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(2):128 – 149, 2006. ISSN 0169-409X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.020>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000123>. Drug Delivery in Degenerative Joint Disease.
- [49] Jan Bondeson, Shane D. Wainwright, Sarah Lauder, Nick Amos, and Clare E. Hughes. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8(6):R187, Dec 2006. ISSN 1478-6354. doi: 10.1186/ar2099. URL <https://doi.org/10.1186/ar2099>.
- [50] Richard F Loeser. Aging and osteoarthritis: The role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 17(8):971–979, 08 2009. doi: 10.1016/j.joca.2009.03.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713363/>.
- [51] Lin Xu, Haibing Peng, Sonya Glasson, Peter L. Lee, Kenpan Hu, Kosei Ijiri, Bjorn R. Olsen, Mary B. Goldring, and Yefu Li. Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 56(8):2663–2673, 2007. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.22761. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.22761>.
- [52] Furuzawa-Carballeda and Alcocer-Varela. Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 50(2):215–222, 1999. ISSN 1365-3083. doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00573.x. URL <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00573.x>.
- [53] D P Page Thomas, B King, T Stephens, and J T Dingle. In vivo studies of cartilage regeneration after damage induced by catabolin/interleukin-1. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 50(2):75–80, 02 1991. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1004341/>.

- [54] Jean-Pierre Pelletier, Johanne Martel-Pelletier, and Steven B. Abramson. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism*, 44(6):1237–1247, 2001. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(200106)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F).
- [55] Nidhi Sofat. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(5):463–479, 2009. ISSN 1365-2613. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00676.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00676.x>.
- [56] P S Grabowski, P K Wright, R J Van 't Hof, M H Helfrich, H Ohshima, and S H Ralston. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 36(6):651–655, Jun 1997. ISSN 0263-7103 (Print); 0263-7103 (Linking).
- [57] I B McInnes, B P Leung, M Field, X Q Wei, F P Huang, R D Sturrock, A Kinnmonth, J Weidner, R Mumford, and F Y Liew. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *Journal of Experimental Medicine*, 184(4):1519–1524, 1996. ISSN 0022-1007. doi: 10.1084/jem.184.4.1519. URL <http://jem.rupress.org/content/184/4/1519>.
- [58] M. Mathy-Hartert, L. Hogge, C. Sanchez, G. Deby-Dupont, J. M. Crielaard, and Y. Henrotin. Interleukin-1 beta; and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(7):756–763, 2017/08/01 2008. doi: 10.1016/j.joca.2007.10.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2007.10.009>.
- [59] Nada Alaaeddine, John A Di Battista, Jean-Pierre Pelletier, Kayghobad Kiansa, Jean-Marie Cloutier, and Johanne Martel-Pelletier. Differential effects of il-8, lif (pro-inflammatory) and il-11 (anti-inflammatory) on tnf- α -induced pge2 release and on signalling pathways in human oa synovial fibroblasts. *Cytokine*, 11(12):1020 – 1030, 1999. ISSN 1043-4666. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/cyto.1999.0505>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104346669905057>.
- [60] O.Sahap Atik. Leukotriene b4 and prostaglandin e2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 39(4):253 – 254, 1990. ISSN 0952-3278. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0952-3278\(90\)90002-3](http://dx.doi.org/10.1016/0952-3278(90)90002-3). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0952327890900023>.
- [61] M J Benito, D J Veale, O FitzGerald, W B van den Berg, and B Bresnihan. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(9):1263–1267, 2005. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.2004.025270. URL <http://ard.bmj.com/content/64/9/1263>.
- [62] Wim B van den Berg. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5):250–250, 2009. doi: 10.1186/ar2803. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787282/>.
- [63] M N Farahat, G Yanni, R Poston, and G S Panayi. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the*

- Rheumatic Diseases*, 52(12):870–875, 1993. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.52.12.870. URL <http://ard.bmj.com/content/52/12/870>.
- [64] H. E. Barksby, W. Hui, I. Wappler, H. H. Peters, J. M. Milner, C. D. Richards, T. E. Cawston, and A. D. Rowan. Interleukin-1 in combination with oncostatin m up-regulates multiple genes in chondrocytes: Implications for cartilage destruction and repair. *Arthritis and Rheumatism*, 54(2):540–550, 2006. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.21574. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.21574>.
- [65] Jeremie Sellam and Francis Berenbaum. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 6(11):625–635, 11 2010. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.159>.
- [66] Ralf H. Wittenberg, Roland E. Willburger, Karin S. Kleemeyer, and Bernhard A. Peskar. In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis & Rheumatism*, 36(10):1444–1450, 1993. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.1780361017. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780361017>.
- [67] M D Smith, S Triantafillou, A Parker, P P Youssef, and M Coleman. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*, 24(2):365–371, Feb 1997. ISSN 0315-162X (Print); 0315-162X (Linking).
- [68] Saski Sutton, Abigail Clutterbuck, Pat Harris, Thom Gent, Sarah Freeman, Neil Foster, Richard Barrett-Jolley, and Ali Mobasheri. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 179(1):10 – 24, 2009. ISSN 1090-0233. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.013>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002900>.
- [69] Tim E. Cawston and Amy J. Wilson. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20(5):983–1002, 2017/08/04 2006. doi: 10.1016/j.berh.2006.06.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2006.06.007>.
- [70] Wu-Shiun Hou, Weijie Li, Gernot Keyszer, Ekkehard Weber, Roger Levy, Michael J. Klein, Ellen M. Gravallesse, Steven R. Goldring, and Dieter Brömme. Comparison of cathepsins k and s expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis & Rheumatism*, 46(3):663–674, 2002. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.10114. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.10114>.
- [71] Yrjo T Konttinen, Jami Mandelin, Tian-Fang Li, Jari Salo, Jan Lassus, Mikko Liljeström, Mika Hukkanen, Michiaki Takagi, Ismo Virtanen, and Seppo Santavirta. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin k in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 46(4):953–960, Apr 2002. ISSN 0004-3591 (Print); 0004-3591 (Linking).
- [72] Mária Pásztói, György Nagy, Pál Géher, Tamás Lakatos, Kálmán Tóth, Károly Wellinger, Péter Pócza, Bence György, Marianna C Holub, Ágnes Kittel, Krisztina Pálóczy, Mercédesz Mazán, Péter Nyirkos, András Falus, and Edit I Buzas. Gene

- expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*, 11 (3):R68–R68, 2009. doi: 10.1186/ar2697. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714114/>.
- [73] A. Struglics, S. Larsson, M. A. Pratta, S. Kumar, M. W. Lark, and L. S. Lohmander. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(2):101–113, 2006. doi: 10.1016/j.joca.2005.07.018. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.018>.
- [74] Arjen B. Blom, Peter L. van Lent, Sten Libregts, Astrid E. Holthuysen, Peter M. van der Kraan, Nico van Rooijen, and Wim B. van den Berg. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis : Involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1):147–157, 2007. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.22337. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.22337>.
- [75] Michael A. Pratta, Peggy A. Scherle, Gengjie Yang, Rui-Qin Liu, and Robert C. Newton. Induction of aggrecanase 1 (adam-ts4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis and Rheumatism*, 48(1):119–133, 2003. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.10726. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.10726>.
- [76] Lynne C. Tetlow, Daman J. Adlam, and David E. Woolley. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes. *Arthritis and Rheumatism*, 44 (3):585–594, 2001. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200103\)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C).
- [77] Rose K. Davidson, Jasmine G. Waters, Lara Kevorkian, Clare Darrah, Adele Cooper, Simon T. Donell, and Ian M. Clark. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 8(4):R124, Jul 2006. ISSN 1478-6354. doi: 10.1186/ar2013. URL <https://doi.org/10.1186/ar2013>.
- [78] Marie-Pierre Helliö Le Graverand-Gastineau. Disease modifying osteoarthritis drugs: Facing development challenges and choosing molecular targets. *Current Drug Targets*, 11(5):528–535, 2010.
- [79] R. Benelli, G. Lorusso, A. Albinì, and D. M. Noonan. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, 12 (24):3101–3115, 2006.
- [80] Julie C Baker-LePain, Mary C Nakamura, and Nancy E Lane. Effects of inflammation on bone: an update. *Current Opinion in Rheumatology*, 23(4), 2011. URL http://journals.lww.com/co-rheumatology/Fulltext/2011/07000/Effects_of_inflammation_on_bone__an_update.13.aspx.
- [81] Israel F. Charo and Richard M. Ransohoff. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*, 354

- (6):610–621, 2006. doi: 10.1056/NEJMra052723. URL <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra052723>. PMID: 16467548.
- [82] R. Rollin, F. Marco, J. A. Jover, J. A. García-Asenjo, L. Rodríguez, L. López-Durán, and B. Fernández-Gutiérrez. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatology International*, 28(8): 757–764, Jun 2008. ISSN 1437-160X. doi: 10.1007/s00296-008-0518-7. URL <https://doi.org/10.1007/s00296-008-0518-7>.
- [83] Peter Ghosh and Phillip A. Cheras. Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 15(5):693–709, 2017/08/14 2001. doi: 10.1053/berh.2001.0188. URL <http://dx.doi.org/10.1053/berh.2001.0188>.
- [84] David Hamerman and Michael Klagsbrun. Osteoarthritis. emerging evidence for cell interactions in the breakdown and remodeling of cartilage. *The American Journal of Medicine*, 78(3):495–499, 2017/08/14 1985. doi: 10.1016/0002-9343(85)90344-4. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90344-4](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(85)90344-4).
- [85] S Oehler, D Neureiter, C Meyer-Scholten, and T Aigner. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol*, 20(5):633–640, Sep-Oct 2002. ISSN 0392-856X (Print); 0392-856X (Linking).
- [86] P A Revell, V Mayston, P Lalor, and P Mapp. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 47(4):300–307, 1988. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.47.4.300. URL <http://ard.bmj.com/content/47/4/300>.
- [87] P. C. Shen, C. L. Wu, I. M. Jou, C. H. Lee, H. Y. Juan, P. J. Lee, S. H. Chen, and J. L. Hsieh. T helper cells promote disease progression of osteoarthritis by inducing macrophage inflammatory protein-1 β . *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(6): 728–736, 2017/08/10 2011. doi: 10.1016/j.joca.2011.02.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.02.014>.
- [88] G Dean, J A Hoyland, J Denton, R P Donn, and A J Freemont. Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 32(8):671–675, Aug 1993. ISSN 0263-7103 (Print); 0263-7103 (Linking).
- [89] Peter A. Nigrovic and David M. Lee. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunological Reviews*, 217(1):19–37, 2007. ISSN 1600-065X. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00506.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00506.x>.
- [90] D. A. Walsh, C. S. Bonnet, E. L. Turner, D. Wilson, M. Situ, and D. F. McWilliams. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(7):743–751, 2017/08/14 2007. doi: 10.1016/j.joca.2007.01.020. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2007.01.020>.

- [91] L. Haywood, D. F. McWilliams, C. I. Pearson, S. E. Gill, A. Ganesan, D. Wilson, and D. A. Walsh. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(8):2173–2177, 2003. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.11094. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.11094>.
- [92] Alexandra Giatromanolaki, Efthimios Sivridis, Efstratios Maltezos, Nick Athanassou, Dimitrios Papazoglou, Kevin C. Gatter, Adrian L. Harris, and Michael I. Koukourakis. Upregulated hypoxia inducible factor-1 α and -2 α pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 5(4):R193, Apr 2003. ISSN 1478-6354. doi: 10.1186/ar756. URL <https://doi.org/10.1186/ar756>.
- [93] M. Murata, K. Yudoh, and K. Masuko. The potential role of vascular endothelial growth factor (vegf) in cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(3):279–286, 2008. doi: 10.1016/j.joca.2007.09.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2007.09.003>.
- [94] H Xu, J Edwards, S Banerji, R Prevo, D G Jackson, and N A Athanasou. Distribution of lymphatic vessels in normal and arthritic human synovial tissues. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(12):1227–1229, 2003. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.2003.005876. URL <http://ard.bmj.com/content/62/12/1227>.
- [95] Francis Berenbaum and Jérémie Sellam. Obesity and osteoarthritis: what are the links? *Joint Bone Spine*, 75(6):667 – 668, 2008. ISSN 1297-319X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.07.006>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X08002285>.
- [96] Eric Toussiot, Gerald Streit, and Daniel Wendling. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(10):1095–1100, 2007.
- [97] Mary B. Goldring. Are bone morphogenetic proteins effective inducers of cartilage repair? ex vivo transduction of muscle-derived stem cells. *Arthritis & Rheumatism*, 54(2):387–389, 2006. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.21756. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.21756>.
- [98] T. Aigner, M. Hemmel, D. Neureiter, P. M. Gebhard, G. Zeiler, T. Kirchner, and L. McKenna. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 44(6):1304–1312, 2001. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(200106)44:6<1304::AID-ART222>3.0.CO;2-T. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1304::AID-ART222>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1304::AID-ART222>3.0.CO;2-T).
- [99] Claudia Seifarth, Constanze Csaki, and Mehdi Shakibaei. Anabolic actions of igf-i and tgf-beta1 on interleukin-1beta-treated human articular chondrocytes: evaluation in two and three dimensional cultures. *Histology and histopathology*, 24(10):1245—1262, October 2009. ISSN 0213-3911. doi: 10.14670/hh-24.1245. URL <https://doi.org/10.14670/HH-24.1245>.

- [100] Thomas Aigner, Klaus Glückert, and Klaus von der Mark. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis and Cartilage*, 5(3):183 – 189, 1997. ISSN 1063-4584. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1063-4584\(97\)80013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1063-4584(97)80013-1). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458497800131>.
- [101] KLAUS VON DER MARK, VERENA GAUSS, HELGA VON DER MARK, and PETER MULLER. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267(5611):531–532, 06 1977. URL <http://dx.doi.org/10.1038/267531a0>.
- [102] T Aigner, W Bertling, H Stöss, G Weseloh, and K von der Mark. Independent expression of fibril-forming collagens i, ii, and iii in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3):829–837, 03 1993. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC288034/>.
- [103] D M Salter. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br J Rheumatol*, 32(9):780–786, Sep 1993. ISSN 0263-7103 (Print); 0263-7103 (Linking).
- [104] Alastair G. Rothwell and George Bentley. Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *Bone & Joint Journal*, 55-B(3):588–594, 1973. ISSN 0301-620X. URL <http://bjj.boneandjoint.org.uk/content/55-B/3/588>.
- [105] Walter E. Horton, Rieko Yagi, David Laverty, and Scott Weiner. Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 23(1):103–112, 1 2005. ISSN 0392-856X.
- [106] Ling Yang, Sara G. Carlson, Denise McBurney, and Walter E. Horton. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35):31156–31165, 2005. doi: 10.1074/jbc.M501069200. URL <http://www.jbc.org/content/280/35/31156.abstract>.
- [107] Nicola Volpi, Juergen Schiller, Robert Stern, and Ladislav Soltes. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*, 16(14):1718–1745, 2009.
- [108] Valéry Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, and Abderrahim Lomri. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4):324 – 329, 2007. ISSN 1297-319X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.02.002>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X07001595>.
- [109] Y. Henrotin, B. Kurz, and T. Aigner. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(8):643–654, 2017/08/21 2005. doi: 10.1016/j.joca.2005.04.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.002>.
- [110] A. Ostalowska, E. Birkner, M. Wiecha, S. Kasperczyk, A. Kasperczyk, D. Kapolka, and A. Zon-Giebel. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis*

- and Cartilage*, 14(2):139–145, 2017/08/16 2006. doi: 10.1016/j.joca.2005.08.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.08.009>.
- [111] Ilaria MAZZETTI, Brunella GRIGOLO, Lia PULSATELLI, Paolo DOLZANI, Tania SILVESTRI, Livia ROSETI, Riccardo MELICONI, and Andrea FACCHINI. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clinical Science*, 101(6):593–599, 2001. ISSN 0143-5221. doi: 10.1042/cs1010593. URL <http://www.clinsci.org/content/101/6/593>.
- [112] F J Blanco, R L Ochs, H Schwarz, and M Lotz. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American Journal of Pathology*, 146(1):75–85, 01 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1870754/>.
- [113] Sanshiro Hashimoto, Kenji Takahashi, David Amiel, Richard D. Coutts, and Martin Lotz. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 41(7):1266–1274, 1998. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(199807)41:7<1266::AID-ART18>3.0.CO;2-Y. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199807\)41:7<1266::AID-ART18>3.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199807)41:7<1266::AID-ART18>3.0.CO;2-Y).
- [114] M. Fichter, U. Körner, J. Schömburg, L. Jennings, A. A. Cole, and J. Mollenhauer. Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 24(1): 63–70, 2006. ISSN 1554-527X. doi: 10.1046/j.1365-2842.1997.00458.x. URL <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2842.1997.00458.x>.
- [115] Anke Ruettger, Susann Schueler, Juergen A. Mollenhauer, and Bernd Wiederanders. Cathepsins b, k, and l are regulated by a defined collagen type ii peptide via activation of classical protein kinase c and p38 map kinase in articular chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2):1043–1051, 2008. doi: 10.1074/jbc.M704915200. URL <http://www.jbc.org/content/283/2/1043.abstract>.
- [116] Andreas R. Klatt, Brigitte Paul-Klausch, Gabriele Klinger, Getrud Kühn, Joerg H. Renno, Marc Banerjee, Gebhart Malchau, and Klaus Wielckens. A critical role for collagen ii in cartilage matrix degradation: Collagen ii induces pro-inflammatory cytokines and mmps in primary human chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(1):65–70, 2009. ISSN 1554-527X. doi: 10.1002/jor.20716. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jor.20716>.
- [117] M B Sadouk, J P Pelletier, G Tardif, K Kiansa, J M Cloutier, and J Martel-Pelletier. Human synovial fibroblasts coexpress il-1 receptor type i and type ii mrna. the increased level of the il-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type i receptor. *Lab Invest*, 73(3):347–355, Sep 1995. ISSN 0023-6837 (Print); 0023-6837 (Linking).
- [118] ACR. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis & Rheumatism*, 43(9):1905–1915, 2000. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(200009)43:9<1905::AID-ANR1>3.0.CO;2-P. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200009\)43:9<1905::AID-ANR1>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200009)43:9<1905::AID-ANR1>3.0.CO;2-P).

- [119] Linda Fernandes, Kåre B Hagen, Johannes W J Bijlsma, Oyvor Andreassen, Pia Christensen, Philip G Conaghan, Michael Doherty, Rinie Geenen, Alison Hammond, Ingvild Kjekken, L Stefan Lohmander, Hans Lund, Christian D Mallen, Tiziana Nava, Susan Oliver, Karel Pavelka, Irene Pitsillidou, José Antonio da Silva, Jenny de la Torre, Gustavo Zanolli, and Theodora P M Vliet Vlieland. Eular recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(7):1125–1135, 2013. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202745. URL <http://ard.bmj.com/content/72/7/1125>.
- [120] W Zhang, M Doherty, B F Leeb, L Alekseeva, N K Arden, J W Bijlsma, F Dinçer, K Dziedzic, H J Häuselmann, G Herrero-Beaumont, P Kaklamanis, S Lohmander, E Maheu, E Martín-Mola, K Pavelka, L Punzi, S Reiter, J Sautner, J Smolen, G Verbruggen, and I Zimmermann-Górska. Eular evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: Report of a task force of the eular standing committee for international clinical studies including therapeutics (escisit). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(3):377–388, 2007. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/ard.2006.062091. URL <http://ard.bmj.com/content/66/3/377>.
- [121] W. Zhang, R. W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R. D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K. D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D. J. Hunter, K. Kwok, L. S. Lohmander, and P. Tugwell. Oarsi recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part ii: Oarsi evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(2):137–162, 2017/08/19 2008. doi: 10.1016/j.joca.2007.12.013. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.013>.
- [122] Marc C. Hochberg, Donna L. Perlmutter, James I. Hudson, and Roy D. Altman. Preferences in the management of osteoarthritis of the hip and knee: Results of a survey of community-based rheumatologists in the united states. *Arthritis & Rheumatism*, 9(3):170–176, 1996. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(199606)9:3<170::AID-ANR1790090304>3.0.CO;2-K. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199606\)9:3<170::AID-ANR1790090304>3.0.CO;2-K](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199606)9:3<170::AID-ANR1790090304>3.0.CO;2-K).
- [123] W. Zhang, G. Nuki, R. W. Moskowitz, S. Abramson, R. D. Altman, N. K. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K. D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D. J. Hunter, K. Kwok, L. S. Lohmander, and P. Tugwell. Oarsi recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(4):476–499, 2017/08/19 2010. doi: 10.1016/j.joca.2010.01.013. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.013>.
- [124] T Towheed, B Shea, G Wells, and M Hochberg. Analgesia and non-aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis of the hip. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD000517, 2000. ISSN 1469-493X (Electronic); 1361-6137 (Linking). doi: 10.1002/14651858.CD000517.
- [125] L. Lizán Tudela, S. Magaz Marqués, C. Varela Moreno, and Y. Riesgo Bucher. Análisis de minimización de costes del tratamiento del dolor en la artrosis de rodilla o cadera con paracetamol o inhibidores de la cox-2 (rofecoxib). *Atención Primaria*, 34(10):534–540, 2004. ISSN 0212-6567. doi: [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(04\)70859-8](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(04)70859-8). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656704708598>.

- [126] N Bellamy, J Campbell, V Robinson, T Gee, R Bourne, and G Wells. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD005328, Apr 2006. ISSN 1469-493X (Electronic); 1361-6137 (Linking). doi: 10.1002/14651858.CD005328.pub2.
- [127] J L Hollander. Intra-articular hydrocortisone in arthritis and allied conditions; a summary of two years' clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 35-A(4):983–990, Oct 1953. ISSN 0021-9355 (Print); 0021-9355 (Linking).
- [128] I Uthman, J-P Raynauld, and B Haraoui. Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate Medical Journal*, 79(934):449–453, 2003. ISSN 0032-5473. doi: 10.1136/pmj.79.934.449. URL <http://pmj.bmj.com/content/79/934/449>.
- [129] Marc C Hochberg, Roy D Altman, Karine Toupin April, Maria Benkhalti, Gordon Guyatt, Jessie McGowan, Tanveer Towheed, Vivian Welch, George Wells, and Peter Tugwell. American college of rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 64(4):465–474, Apr 2012. ISSN 2151-4658 (Electronic); 2151-464X (Linking).
- [130] Laura L Laslett and Graeme Jones. Capsaicin for osteoarthritis pain. *Prog Drug Res*, 68:277–291, 2014. ISSN 0071-786X (Print); 0071-786X (Linking).
- [131] Jean Yves Reginster, Rita Deroisy, Lucio C Rovati, Richard L Lee, Eric Lejeune, Olivier Bruyere, Giampaolo Giacovelli, Yves Henrotin, Jane E Dacre, and Christiane Gossett. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet*, 357(9252):251–256, 2017/08/20 2001. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03610-2. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03610-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03610-2).
- [132] Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, Machacek S, Giacovelli G, and Rovati LC. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: A 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Archives of Internal Medicine*, 162(18):2113–2123, 2002. doi: 10.1001/archinte.162.18.2113. URL [+http://dx.doi.org/10.1001/archinte.162.18.2113](http://dx.doi.org/10.1001/archinte.162.18.2113).
- [133] André Kahan, Daniel Uebelhart, Florent De Vathaire, Pierre D. Delmas, and Jean-Yves Reginster. Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: The study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, 60(2):524–533, 2009. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.24255. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.24255>.
- [134] Beat A. Michel, Gerold Stucki, Diana Frey, Florent De Vathaire, Eric Vignon, Pius Bruehlmann, and Daniel Uebelhart. Chondroitins 4 and 6 sulfate in osteoarthritis of the knee: A randomized, controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, 52(3):779–786, 2005. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.20867. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.20867>.
- [135] Maxime Dougados, Minh Nguyen, Laurent Berdah, Bernard Mazières, Eric Vignon, Michel Lequesne, and for the ECHODIAH Investigators Study Group. Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: Echodiah, a three-year, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, 44(11):2539–2547, 2001. ISSN

- 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(200111)44:11<2539::AID-ART434>3.0.CO;2-T. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200111\)44:11<2539::AID-ART434>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200111)44:11<2539::AID-ART434>3.0.CO;2-T).
- [136] Petrella R, DiSilvestro M, and Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Archives of Internal Medicine*, 162(3):292–298, 2002. doi: 10.1001/archinte.162.3.292. URL [+http://dx.doi.org/10.1001/archinte.162.3.292](http://dx.doi.org/10.1001/archinte.162.3.292).
- [137] G S Kelly. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease. *Altern Med Rev*, 3(1):27–39, Feb 1998. ISSN 1089-5159 (Print); 1089-5159 (Linking).
- [138] Emmanuel Maheu, Christian Cadet, Marc Marty, Dominique Moyses, Isabelle Kerloch, Philippe Coste, Maxime Dougados, Bernard Mazières, Tim D Spector, Hafid Halhol, Jean-Marie Grouin, and Michel Lequesne. Randomised, controlled trial of avocado–soybean unsaponifiable (piasclidine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the eradias study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(2): 376–384, 2014. ISSN 0003-4967. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202485. URL <http://ard.bmj.com/content/73/2/376>.
- [139] Y E Henrotin, A H Labasse, J M Jaspar, D D De Groote, S X Zheng, G B Guillou, and J Y Reginster. Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin e2 production by human articular chondrocytes. *Clin Rheumatol*, 17(1):31–39, 1998. ISSN 0770-3198 (Print); 0770-3198 (Linking).
- [140] Hua Jin, Qian Liang, Tongsheng Chen, and Xiaoping Wang. Resveratrol protects chondrocytes from apoptosis via altering the ultrastructural and biomechanical properties: An afm study. *PLOS ONE*, 9(3):1–9, 03 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091611. URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091611>.
- [141] Travis E. Clegg, David Caborn, and Cyril Mauffrey. Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: a review of current evidence and future directions. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 23(2):119–124, Feb 2013. ISSN 1432-1068. doi: 10.1007/s00590-012-0940-0. URL <https://doi.org/10.1007/s00590-012-0940-0>.
- [142] Y. Henrotin, X. Chevalier, M. Deberg, J.C. Balblanc, P. Richette, D. Mulleman, B. Mailet, F. Rannou, C. Piroth, P. Mathieu, T. Conrozier, and On behalf of the Osteoarthritis Group of the French Society of Rheumatology. Early decrease of serum biomarkers of type ii collagen degradation (coll2-1) and joint inflammation (coll2-1 no2) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis: A research study part of the biovisco study. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(6): 901–907, 2013. ISSN 1554-527X. doi: 10.1002/jor.22297. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22297>.
- [143] Giuseppe Filardo, Elizaveta Kon, Alessandro Di Martino, Berardo Di Matteo, Maria Letizia Merli, Annarita Cenacchi, Pier Maria Fornasari, and Maurilio Marcacci. Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study

- design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 13(1):229, Nov 2012. ISSN 1471-2474. doi: 10.1186/1471-2474-13-229. URL <https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-229>.
- [144] Claudio Iván Serra, Carme Soler, Jose M. Carillo, Joaquín J. Sopena, J. Ignacio Redondo, and Ramón Cugat. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21(8):1730–1736, Aug 2013. ISSN 1433-7347. doi: 10.1007/s00167-012-2141-0. URL <https://doi.org/10.1007/s00167-012-2141-0>.
- [145] E.M. Bartels, H. Bliddal, P.K. Schøndorff, R.D. Altman, W. Zhang, and R. Christensen. Symptomatic efficacy and safety of diacerein in the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(3): 289 – 296, 2010. ISSN 1063-4584. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2009.10.006>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458409002787>.
- [146] M Boittin, F Redini, G Loyau, and J P Pujol. Effect of diacerhein (art 50) on the matrix synthesis and collagenase secretion by cultured joint chondrocytes in rabbits. *Rev Rhum Ed Fr*, 60(6 Pt 2):68S–76S, Jul 1993. ISSN 1169-8330 (Print); 1169-8330 (Linking).
- [147] Jean-Pierre Pujol, Christos Chadjichristos, Florence Legendre, Catherine Baugé, Gallic Beauchef, Rina Andriamanalijaona, Philippe Galéra, and Karim Boumediene. Interleukin-1 and transforming growth factor- β 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connective Tissue Research*, 49(3-4):293–297, 2008. doi: 10.1080/03008200802148355. URL <http://dx.doi.org/10.1080/03008200802148355>. PMID: 18661363.
- [148] P. Nicolas, M. Tod, C. Padoin, and O. Petitjean. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clinical Pharmacokinetics*, 35(5):347–359, Nov 1998. ISSN 1179-1926. doi: 10.2165/00003088-199835050-00002. URL <https://doi.org/10.2165/00003088-199835050-00002>.
- [149] Ya-Yin Chen, Su-Yin Chiang, Jaung-Geng Lin, Yi-Shih Ma, Ching-Lung Liao, Shu-Wen Weng, Tung-Yuan Lai, and Jing-Gung Chung. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer scc-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol*, 36(5):1113–1120, May 2010. ISSN 1791-2423 (Electronic); 1019-6439 (Linking).
- [150] Mei-zi Guo, Xiao-sheng Li, Ding-ming Shen, Xiao-qin Guan, Hai-rong Xu, and Jian Gao. Effect of rhein on the development of hepatic fibrosis in rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 11(1):26–29, Jan 2003. ISSN 1007-3418 (Print); 1007-3418 (Linking).
- [151] Xiaoyan Sheng, Min Wang, Meng Lu, Beili Xi, Hongguang Sheng, and Ying Qin Zang. Rhein ameliorates fatty liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation, and immunomodulation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 300(5):E886–E893, 2011. ISSN 0193-1849. doi: 10.1152/ajpendo.00332.2010. URL <http://ajpendo.physiology.org/content/300/5/E886>.

- [152] Jing-cheng Tang, Hua Yang, Xue-ying Song, Xiao-hong Song, Shu-lian Yan, Jian-qun Shao, Tian-lan Zhang, and Jin-nan Zhang. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by rhein in rat liver microsomes. *Phytotherapy Research*, 23(2):159–164, 2009. ISSN 1099-1573. doi: 10.1002/ptr.2572. URL <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2572>.
- [153] Dongyuan He, Li Lee, Junwei Yang, and Xiaoyun Wang. Preventive effects and mechanisms of rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(8):1219–1226, 2011. doi: 10.1248/bpb.34.1219.
- [154] Sheng-Nan Peng, Hui-Hong Zeng, Ai-Xiang Fu, Xiao-Wen Chen, and Qing-Xian Zhu. Effects of rhein on intestinal epithelial tight junction in iga nephropathy. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(26):4137–4145, 07 2013. doi: 10.3748/wjg.v19.i26.4137. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710415/>.
- [155] J. Su, L. P. Yin, X. Zhang, B. B. Li, L. Liu, and H. Li. Chronic allograft nephropathy in rats is improved by the intervention of rhein. *Transplantation Proceedings*, 45(6):2546–2552, 2017/08/20 2013. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.03.030. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.03.030>.
- [156] F Legendre, P Bogdanowicz, G Martin, F Domagala, S Leclercq, J-P Pujol, and H Ficheux. Rhein, a diacerhein-derived metabolite, modulates the expression of matrix degrading enzymes and the cell proliferation of articular chondrocytes by inhibiting erk and jnk-ap-1 dependent pathways. *Clin Exp Rheumatol*, 25(4):546–555, Jul-Aug 2007. ISSN 0392-856X (Print); 0392-856X (Linking).
- [157] F. Legendre, A. Heuze, K. Boukerrouche, S. Leclercq, K. Boumediene, P. Galera, F. Domagala, J. P. Pujol, and H. Ficheux. Rhein, the metabolite of diacerhein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 38(2):104–111, 2009. doi: 10.1080/03009740802421996. URL <http://dx.doi.org/10.1080/03009740802421996>.
- [158] Grégoire Martin, Patrick Bogdanowicz, Florence Domagala, Hervé Ficheux, and Jean-Pierre Pujol. Rhein inhibits interleukin-1 β -induced activation of mek/erk pathway and dna binding of nf- κ b and ap-1 in chondrocytes cultured in hypoxia: A potential mechanism for its disease-modifying effect in osteoarthritis. *Inflammation*, 27(4):233–246, Aug 2003. ISSN 1573-2576. doi: 10.1023/A:1025040631514. URL <https://doi.org/10.1023/A:1025040631514>.
- [159] Alexandrina Ferreira Mendes, Maria Margarida Caramona, Arselio Pato de Carvalho, and Maria Celeste Lopes. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappab activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappab-alpha. *Pharmacol Toxicol*, 91(1):22–28, Jul 2002. ISSN 0901-9928 (Print); 0901-9928 (Linking).
- [160] F. Moldovan, J. Pelletier, F.-C. Jolicoeur, J.-M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier. Diacerhein and rhein reduce the ice-induced il-1beta and il-18 activation in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(3):186–196, 2000. ISSN 1063-4584. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/joca.1999.0289>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458499902893>.

- [161] J P Pelletier, D Lajeunesse, P Reboul, F Mineau, J C Fernandes, P Sabouret, and J Martel-Pelletier. Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone. *The Journal of Rheumatology*, 28(4):814–824, 2001. ISSN 0315-162X. URL <http://www.jrheum.org/content/28/4/814>.
- [162] Christelle Sanchez, Marianne Mathy-Hartert, Michelle A Deberg, Herve Ficheux, Jean-Yves L Reginster, and Yves E Henrotin. Effects of rhein on human articular chondrocytes in alginate beads. *Biochemical Pharmacology*, 65(3):377 – 388, 2003. ISSN 0006-2952. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01485-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01485-5). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295202014855>.
- [163] Xiao-Dong Cong, Ming-Jian Ding, De-Zai Dai, You Wu, Yun Zhang, and Yin Dai. Er stress, p66shc, and p-akt/akt mediate adjuvant-induced inflammation, which is blunted by argirein, a supermolecule and rhein in rats. *Inflammation*, 35(3):1031–1040, Jun 2012. ISSN 1573-2576. doi: 10.1007/s10753-011-9407-4. URL <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9407-4>.
- [164] Gang Hu, Jiang Liu, Yong-Zhan Zhen, Jie Wei, Yue Qiao, Ya-Jun Lin, and Ping Tu. Rhein inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule 1 in human umbilical vein endothelial cells with or without lipopolysaccharide stimulation. *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(03):473–485, 2013. doi: 10.1142/S0192415X13500341. URL <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X13500341>. PMID: 23711136.
- [165] M.A Glinn, C.P Lee, and L Ernster. Pro- and anti-oxidant activities of the mitochondrial respiratory chain: factors influencing nad(p)h-induced lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1318(1):246 – 254, 1997. ISSN 0005-2728. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00142-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00142-9). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272896001429>.
- [166] T. Tamura, T. Yokoyama, and K. Ohmori. Effects of diacerein on indomethacin-induced gastric ulceration. *Pharmacology*, 63(4):228–233, 2001. URL <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000056138>.
- [167] Gabriella Aviello, Ian Rowland, Christopher I. Gill, Angela Maria Acquaviva, Francesco Capasso, Mark McCann, Raffaele Capasso, Angelo A. Izzo, and Francesca Borrelli. Anti-proliferative effect of rhein, an anthraquinone isolated from cassia species, on caco-2 human adenocarcinoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(7):2006–2014, 2010. ISSN 1582-4934. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00815.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00815.x>.
- [168] Vivian E. Fernand, Jack N. Losso, Robert E. Truax, Emily E. Villar, David K. Bwambok, Sayo O. Fakayode, Mark Lowry, and Isiah M. Warner. Rhein inhibits angiogenesis and the viability of hormone-dependent and -independent cancer cells under normoxic or hypoxic conditions in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 192(3): 220 – 232, 2011. ISSN 0009-2797. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.03.013>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279711001190>.
- [169] Meng-Liang Lin, Jing-Gung Chung, Yao-Cheng Lu, Chiou-Ying Yang, and Shih-Shun Chen. Rhein inhibits invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cells

- in vitro by down-regulation of matrix metalloproteinases-9 and vascular endothelial growth factor. *Oral Oncology*, 45(6):531–537, 2017/08/20 2009. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.07.012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.07.012>.
- [170] S Castiglione, M Fanciulli, T Bruno, M Evangelista, C Del Carlo, M G Paggi, A Chersi, and A Floridi. Rhein inhibits glucose uptake in ehrlich ascites tumor cells by alteration of membrane-associated functions. *Anticancer Drugs*, 4(3):407–414, Jun 1993. ISSN 0959-4973 (Print); 0959-4973 (Linking).
- [171] Jing Liu, Zhaohong Chen, Yujing Zhang, Mingchao Zhang, Xiaodong Zhu, Yun Fan, Shaolin Shi, Ke Zen, and Zhihong Liu. Rhein protects pancreatic beta-cells from dynamin-related protein-1-mediated mitochondrial fission and cell apoptosis under hyperglycemia. *Diabetes*, 62(11):3927–3935, 11 2013. doi: 10.2337/db13-0251. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3806614/>.
- [172] Carina Malaguti, Conceição Aparecida Vilella, Karla Priscila Vieira, Gustavo H.M.F. Souza, Stephen Hyslop, and Ricardo de Lima Zollner. Diacerhein downregulate proinflammatory cytokines expression and decrease the autoimmune diabetes frequency in nonobese diabetic (nod) mice. *International Immunopharmacology*, 8(6):782 – 791, 2008. ISSN 1567-5769. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.020>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576908000386>.
- [173] Jing G. Chung, Mei F. Tsou, Hwang H. Wang, Hsueh H. Lo, Sue E. Hsieh, Yee S. Yen, Lii T. Wu, Shih H. Chang, Chin C. Ho, and Chi F. Hung. Rhein affects arylamine n-acetyltransferase activity in helicobacter pylori from peptic ulcer patients. *Journal of Applied Toxicology*, 18(2):117–123, 1998. ISSN 1099-1263. doi: 10.1002/(SICI)1099-1263(199803/04)18:2<117::AID-JAT486>3.0.CO;2-D. URL [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199803/04\)18:2<117::AID-JAT486>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199803/04)18:2<117::AID-JAT486>3.0.CO;2-D).
- [174] Lu Yu, Hua Xiang, Junwen Fan, Dacheng Wang, Feng Yang, Na Guo, Qi Jin, and Xuming Deng. Global transcriptional response of staphylococcus aureus to rhein, a natural plant product. *Journal of Biotechnology*, 135(3):304 – 308, 2008. ISSN 0168-1656. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.04.010>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165608001879>.
- [175] George Hilal, Johanne Martel-Pelletier, Jean-Pierre Pelletier, Pierre Ranger, and Daniel Lajeunesse. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*, 41(5):891–899, 1998. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(199805)41:5<891::AID-ART17>3.0.CO;2-X. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199805\)41:5<891::AID-ART17>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199805)41:5<891::AID-ART17>3.0.CO;2-X).
- [176] Nathalie Saha, Florina Moldovan, Ginette Tardif, Jean-Pierre Pelletier, Jean-Marie Cloutier, and Johanne Martel-Pelletier. Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: Localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis & Rheumatism*, 42(8):1577–1587, 1999. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/1529-0131(199908)42:8<1577::AID-ANR3>3.0.CO;2-Z. URL [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199908\)42:8<1577::AID-ANR3>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199908)42:8<1577::AID-ANR3>3.0.CO;2-Z).

- [177] R McCollum, J Martel-Pelletier, J DiBattista, and J P Pelletier. Regulation of interleukin 1 receptors in human articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl*, 27:85–88, Feb 1991. ISSN 0380-0903 (Print); 0380-0903 (Linking).
- [178] Johanne Martel-Pelletier, Robert Mccollum, John Dibattista, Marie-Pierre Faure, Jayne A. Chin, Sylvie Fournier, Marika Sarfati, and Jean-Pierre Pelletier. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. identification as the type i receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis & Rheumatism*, 35(5):530–540, 1992. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.1780350507. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780350507>.
- [179] M. A. Álvarez-Soria, G. Herrero-Beaumont, O. Sánchez-Pernaute, M. Bellido, and R. Largo. Diacerein has a weak effect on the catabolic pathway of human osteoarthritis synovial fibroblast—comparison to its effects on osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology*, 47(5):627–633, 2008. doi: 10.1093/rheumatology/ken116. URL [+http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ken116](http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ken116).
- [180] Tadafumi Tamura and Kenji Ohmori. Rhein, an active metabolite of diacerein, suppresses the interleukin-1 α -induced proteoglycan degradation in cultured rabbit articular chondrocytes. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85(1):101–104, 2001. doi: 10.1254/jjp.85.101.
- [181] F Domagala, G Martin, P Bogdanowicz, H Ficheux, and J-P Pujol. Inhibition of interleukin-1 β -induced activation of mek/erk pathway and dna binding of nf-kappab and ap-1: potential mechanism for diacerein effects in osteoarthritis. *Biorheology*, 43(3-4):577–587, 2006. ISSN 0006-355X (Print); 0006-355X (Linking).
- [182] J P Pujol, N Felisaz, K Boumediene, C Ghayor, J F Herrouin, P Bogdanowicz, and P Galera. Effects of diacerein on biosynthesis activities of chondrocytes in culture. *Biorheology*, 37(1-2):177–184, 2000. ISSN 0006-355X (Print); 0006-355X (Linking).
- [183] Michael Yaron, Idit Shirazi, and Ilana Yaron. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(3):272–280, 2017/08/22 1999. doi: 10.1053/joca.1998.0201. URL <http://dx.doi.org/10.1053/joca.1998.0201>.
- [184] N Felisaz, K Boumediene, C Ghayor, J F Herrouin, P Bogdanowicz, P Galerra, and J P Pujol. Stimulating effect of diacerein on tgf-beta1 and beta2 expression in articular chondrocytes cultured with and without interleukin-1. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(3):255–264, May 1999. ISSN 1063-4584 (Print); 1063-4584 (Linking). doi: 10.1053/joca.1998.0199.
- [185] F. Redini, P. Galera, A. Mauviel, G. Loyau, and J.-P. Pujol. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Letters*, 234(1):172–175, 1988. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/0014-5793(88)81327-9. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81327-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(88)81327-9).
- [186] Nicole Gerwin, Caroline Hops, and Andrea Lucke. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(2):226 – 242, 2006.

- ISSN 0169-409X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.018>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000160>. Drug Delivery in Degenerative Joint Disease.
- [187] Christopher H. Evans, Virginia B. Kraus, and Lori A. Setton. Progress in intra-articular therapy. *Nat Rev Rheumatol*, 10(1):11–22, 01 2014. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2013.159>.
- [188] Claus Larsen, Jesper Østergaard, Susan W. Larsen, Henrik Jensen, Stine Jacobsen, Casper Lindegaard, and Pia H. Andersen. Intra-articular depot formulation principles: Role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(11):4622–4654, 2017/08/26 2008. doi: 10.1002/jps.21346. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21346>.
- [189] Richard O. Day, Andrew J. McLachlan, Garry G. Graham, and Kenneth M. Williams. Pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(3):191–210, Mar 1999. ISSN 1179-1926. doi: 10.2165/00003088-199936030-00002. URL <https://doi.org/10.2165/00003088-199936030-00002>.
- [190] SG Owen, HW Francis, and MS Roberts. Disappearance kinetics of solutes from synovial fluid after intra-articular injection. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 38(4):349–355, 1994. ISSN 1365-2125. doi: 10.1111/j.1365-2125.1994.tb04365.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.1994.tb04365.x>.
- [191] H. Ralph Schumacher. Aspiration and injection therapies for joints. *Arthritis Care & Research*, 49(3):413–420, 2003. ISSN 1529-0131. doi: 10.1002/art.11056. URL <http://dx.doi.org/10.1002/art.11056>.
- [192] A Jones, M Regan, J Ledingham, M Patrick, A Manhire, and M Doherty. Importance of placement of intra-articular steroid injections. *BMJ*, 307(6915):1329–1330, Nov 1993. ISSN 0959-8138 (Print); 0959-535X (Linking).
- [193] Helen M Burt, Antonia Tsallas, Samuel Gilchrist, and Linda S Liang. Intra-articular drug delivery systems: overcoming the shortcomings of joint disease therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1):17–26, 2009. doi: 10.1517/17425240802647259. URL <http://dx.doi.org/10.1517/17425240802647259>. PMID: 19236205.
- [194] Peter Bias, Regine Labrenz, and Peter Rose. Sustained-release dexamethasone palmitate. *Clinical Drug Investigation*, 21(6):429–436, Jun 2001. ISSN 1179-1918. doi: 10.2165/00044011-200121060-00006. URL <https://doi.org/10.2165/00044011-200121060-00006>.
- [195] Nicoleta Butoescu, Christian A. Seemayer, Michelangelo Foti, Olivier Jordan, and Eric Doelker. Dexamethasone-containing plga superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. *Biomaterials*, 30(9):1772 – 1780, 2009. ISSN 0142-9612. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.017>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208009885>.

- [196] P. E. Greis, H. I. Georgescu, F. H. Fu, and C. H. Evans. Particle-induced synthesis of collagenase by synovial fibroblasts: An immunocytochemical study. *Journal of Orthopaedic Research*, 12(2):286–293, 1994. ISSN 1554-527X. doi: 10.1002/jor.1100120219. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jor.1100120219>.
- [197] R. T. Liggins, T. Cruz, W. Min, L. Liang, W. L. Hunter, and H. M. Burt. Intra-articular treatment of arthritis with microsphere formulations of paclitaxel: biocompatibility and efficacy determinations in rabbits. *Inflammation Research*, 53(8):363–372, Aug 2004. ISSN 1420-908X. doi: 10.1007/s00011-004-1273-1. URL <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1273-1>.
- [198] Dominique A. Rothenfluh, Harry Bermudez, Conlin P. O’Neil, and Jeffrey A. Hubbell. Biofunctional polymer nanoparticles for intra-articular targeting and retention in cartilage. *Nat Mater*, 7(3):248–254, 03 2008. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2116>.
- [199] Katja Schulze, Annette Koch, Alke Petri-Fink, Benedikt Steitz, Sarah Kamau, Michael Hottiger, Monika Hilbe, Lloyd Vaughan, Margarethe Hofmann, Heinrich Hofmann, and Brigitte von Rechenberg. Uptake and biocompatibility of functionalized poly(vinylalcohol) coated superparamagnetic maghemite nanoparticles by synovial cells in vitro. *J Nanosci Nanotechnol*, 6(9-10):2829–2840, Sep-Oct 2006. ISSN 1533-4880 (Print); 1533-4880 (Linking).
- [200] PM Mountziaris, DC Sing, AG Mikos, and PR Kramer. Intra-articular microparticles for drug delivery to the tmj. *Journal of Dental Research*, 89(10):1039–1044, 10 2010. doi: 10.1177/0022034510375286. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3014105/>.
- [201] J. H. Ratcliffe, I. M. Hunneyball, A. Smith, C. G. Wilson, and S. S. Davis. Preparation and evaluation of biodegradable polymeric systems for the intra-articular delivery of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(7):431–436, 1984. ISSN 2042-7158. doi: 10.1111/j.2042-7158.1984.tb04419.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1984.tb04419.x>.
- [202] APR Johnston, GK Such, SL Ng, and F Caruso. Challenges facing colloidal delivery systems: From synthesis to the clinic. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(CURRENT OPINION IN COLLOID & INTERFACE SCIENCE):171 – 181 (11), 2017/01/12 2011. doi: 10.1016/j.cocis.2010.11.003. URL <http://hdl.handle.net/11343/123319>.
- [203] Jörg Kreuter. Drug targeting with nanoparticles. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19(3):253–256, Sep 1994. ISSN 2107-0180. doi: 10.1007/BF03188928. URL <https://doi.org/10.1007/BF03188928>.
- [204] T. Kubik, K. Bogunia-Kubik, and M. Sugisaka. Nanotechnology on duty in medical applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(1):17–33, 2005.
- [205] Jaspreet K. Vasir, Maram K. Reddy, and Vinod D. Labhasetwar. Nanosystems in drug targeting: Opportunities and challenges. *Current Nanoscience*, 1(1):47–64, 2005.
- [206] Federica Chiellini. Perspectives on:in vitro evaluation of biomedical polymers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21(3):257–271, 2006. doi: 10.1177/0883911506064672. URL <http://dx.doi.org/10.1177/0883911506064672>.

- [207] Avnesh Kumari, Sudesh Kumar Yadav, and Subhash C. Yadav. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1):1 – 18, 2010. ISSN 0927-7765. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004111>.
- [208] J. Park, M. Ye, and K. Park. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, 10(1):146–161, 2005. ISSN 1420-3049. doi: 10.3390/10010146. URL <http://www.mdpi.com/1420-3049/10/1/146>.
- [209] Ann-Christine Albertsson and Indra K. Varma. *Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications*, pages 1–40. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002. ISBN 978-3-540-45734-3. doi: 10.1007/3-540-45734-8_1. URL https://doi.org/10.1007/3-540-45734-8_1.
- [210] Rajeev A Jain. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (plga) devices. *Biomaterials*, 21(23):2475 – 2490, 2000. ISSN 0142-9612. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200001150>. Orthopaedic Polymeric Biomaterials: Basic Aspects of Biodegradables.
- [211] Fabienne Danhier, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and Véronique Préat. Plga-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2):505 – 522, 2012. ISSN 0168-3659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912000752>. Drug Delivery Research in Europe.
- [212] Kathryn E. Uhrich, Scott M. Cannizzaro, Robert S. Langer, and Kevin M. Shakesheff. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, 99(11):3181–3198, 1999. doi: 10.1021/cr940351u. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cr940351u>. PMID: 11749514.
- [213] X S Wu and N Wang. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. part ii: biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed*, 12(1):21–34, 2001. ISSN 0920-5063 (Print); 0920-5063 (Linking).
- [214] Jamie Tsung and Diane J. Burgess. *Biodegradable Polymers in Drug Delivery Systems*, pages 107–123. Springer US, Boston, MA, 2012. ISBN 978-1-4614-0881-9. doi: 10.1007/978-1-4614-0881-9_5. URL https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_5.
- [215] Steven J. Siegel, Jonathan B. Kahn, Kayla Metzger, Karen I. Winey, Kathryn Werner, and Nily Dan. Effect of drug type on the degradation rate of plga matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(3):287 – 293, 2006. ISSN 0939-6411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.009>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641106001597>.
- [216] Patrick Couvreur, Gillian Barratt, Elias Fattal, Philippe Legrand, and Christine Vauthier. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 19(2): 99–134, 2002. ISSN 0743-4863 (Print); 0743-4863 (Linking).

- [217] Z Panagi, A Beletsi, Gregory Evangelatos, E Livaniou, D.S Ithakissios, and K Avgoustakis. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of plga and plga–mpeg nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1):143 – 152, 2001. ISSN 0378-5173. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00676-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00676-7). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517301006767>.
- [218] D V Bazile, C Ropert, P Huve, T Verrecchia, M Marlard, A Frydman, M Veillard, and G Spenlehauer. Body distribution of fully biodegradable [14c]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*, 13(15):1093–1102, 1992. ISSN 0142-9612 (Print); 0142-9612 (Linking).
- [219] Laura C. Amann, Michael J. Gandal, Robert Lin, Yuling Liang, and Steven J. Siegel. In vitro–in vivo correlations of scalable plga-risperidone implants for the treatment of schizophrenia. *Pharmaceutical Research*, 27(8):1730–1737, Aug 2010. ISSN 1573-904X. doi: 10.1007/s11095-010-0152-4. URL <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0152-4>.
- [220] M. Ramchandani and D. Robinson. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from plga 50:50 implants. *Journal of Controlled Release*, 54(2):167 – 175, 1998. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00113-2). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365997001132>.
- [221] N. Faisant, J. Siepmann, and J.P. Benoit. Plga-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(4):355 – 366, 2002. ISSN 0928-0987. doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00023-4). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098702000234>.
- [222] Nicolas Anton, Jean-Pierre Benoit, and Patrick Saulnier. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of Controlled Release*, 128(3):185 – 199, 2008. ISSN 0168-3659. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365908001016>.
- [223] Si-Shen Feng. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Review of Medical Devices*, 1(1):115–125, 2004. doi: 10.1586/17434440.1.1.115. URL <http://dx.doi.org/10.1586/17434440.1.1.115>.
- [224] Thirumala Govender, Snjezana Stolnik, Martin C. Garnett, Lisbeth Illum, and Stanley S. Davis. Plga nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2):171 – 185, 1999. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00116-3). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365998001163>.
- [225] Indu Bala, Sarita Hariharan, and M N V Ravi Kumar. Plga nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 21(5):387–422, 2004. ISSN 0743-4863 (Print); 0743-4863 (Linking).
- [226] Julien Aubry, Francois Ganachaud, Jean-Pierre Cohen Addad, and Bernard Cabane. Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting:1. boundaries. *Langmuir*, 25(4):1970–1979, 2009. doi: 10.1021/la803000e. URL <http://dx.doi.org/10.1021/la803000e>. PMID: 19170510.

- [227] Miechel L.T. Zweers, Gerard H.M. Engbers, Dirk W. Grijpma, and Jan Feijen. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on dl-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *Journal of Controlled Release*, 100(3):347 – 356, 2004. ISSN 0168-3659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.008>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004420>.
- [228] H.-J. Krause, A. Schwarz, and P. Rohdewald. Interfacial polymerization, a useful method for the preparation of polymethylcyanoacrylate nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12(4):527–552, 1986. doi: 10.3109/03639048609048026. URL <http://dx.doi.org/10.3109/03639048609048026>.
- [229] David Quintanar-Guerrero and Maria de la Luz Zambrano-Zaragoza. Impact of the emulsification-diffusion method on the development of pharmaceutical nanoparticles. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, 6(3):184–194, 2012.
- [230] T Nakashima, M Shimizu, and M Kukizaki. Membrane emulsification by microporous glass. 61:513–516, 01 1992.
- [231] Tadao Nakashima, Masataka Shimizu, and Masato Kukizaki. Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1):47 – 56, 2000. ISSN 0169-409X. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00099-5). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X00000995>. Emulsions for Drug Delivery.
- [232] Alejandro Sosnik and Katia P. Seremeta. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223(Supplement C):40 – 54, 2015. ISSN 0001-8686. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868615000767>.
- [233] George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101): 368–373, 07 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature05058>.
- [234] Lung-Hsin Hung and Abraham Lee. Microfluidic devices for the synthesis of nanoparticles and biomaterials. 27:1–6, 11 2006.
- [235] Marie Gaumet, Angelica Vargas, Robert Gurny, and Florence Delie. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1):1 – 9, 2008. ISSN 0939-6411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107002895>.
- [236] M. Dunne, O.I. Corrigan, and Z. Ramtoola. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 21(16):1659 – 1668, 2000. ISSN 0142-9612. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00040-5). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200000405>.
- [237] Jayanth Panyam and Vinod Labhasetwar. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3):329 – 347, 2003. ISSN 0169-409X. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4). URL

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02002284>. Biomedical Micro- and Nano-technology.
- [238] M P Desai, V Labhasetwar, G L Amidon, and R J Levy. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res*, 13(12):1838–1845, Dec 1996. ISSN 0724-8741 (Print); 0724-8741 (Linking).
- [239] H.M. Redhead, S.S. Davis, and L. Illum. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 70(3):353 – 363, 2001. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00367-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00367-9). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003679>.
- [240] B. Devika Chithrani, Arezou A. Ghazani, and Warren C. W. Chan. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6(4):662–668, 2006. doi: 10.1021/nl052396o. URL <http://dx.doi.org/10.1021/nl052396o>. PMID: 16608261.
- [241] G. Mittal, D.K. Sahana, V. Bhardwaj, and M.N.V. Ravi Kumar. Estradiol loaded plga nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 119(1):77 – 85, 2007. ISSN 0168-3659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.016>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365907000661>.
- [242] Carlos E Astete and Cristina M Sabliov. Synthesis and characterization of plga nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed*, 17(3):247–289, 2006. ISSN 0920-5063 (Print); 0920-5063 (Linking).
- [243] Kumares S Soppimath, Tejraj M Aminabhavi, Anandrao R Kulkarni, and Walter E Rudzinski. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1):1 – 20, 2001. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003394>.
- [244] A.Omolola Eniola and Daniel A Hammer. Characterization of biodegradable drug delivery vehicles with the adhesive properties of leukocytes ii: effect of degradation on targeting activity. *Biomaterials*, 26(6):661 – 670, 2005. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.003>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204002455>.
- [245] Laura Ciani, Sandra Ristori, Claudia Bonechi, Claudio Rossi, and Giacomo Martini. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and zeta potential. *Biophysical Chemistry*, 131(1):80 – 87, 2007. ISSN 0301-4622. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.011>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462207002153>.
- [246] Chih-Chieh Chen, Tung-Hu Tsai, Zih-Rou Huang, and Jia-You Fang. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. *European Journal*

- of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(3):474 – 482, 2010. ISSN 0939-6411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.12.008>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641110000020>.
- [247] Swanand Patil, Amanda Sandberg, Eric Heckert, William Self, and Sudipta Seal. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31):4600 – 4607, 2007. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207005546>.
- [248] Merton Bernfield, Martin Götte, Pyong Woo Park, Ofer Reizes, Marilyn L. Fitzgerald, John Lincecum, , and Masahiro Zako. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1):729–777, 1999. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729. URL <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.729>. PMID: 10872465.
- [249] K A Mislick and J D Baldeschwieler. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22):12349–12354, 10 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC37994/>.
- [250] Sean M. Hartig, Rachel R. Greene, Mikhail M. Dikov, Ales Prokop, and Jeffrey M. Davidson. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharmaceutical Research*, 24(12):2353–2369, Dec 2007. ISSN 1573-904X. doi: 10.1007/s11095-007-9459-1. URL <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9459-1>.
- [251] Gaurav Sahay, Daria Y. Alakhova, and Alexander V. Kabanov. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3):182 – 195, 2010. ISSN 0168-3659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910002075>.
- [252] C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J.N. Pons, J.-C. Bacri, and F. Gazeau. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6):1001 – 1011, 2003. ISSN 0142-9612. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00440-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00440-4). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202004404>.
- [253] Rebecca L McCall and Rachael W Sirianni. Plga nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin e-tpps. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (82): 51015, 2013. doi: 10.3791/51015. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106449/>.
- [254] H. Fessi, F. Puisieux, J.Ph. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1):R1 – R4, 1989. ISSN 0378-5173. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389902810>.
- [255] Catalina Chávez. *Nueva estrategia para el tratamiento de la inflamación: Microencapsulación de rhein*. PhD thesis, Universidad de Concepción, 2014.

- [256] AEFI. *Validación de métodos analíticos*. 2001.
- [257] Xiangrong Song, Yu Zhao, Shixiang Hou, Fangyuan Xu, Rongli Zhao, Junyao He, Zheng Cai, Yuanbo Li, and Qihong Chen. Dual agents loaded plga nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2):445 – 453, 2008. ISSN 0939-6411. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.01.013>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108000210>.
- [258] Ming Li, Olivier Rouaud, and Denis Poncelet. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1):26 – 39, 2008. ISSN 0378-5173. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730800522X>.
- [259] Karen C dos Santos, Maria Fatima GF da Silva, Edenir R Pereira-Filho, Joao B Fernandes, Igor Polikarpov, and Moacir R Forim. Polymeric nanoparticles loaded with the 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (triac), a thyroid hormone: factorial design, characterization, and release kinetics. *Nanotechnology, Science and Applications*, 5: 37–48, 2012. doi: 10.2147/NSA.S32837. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781720/>.
- [260] Xiangrong Song, Yu Zhao, Wenbin Wu, Yueqi Bi, Zheng Cai, Qihong Chen, Yuanbo Li, and Shixiang Hou. Plga nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1):320 – 329, 2008. ISSN 0378-5173. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.034>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307007314>.
- [261] M.N.V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, and C.M. Lehr. Preparation and characterization of cationic plga nanospheres as dna carriers. *Biomaterials*, 25(10):1771 – 1777, 2004. ISSN 0142-9612. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.069>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203006884>.
- [262] J. H. Ratcliffe, I. M. Hunneyball, C. G. Wilson, A. Smith, and S. S. Davis. Albumin microspheres for intra-articular drug delivery: investigation of their retention in normal and arthritic knee joints of rabbits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(4): 290–295, 1987. ISSN 2042-7158. doi: 10.1111/j.2042-7158.1987.tb06268.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb06268.x>.
- [263] Eijiro Horisawa, Katsuaki Kubota, Izumi Tuboi, Keiichi Sato, Hiromitsu Yamamoto, Hirofumi Takeuchi, and Yoshiaki Kawashima. Size-dependency of dl-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm Res*, 19(2):132–139, Feb 2002. ISSN 0724-8741 (Print); 0724-8741 (Linking).
- [264] Laura Rabinovich-Guilatt, Patrick Couvreur, Gregory Lambert, Danny Goldstein, Simon Benita, and Catherine Dubernet. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 131(1):1 – 13, 2004. ISSN 0009-3084. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.003>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308404000519>.

- [265] Petra Kocbek, Nataša Obermajer, Mateja Cegnar, Janko Kos, and Julijana Kristl. Targeting cancer cells using plga nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release*, 120(1):18 – 26, 2007. ISSN 0168-3659. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.012>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365907001472>.
- [266] Ranit Kedmi, Noa Ben-Arie, and Dan Peer. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*, 31(26):6867 – 6875, 2010. ISSN 0142-9612. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.027>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210006459>.
- [267] Buddy Ratner, Allan Hoffman, Frederick Schoen, and Jack Lemons. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Academic Press, 2nd edition, 2004.
- [268] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, and J.P. Benoit. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2):201 – 209, 2009. ISSN 0378-5173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.026>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309002488>. Challenges for Nanotechnology in Delivery Imaging.
- [269] Lara S. Jabr-Milane, Lilian E. van Vlerken, Sunita Yadav, and Mansoor M. Amiji. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 34(7):592–602, 2017/10/30 2008. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.04.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.04.003>.
- [270] K. Langer, S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. von Briesen, and D. Schubert. Optimization of the preparation process for human serum albumin (hsa) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1):169 – 180, 2003. ISSN 0378-5173. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00134-0). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517303001340>.
- [271] Xiaoqian Shan, Changsheng Liu, Yuan Yuan, Feng Xu, Xinyi Tao, Yan Sheng, and Huanjun Zhou. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly(ethylene-glycol)-modified pla (bab type) triblock copolymer. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 72(2):303–311, September 2009. ISSN 0927-7765. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.04.017. URL <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.04.017>.
- [272] Jeffrey D. Clogston and Anil K. Patri. *Zeta Potential Measurement*, pages 63–70. Humana Press, Totowa, NJ, 2011. ISBN 978-1-60327-198-1. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6. URL https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- [273] Khin Yin Win and Si-Shen Feng. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15):2713 – 2722, 2005. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204006921>.

- [274] Haiyang Feng, Yuping Zhu, Zhixuan Fu, and Dechuan Li. Preparation, characterization, and in vivo study of rhein solid lipid nanoparticles for oral delivery. *Chemical Biology & Drug Design*, 90(5):867–872, 2017. ISSN 1747-0285. doi: 10.1111/cbdd.13007. URL <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13007>.
- [275] Yinghui Wei, Xiaoting Luo, Jiani Guan, Jianping Ma, Yicong Zhong, Jingwen Luo, and Fanzhu Li. Biodegradable nanoparticles for improved kidney bioavailability of rhein: preparation, characterization, plasma, and kidney pharmacokinetics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11):1885–1891, 2017. doi: 10.1080/03639045.2017.1353519. URL <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1353519>. PMID: 28692315.
- [276] Zheng Yuan and Xinhua Gu. Preparation, characterization, and in vivo study of rhein-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for oral delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, 9:2301–2309, 2015. doi: 10.2147/DDDT.S81320. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410823/>.
- [277] Wean Sin Cheow and Kunn Hadinoto. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370:79–86, 11 2010.
- [278] Carolina Gómez-Gaete, Macarena Retamal, Catalina Chávez, Paulina Bustos, Ricardo Godoy, and Pablo Torres-Vergara. Development, characterization and in vitro evaluation of biodegradable rhein-loaded microparticles for treatment of osteoarthritis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(Supplement C):390 – 397, 2017. ISSN 0928-0987. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.010>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871630433X>.
- [279] Carolina Gómez-Gaete, Elias Fattal, Lídia Silva, Madeleine Besnard, and Nicolas Tsapis. Dexamethasone acetate encapsulation into trojan particles. *Journal of Controlled Release*, 128(1):41 – 49, 2008. ISSN 0168-3659. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.008>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365908000989>.
- [280] Amol J. Thote and Ram B. Gupta. Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(1):85–90, 2017/08/27 2005. doi: 10.1016/j.nano.2004.12.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2004.12.001>.
- [281] Nicolas Anton, Anshuman Jakhmola, and Thierry F Vandamme. Trojan microparticles for drug delivery. *Pharmaceutics*, 4(1):1–25, 03 2012. doi: 10.3390/pharmaceutics4010001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834908/>.
- [282] Vandana Patravale, Prajakta Dandekar, and Ratnesh Jain. 4 - nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In Vandana Patravale, , Prajakta Dandekar, , and Ratnesh Jain, editors, *Nanoparticulate Drug Delivery*, Woodhead Publishing Series in Biomedicine, pages 123 – 155. Woodhead Publishing, 2012. ISBN 978-1-907568-98-5. doi: <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568985500048>.

- [283] Yuan Gao, Xi Chen, Lei Fang, Fen Liu, Runlan Cai, Cheng Peng, and Yun Qi. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting ikkbeta inhibition in lps-activated macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 72(Supplement C): 104 – 112, 2014. ISSN 0891-5849. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.001>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914001579>.
- [284] Sook-Kyoung Heo, Hyun-Jeong Yun, Eui-Kyu Noh, and Sun-Dong Park. Emodin and rhein inhibit light-induced monocytes migration by blocking of ros production. *Vascular pharmacology*, 53(1-2):28—37, 2010. ISSN 1537-1891. doi: 10.1016/j.vph.2010.03.002. URL <https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.03.002>.
- [285] Rosemeyre Cordeiro, Elisa Campos, Ana Santos, Claudia Matos, and Helena Gil. Design and characterization of bi-soft segmented polyurethane microparticles for biomedical application. 88:477–82, 07 2011.
- [286] J Martel-Pelletier, F Mineau, FC Jolicoeur, JM Cloutier, and JP Pelletier. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *The Journal of rheumatology*, 25(4):753—762, April 1998. ISSN 0315-162X. URL <http://europepmc.org/abstract/MED/9558181>.
- [287] Tadafumi Tamura, Tomomi Shirai, Nobuo Kosaka, Kenji Ohmori, and Nagatomo Takafumi. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *European Journal of Pharmacology*, 448(1):81 – 87, 2002. ISSN 0014-2999. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01898-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01898-8). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299902018988>.
- [288] J. T. Dingle, A. Horner, and M. Shield. The sensitivity of synthesis of human cartilage matrix to inhibition by il-1 suggests a mechanism for the development of osteoarthritis. *Cell Biochemistry and Function*, 9(2):99–102, 1991. ISSN 1099-0844. doi: 10.1002/cbf.290090206. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.290090206>.
- [289] Christelle Boileau, Steeve Kwan Tat, Jean-Pierre Pelletier, Saranette Cheng, and Johanne Martel-Pelletier. Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against subchondral bone remodelling. *Arthritis Research & Therapy*, 10(3):R71, Jun 2008. ISSN 1478-6354. doi: 10.1186/ar2444. URL <https://doi.org/10.1186/ar2444>.
- [290] Anthony Meager. Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application. *Methods*, 38(4):237 – 252, 2006. ISSN 1046-2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.005>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202306000028>. Methods for Analyzing Cytokines.
- [291] G Ozbey, Gorczynski R, and Erin N. Stability of cytokines in supernatants of stimulated mouse immune cells. *Eur Cytokine Netw*, 25(2):30–34, Jun 2014. ISSN 1952-4005 (Electronic); 1148-5493 (Linking). doi: 10.1684/ecn.2014.0353.
- [292] Wilco de Jager, Katarzyna Bourcier, Ger T. Rijkers, Berent J. Prakken, and Vicki Seyfert-Margolis. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with

- multiplex immunoassays. *BMC Immunology*, 10(1):52, Sep 2009. ISSN 1471-2172. doi: 10.1186/1471-2172-10-52. URL <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-52>.
- [293] Felix Meissner, Kaaweh Molawi, and Arturo Zychlinsky. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol*, 9(8):866–872, 08 2008. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1633>.
- [294] M. Mian, S. Brunelleschi, S. Tarli, A. Rubino, D. Benetti, R. Fantozzi, and L. Zilletti. Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(10):845–847, 1987. ISSN 2042-7158. doi: 10.1111/j.2042-7158.1987.tb05131.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb05131.x>.
- [295] J. A. Roman-Blas and S. A. Jimenez. Nf-kappab as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9):839–848, 2017/11/03 2006. doi: 10.1016/j.joca.2006.04.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2006.04.008>.
- [296] Hye-Mi Lee, Dong-Min Shin, Hwan-Moon Song, Jae-Min Yuk, Zee-Won Lee, Sang-Hee Lee, Song Mei Hwang, Jin-Man Kim, Chang-Soo Lee, and Eun-Kyeong Jo. Nanoparticles up-regulate tumor necrosis factor alpha and cxcl8 via reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(2):160 – 169, 2009. ISSN 0041-008X. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.010>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X09001999>.