



Especial Premis i Beques 2024

Editorial

M.R. Ballester

3

Beques col·legials 2023/24

Impacte del perfil lipídic avançat en l'avaluació del risc de malaltia cardiovascular en pacients amb hiperalfalipoproteinèmia

David Ceacero Marín

4

Expansió de limfòcits T reguladors com a teràpia per frenar la neurodegeneració en la diabetis

Maria Llorián-Salvador

10

Premis 2024

Millors TFGs

Erenumab, fremanezumab i galcanezumab pel tractament de la migranya: anàlisi d'ús en la pràctica clínica habitual d'un hospital de tercer nivell

Maria Monté Monté

16

Tractament del càncer de mama en pacients embarassades mitjançant la utilització de doxorubicina encapsulada en nanopartícules

Maria Gil-Vives

21

Millor article en OA (DOAJ)

Sistemes lipídics nanoestructurats duals d'apigenina per al tractament del càncer

Lorena Bonilla Vidal

26



Vol. 83, núm. Especial Premis i Beques 2024. Gener 2025

Directora i Directora Científica: M. Rosa Ballester Verneda.

Comitè editorial: Oscar Llansó Sánchez, Cristina Morales Navajas, Xavier Tejedor Ganduxé, Cristina Casajuana Kögel, Lorena Rivera Ortega i David Conde Estévez.

Coordinació editorial: Cristina Rodríguez Caba.

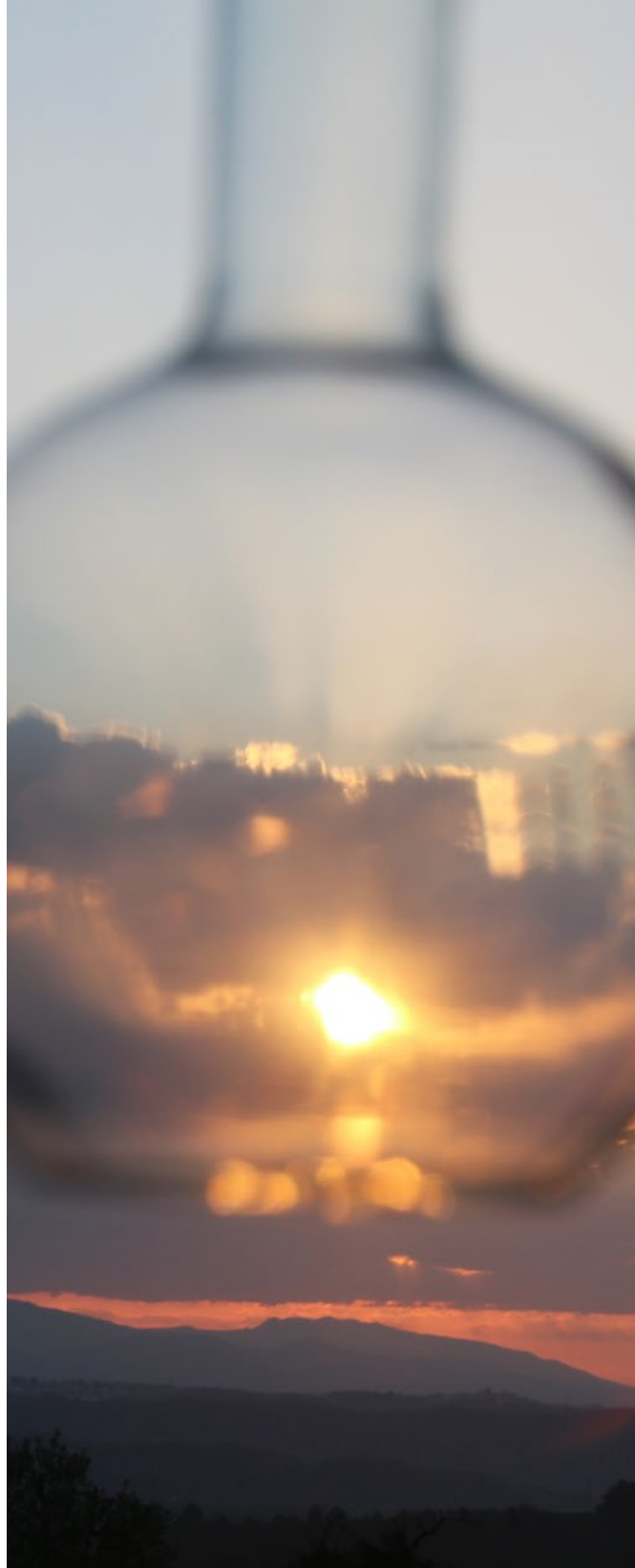
Secretària del Comitè editorial: Marta Palau.

Correcció lingüística: Natàlia Reynoso Renzi.

Edició i publicitat: Col·legi de Farmacèutics de Barcelona. c/ Girona, 64-66. 08009 Barcelona. Tel. 93 244 07 10. Fax 93 245 44 31. Correu/e: circular@cofb.net.

Disseny i maquetació: El Metropost, S.L. www.elmetropost.com. La redacció de CIRCULAR FARMACÈUTICA no subscriu necessàriament els punts de vista que els autors reflecteixen en els treballs que signen.

Circular Farmacèutica és una revista que edita el Col·legi de Farmacèutics de Barcelona. El Col·legi és una corporació de dret públic subjecte a la Llei de col·legis professionals, amb domicili al carrer Girona núm. 64, 08009, de Barcelona, CIF Q08660021. Qualsevol persona que accedeixi a aquesta web accepta les condicions d'ús i les prohibicions que es descriuen a continuació i es compromet a no fer res que pugui produir alteració o maldre en el funcionament normal. El Col·legi és propietari del software i disseny gràfic de la revista, n'exerceix els drets d'edició, i és titular dels drets d'explotació dels articles dels autors i de les gràfiques, taules, fotografies, imatges i dibuixos que aquests puguin incorporar. Tots els drets reservats. Queden expressament prohibides totes aquelles activitats que impliquin la reproducció total o parcial dels continguts editats, la distribució, la comunicació pública, la modificació, l'alteració o la descompilació, incloent-hi la forma i l'estructura en les quals es presenten, especialment la simple reproducció i/o la comunicació en forma de resum, ressenya o reproducció en revistes de premsa amb finalitats oneroses o gratuïtes sense haver obtingut l'autorització prèvia del Col·legi. No obstant això, l'usuari pot imprimir, emmagatzemar en un disc del seu ordinador tots els elements, per fer-ne un ús particular. El Col·legi no es responsabilitza del contingut dels articles publicats i no respondrà les reclamacions que es puguin derivar de la qualitat, la fiabilitat o l'exactitud que presenten. Tampoc garanteix que la web estigui lliure de virus informàtics i no es fa responsable dels danys i perjudicis en els sistemes informàtics per anomalies de funcionament per causes alienes a la seva voluntat, fortuïtes o de força major. El Col·legi es reserva el dret de fer les modificacions de continguts, estructura, condicions d'accés i qualsevol altra de qualsevol índole sense avis previ. El Col·legi instarà qualsevol reclamació i/o acció judicial pels danys i perjudicis que un ús inadequat de l'usuari provoqui a la pàgina i per qualsevol actuació il·legítima que conculqui drets de terceres persones. L'activitat del Col·legi com a prestador de serveis de la societat de la informació es regeix per la normativa espanyola i considera els jutjats i tribunals de la ciutat de Barcelona competents per entendre dels conflictes que sorgeixin a conseqüència de la utilització d'aquesta pàgina.



Editorial

M. Rosa Ballester

Benvolgudes lectores, benvolguts lectors

La farmàcia ha deixat de ser, ja fa molt de temps, només el lloc on es dispensen medicaments. Actualment, son un espai de coneixement, d'acompanyament i, sobretot, una disciplina científica rellevant per a la salut pública. Al darrere de cada fàrmac, de cada formulació magistral, de cada avenç terapèutic, hi ha anys de recerca rigorosa, sovint invisible, però imprescindible.

Aquest número especial està dedicat a donar visibilitat a aquesta recerca. Les **beques** als 2 millors projectes que presentem finançats amb la convocatòria 2023 / 2024 són un reconeixement a la rellevant aportació científica que fa el nostre col·lectiu farmacèutic amb la voluntat de millorar la vida de les persones. Els **Treballs de fi de Grau** (TFG) premiats a la passada convocatòria posen de manifest la vitalitat i qualitat acadèmica de les noves generacions que surten de les facultats de Farmàcia. El premi al millor **article** publicat en una revista inclosa a [DOAJ](#) seguint les directrius Open Access (OA), alineades amb la [Ciència Oberta](#) que promou la [Recerca i Innovació Responsable](#) (RRI per les sigles en anglès) evidencia la excel·lència del nostre col·lectiu a l'avantguarda del coneixement.

Des dels estudis in vitro en models animals, estudis de casos i controls, anàlisi d'ús de medicaments a la pràctica clínica habitual, i la innovació en sistemes d'alliberament, les aportacions guardonades reflecteixen la multidisciplinarietat del camp farmacèutic que combina el rigor científic amb una profunda responsabilitat social.

Aquest número vol ser més que un aparador de mèrits. És també una oportunitat per inspirar noves vocacions, que valorin la recerca com a bé comú. Amb aquesta publicació, volem fomentar la transferència de coneixement entre la recerca i la pràctica professional i recordar que darrere cada gran avenç hi ha sempre una pregunta, una passió i un compromís.

La recerca farmacèutica no s'atura, i com a revista compromesa amb el progrés del sector, ens sentim orgullosos de poder contribuir a fer visibles les fites assolides, i de donar veu a qui treballa perquè la farmàcia continuï sent una de les pedres angulars del sistema de salut.

Gràcies per llegir-nos i per compartir amb nosaltres aquest reconeixement col·lectiu del poder transformador de la recerca. ■

Impacte del perfil lipídic avançat en l'avaluació del risc de malaltia cardiovascular en pacients amb hiperalfalipoproteinèmia

David Ceacero Marín

Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, Hospital Universitari de Bellvitge.

Bàrbara Fernández Cidón

Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, Hospital Universitari de Bellvitge.

Xavier Pintó Sala

Unitat de Risc Vascular. Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. Centre de Recerca Biomèdica en Xarxa de Fisiopatologia de l'Obesitat i Nutrició (CIBEROBN), Institut de Salut Carles III. Universitat de Barcelona.

Marta Fanlo Maresma

Unitat de Risc Vascular. Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. Centre de Recerca Biomèdica en Xarxa de Fisiopatologia de l'Obesitat i Nutrició (CIBEROBN), Institut de Salut Carles III.

Lara Hidalgo Peña

Unitat de Risc Vascular. Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge.

Emili Corbella

Unitat de Risc Vascular. Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. Centre de Recerca Biomèdica en Xarxa de Fisiopatologia de l'Obesitat i Nutrició (CIBEROBN), Institut de Salut Carles III.

Antoni Riera Mestre

Unitat de Risc Vascular. Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL.

María José Castro Castro

Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, Hospital Universitari de Bellvitge. Universitat de Barcelona.

Paraules clau:

Colesterol HDL

Aterosclerosi

Malaltia cardiovascular

Ressonància magnètica nuclear

INTRODUCCIÓ

ANTECEDENTS

Les HDL són partícules de composició complexa i variable que poden experimentar grans canvis en funció de les característiques genètiques i ambientals individuals¹. Les partícules HDL recullen el colesterol de diferents cèl·lules i lipoproteïnes i el transporten al fetge. Aquest procés es denomina transport revers de colesterol (TRC) i és el principal efecte protector de les HDL contra l'aterosclerosi. A més, les partícules HDL també tenen funcions antiinflamatòries, antioxidants i anti-trombòtiques.

Els estudis epidemiològics han demostrat que les concentracions baixes de HDL-C s'associen a un major risc de MCVA² i que les concentracions elevades de HDL-C tenen un efecte protector enfront de la MCVA³.

Així mateix, en diferents assajos clínics, no s'ha demostrat que l'ús de fàrmacs per a augmentar el HDL-C tingui un efecte preventiu enfront de la MCVA⁴. En diferents estudis prospectius realitzats⁵, s'ha observat que els individus amb majors concentracions en sèrum de HDL-C presenten una major incidència de MCVA i altres patologies. La relació entre HDL-C, risc de MCVA i mortalitat global presenta una corba en forma de "U". Els individus amb concentracions en sèrum de HDL-C en els extrems su-

perior i inferior de la distribució de la corba són els que presenten una major incidència de MCVA⁵.

Finalment, alguns trastorns associats a l'elevació del HDL-C, com l'alcoholisme crònic, també s'associen a un major risc de MCVA i altres patologies¹.

Aquestes dades contradictòries es poden deure al fet que en situacions patològiques com a malalties inflamatòries cròniques, les propietats antiinflamatòries⁶ i antioxidants⁷ i, per tant, la funcionalitat de les partícules HDL podria veure's compromesa, causant mal endotelial⁵. Tot això, afectaria l'estructura i composició de les HDL en els pacients amb concentracions en sèrum extremadament altes de HDL-C.

Atès que l'estructura i funció de les HDL estan íntimament lligades, la composició de les HDL s'ha convertit en un tema de gran interès, particularment la falta d'associació entre el HDL-C i el risc d'esdeveniments cardiovasculars en pacients amb malaltia coronària⁸. Atès que les funcions antiaterogèniques de les HDL no són exercides per la seva càrrega de colesterol, les concentracions de HDL-C no reflecteixen la funcionalitat de les HDL¹. L'apolipoproteïna A1 (Apo A-1) tampoc reflecteix la funcionalitat de les partícules HDL i no ha demostrat ser un millor predictor que el HDL-C per a la MCVA⁹.

Per aquest motiu, **nous biomarcadors que reflecteixin la funcionalitat de les HDL han de substituir als marcadors indirectes.**

Actualment, el TRC pot avaluar-se de manera directa mesurant la capacitat de eflux de colesterol dels macròfags (CEC)¹⁰. Donada la complexitat de la tècnica, l'absència d'estandardització i la difícil aplicació en la pràctica clínica en els laboratoris, la determinació de l'estructura i composició de les HDL també pot contribuir a comprendre la funcionalitat de les HDL.

Les partícules HDL són molt heterogènies en estructura i composició i presenten dues subclasses: les HDL2, grans i menys denses (1,063 g/mL-1,125 g/mL), enriquides en lípids, i les HDL3, petites i denses (1,125 g/mL-1,210 g/mL), enriquides en proteïnes¹¹.

La incorporació de colesterol a les HDL està mediat pel transportador ABC-A1, el qual reconeix la Apo A-I lliure. L'enzim Lecitina Colesterol Acil Transferasa (LCAT) esterifica aquest colesterol per a facilitar la incorporació de molècules addicionals de colesterol.

Diversos transportadors cel·lulars faciliten aquest procés (SR-BI, ABC-AI i ABC-G1). Cadascun d'ells transfereix colesterol a diverses subclasses de HDL. Les HDL naixents inicien el seu procés de maduració per acció de la PTEC (Proteïna Transportadora d'Èsters de Colesterol) la qual impulsa una major transferència de triglicèrids (TG) de les VLDL a les HDL, i a través de l'enzim LCAT, que esterifica el colesterol lliure. Inicialment, les molècules de HDL tenen forma de disc (anomenades HDL3) i es converteixen progressivament en formes esfèriques (HDL2) en incorporar majors quantitats de colesterol i augmentant la seva grandària¹².

La grandària de les HDL vindrà també determinada pel metabolisme

dels TG. En condicions de hipertriglicèdèmia, l'activitat de la PTEC està augmentada, la qual cosa provoca la formació intravascular de partícules HDL funcionalment deficientes, enriquides en TG (HDL-TG)¹³, augmentant la grandària d'aquestes.

De fet, en diversos estudis s'ha observat una forta relació entre l'increment de les concentracions en sèrum de HDL-TG i MCVA^{14,15}. Per aquest motiu, és important definir el paper de les proteïnes associades a les HDL que regulen la concentració de TG i la seva relació amb la MCVA.

Les proves actuals sobre els efectes antiaterogènics o proaterogènics de subpoblacions específiques de HDL en humans són contradictòries i confuses¹¹. Les HDL3 exerceixen un paper important en la protecció de les LDL enfront de l'oxidació¹¹. Aquestes partícules presenten una major capacitat antioxidant i poden eliminar lípids d'altres lipoproteïnes millor que les HDL2. Això es deu al seu major contingut en proteïnes antioxidants. Diversos estudis han demostrat com les HDL3 s'associen a una major estabilitat de la placa, ja que són més resistents a l'oxidació¹¹. D'altra banda, les HDL2 indueixen el eflux de colesterol a través de SR-BI i ABC-G1 més eficientment que les HDL3 que promouen el eflux de colesterol a través de la interacció amb ABC-A1¹¹.

En aquest confús context, les subclasses d'HDL2 s'han caracteritzat per tenir efectes protectors, mentre que les subclasses d'HDL3 s'han associat amb un major risc de cardiopatia coronària¹⁶. En un estudi prospectiu de 5 anys de seguiment¹⁷ es va demostrar que tant HDL2 com HDL3 són subfraccions protectores de HDL-C. En un seguiment de 9 anys de les cohorts de Caerphilly i Speedwell¹⁸, les concentracions en sèrum d'HDL3 es van correlacionar significativament amb un menor risc de

Les partícules HDL
són molt
heterogènies
en estructura
i composició i
presenten dues
subclasses:
les HDL2, grans i
menys denses,
i les HDL3, petites
i denses, enriquides
en proteïnes.

MCVA, mentre que els d'HDL2 no es van correlacionar significativament amb esdeveniments cardiovasculars. Finalment, en un metaanàlisi¹⁹ entre l'estudi del Framingham Offspring (pacients predominantment caucàsics) i el Jackson Heart Study (predominantment pacients africans), es va observar que les concentracions d'HDL3-C en sèrum baixes són els principals responsables de l'associació inversa entre el HDL-C i la cardiopatia coronària.

A causa de tot l'anterior, **ens trobem davant una situació d'incertesa en quant al significat clínic de les concentracions elevades de HDL-C.** Tenint en compte que la concentració de HDL-C no explica la seva funcionalitat, és necessari investigar quines característiques de les HDL poden ajudar a diferenciar les partícules de HDL potencialment protectores de les quals tindrien un efecte negatiu, neutre o fins i tot perjudicial sobre el risc de MCVA. Els assajos de CEC per a mesurar la funcionalitat de les HDL poden proporcionar proves directes de les funcions cardioprotectors específiques de les HDL; però aquests assajos no estan

Si som capaços d'identificar una signatura molecular associada a la disfunció de les HDL, la implantació de la tecnologia en l'àmbit clínic serà factible a curt termini

estandarditzats per a les proves diagnòstiques de rutina. Per tant, pot tenir major utilitat clínica l'estimació del risc cardiovascular basant-nos en el mesurament de nous biomarcadors que determinin la composició, estructura, capacitat antioxidant i antiinflamatòria de les HDL.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest estudi és identificar nous biomarcadors de laboratori que permetin diferenciar les HDL que presentin una menor funcionalitat i que s'associïn a un augment del risc cardiovascular (RCV). Per a això se va avaluar la composició i estructura, d'aquestes lipoproteïnes. Aquests marcadors ajudaran al diagnòstic precoç de MCVA en individus amb hiperalfalipoproteïnèmia.

El objectiu secundaris és, d'una banda, adaptar el mètode validat per Hirano et al. 2008²⁰ per a la separació de les concentracions en sèrum de les subfraccions HDL2 i HDL3. Posteriorment es verificarà aquest mètode.

METODOLOGIA

Es tracta d'un estudi transversal i retrospectiu, de casos i controls, d'un hospital de referència. Es van reclutar dos grups de pacients menors de 75 anys:

- Grup 1: Pacients amb MCVA i hiperalfalipoproteïnèmia
- Grup 2: Pacients sense MCVA i hiperalfalipoproteïnèmia

Els pacients s'han seleccionat mitjançant una base de dades del laboratori clínic amb resultats de pacients amb concentracions en sèrum de HDL-C superior al percentil 90 de la població. Sobre la base d'això, es van seleccionar als pacients amb i sense MCVA.

Es van incloure als pacients amb MCVA si tenien antecedents d'hospitalització prèvia per síndrome coronària aguda, ictus aterotrombòtic o aterosclerosi de les extremitats inferiors. L'accident isquèmic no s'ha d'haver produït en els últims 3 mesos previs a la inclusió en l'estudi.

La hiperalfalipoproteïnèmia es va definir com una concentració en sèrum de HDL-C superior al percentil 90 de la població en almenys dues proves de laboratori prèvies a la inclusió en l'estudi. Aquest percentil s'ha obtingut a partir d'una base de dades de laboratori de concentracions en sèrum de HDL-C en població general. El percentil 90 obtingut per als homes (n=155.486) va ser de 1,76 mmol/L (67,95 mg/dL) i per a les dones (n=193.294) va ser de 2,14 mmol/L (82,63 mg/dL).

S'ha exclòs als pacients que presentin insuficiència renal (estimació del filtrat glomerular segons CKD-EPI 2009 <60 mL/min), qualsevol malaltia greu, hipertrigliceridèmia >4,56 mmol/L (>400 mg/dL), abús d'alcohol, tractament amb fibrats (bezafibrato, fenofibrato o gemfibrozilo), consum de barbitúrics o àcids grassos omega-3.

MÈTODES ANALÍTICS

I VARIABLES A ANALITZAR:

1. Perfil lipídic convencional i separació de les subfraccions de HDL:

Es va realitzar el mesurament de un perfil bàsic on s'inclouen magnituds com glucosa, creatinina, enzims

hepàtics, hemograma i es va mesurar un perfil lipídic complet de les concentracions sèriques de: colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), colesterol HDL2 (HDL2-C), colesterol HDL3 (HDL3-C), triglicèrids HDL3 (HDL3-TG), colesterol LDL (LDL-C), colesterol no HDL (no HDL-C) i triglicèrids mitjançant mètodes espectrofotomètrics en l'analitzador Cobas c702 (Roche Diagnostics).

La concentració sèrica d'apolipoproteïna A, apolipoproteïna B i PCR ultrasensible es va mesurar mitjançant mètodes turbidimètrics en l'analitzador Cobas c702 (Roche Diagnostics). D'altra banda, la concentració sèrica d'Interleucina-6 mitjançant el mètode de electroquimioluminiscència en l'analitzador Cobas e801 (Roche Diagnostics)

Per a realitzar la mesura de les concentracions d'HDL2-C, HDL3-C, HDL3-TG es va realitzar un pas previ de precipitació, aïllant sèrum amb únicament HDL3.

El procediment de separació de les subfraccions d'HDL es va realitzar utilitzant un reactiu per a precipitar les lipoproteïnes que contenen apolipoproteïna-B i HDL2 tal i com es descriu per Hirano et al. 2008 (20).

Per a l'estudi de verificació, es va realitzar el mesurament (n=44) de diferents magnituds abans i després del procediment de precipitació: apolipoproteïna-A, apolipoproteïna-B, HDL-C, triglicèrids i colesterol en l'analitzador Cobas@c702 (Roche Diagnostics). Aquests mesuraments es van realitzar en diferents sèries durant 70 dies.

D'altra banda es va realitzar un estudi de repetibilitat (n=8) determinant la imprecisió intraserial de les diferents magnituds exposades anteriorment. Es va calcular el coeficient de variació (CV) i es va comparar amb la imprecisió interserial acumulada de controls interns del nostre laboratori (CVinter) i amb el CV màxim

permès pel nostre laboratori (CVMP).

2. Perfil lipídic avançat i patró de N-glicosilació per RMN:

Es va obtenir el perfil de lipoproteïnes utilitzant la prova de RMN Liposcale® (CE), com es va reportar prèviament. El protocol va avaluar les concentracions lipídiques (TG i colesterol), la grandària i nombre de partícules de tres classes diferents de lipoproteïnes (VLDL, LDL, i HDL), i les subclasses (grans, mitjanes i petites VLDL, LDL, i HDL).

MÈTODES ESTADÍSTICS

Es va realitzar l'estudi de normalitat Shapiro-Wilk i el test de Levene per a avaluar la Homoscedasticitat de variàncies en cadascuna de les variables. En funció dels resultats, es va aplicar el test estadístic de comparació de mitjanes corresponent:

- T de Student: Es compleix la normalitat de les variables en tots dos grups i les variàncies són homocedàstics.
- T de Student amb correcció de Welch: Es compleix la normalitat de les variables en tots dos grups i les variàncies són heterocedàstics.
- U de Mann-Whitney: No es compleix la normalitat de les variables en els dos grups.

La significació estadística de les variables entre tots dos grups es va assumir amb valors de $p < 0,05$. Els anàlisis és va realitzar amb el programa informàtic Rstudio.

LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Les limitacions de l'estudi són que la hiperalfalipoproteïnèmia l'hem definit com el mesurament d'una concentració en sèrum de HDL-C superior al percentil 90 de la població i, a causa de les característiques del HDL-C aquest pot variar per factors externs com a dieta, ingesta d'alcohol crònica, tractament amb fibrats, barbitúrics o suplementes d'omega-3. És per això que en realitzar el me-

surament d'HDL-C, alguns pacients van passar de percentil 90 a percentil 80 o percentil 85. D'aquests pacients vam obtenir els resultats per a futurs estudis per percentils, però no van ser tinguts en compte per a l'estudi estadístic de comparació de mitjanes/medianes entre les variables dels dos grups.

En funció del comentat, la limitació de l'estudi és la baixa grandària mostral que obre la porta a intentar ampliar-lo i obtenir resultats més extrapolables a la població general.

RESULTATS

Es va realitzar una verificació de la mesura de concentració de colesterol en les subfraccions HDL2 i HDL3 mitjançant la precipitació d'apolipoproteïna B.

En totes les mostres, després de realitzar la precipitació, es va obtenir un resultat inferior al límit de detecció d'apolipoproteïna B ($< 0,2$ g/L). La imprecisió va ser inferior al CVMP (Taula 1).

A més, es va realitzar un estudi d'estabilitat del reactiu de precipitació ja preparat observant-se que després de 70 dies de preparació de reactiu, aquest continuava mostrant resultats compatibles amb el bon funcionament de la tècnica.

Respecte a l'estudi de RMN en els pacients, es van obtenir els següents

resultats: En els pacients amb MCVA, les partícules HDL són de menor diàmetre ($p < 0,01$), la concentració de partícules HDL de grandària gran és menor ($p < 0,01$) i la concentració de partícules HDL de grandària petita és major ($p < 0,01$).

A més, les lipoproteïnes de molt baixa, intermèdia i alta densitat (VLDL, IDL i HDL) estan més carregades en triglicèrids ($p < 0,01$, $p < 0,01$ i $p < 0,01$, respectivament) respecte al grup control.

DISCUSSIÓ

Els resultats aportats posen de manifest modificacions estructurals que poden anar associades a pèrdua de funcionalitat en les partícules d'HDL en els pacients que han sofert una MCVA. Aquest fet indueix que, malgrat tenir concentracions de colesterol HDL elevades, les seves funcions ateroprotectores (TRC, antiinflamatòries, antioxidants i antitrombòtiques) es vegin alterades exercint un efecte fins i tot proaterogènic sobre la paret endotelial.

Els pacients amb hiperalfalipoproteïnèmia presenten vulnerabilitat diagnòstica ja que actualment existeix un alt grau d'incertesa sobre el significat clínic de les concentracions molt elevades d'HDL-C. L'elevada freqüència de hiperalfalipoproteïnè-

Taula 1: Imprecisió intraserial en l'estudi de repetibilitat i la comparació amb el CVinter i el CV_{mp} per a les diferents magnituds.

Magnitud	Imprecisió intraserial (CV)	Imprecisió interserial (CVinter)	CVMP
Srm-Colesterol;c.subst.	2,12%	1,79%	3,00%
Srm-Triglicèrids;c.subst.	1,87%	1,85%	5,00%
Srm-Colesterol HDL2;c.subst.	4,08%	3,77%	4,00%
Srm-Colesterol HDL3;c.subst.	1,77%	3,77%	4,00%
Srm-Apolipoproteïna A-I;c.massa	1,16%	3,31%	9,10%

CV_{inter}: Coeficiente de Variació interserial; CV_{mp}: Coeficiente de Variació màxim permès.

L'estudi ens
han permès
descobrir les
característiques
composicionals
que podem
detectar en les
partícules HDL
disfuncionals.

mia en la població general (7,9% segons Márquez Contreras et al. (21)) fa necessari disposar de mètodes de laboratori per a avaluar la seva relació amb el risc de MCVA. A través d'aquest estudi, hem pogut identificar variables de laboratori que ajudin els clínics a conèixer el significat real de les concentracions molt elevades d'HDL-C de manera individualitzada. D'aquesta manera, podrem informar i tractar adequadament als pacients per a reduir el seu grau de risc de MCVA i millorar la seva qualitat de vida.

Actualment, mitjançant el perfil lipídic clàssic no es pot estimar el risc de MCVA en individus amb hiperalfalipoproteïnèmia pel fet que el HDL-C i Apo-A1 no reflecteixen la funcionalitat de les HDL. D'acord amb l'anterior, s'han de desenvolupar nous biomarcadors aplicables a la pràctica habitual del laboratori clínic com el perfil lipídic avançat determinat mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN).

La RMN és una tecnologia d'alt rendiment, reproducible, escalable i rendible, compatible amb els requisits clínics per a l'estratificació del risc de MCVA. Si els resultats del projecte són positius i som capaços d'identificar una signatura molecular associada a la disfunció de les HDL

mitjançant espectroscòpia de RMN, la implantació de la tecnologia en l'àmbit clínic serà factible a curt termini.

El coneixement generat amb aquest estudi pot millorar la pràctica clínica relacionada amb els trastorns del metabolisme de les partícules HDL, tant des del punt de vista de la prevenció, diagnòstic com a terapèutic, i reduir així la incidència de MCVA i els costos sanitaris derivats d'això.

En el mateix sentit, les dades aportades per aquesta recerca ens han permès descobrir les característiques composicionals que podem detectar en les partícules HDL disfuncionals. Aquest patró de molècules HDL ajudarà als clínics que es trobin amb pacients amb concentracions d'HDL-C elevades, podent ampliar l'estudi i derivar al pacient a unitats de risc vascular, especialitzades en aquesta mena de pacients i ajustant medicació hipolipemiant així com altres factors de risc per a reduir la incidència de MCVA en aquests pacients.

D'altra banda, pel fet que no hi ha teràpia farmacològica dirigida a aquests pacients, aquest estudi pot obrir un camí en el futur de la medicina personalitzada a pacients amb hiperalfalipoproteïnèmia i partícules HDL disfuncionals.

Tenint en compte que la MCVA és la principal causa de mort i despesa sanitària en la població mundial, millorar el coneixement sobre la seva patogènia i prevenció pot considerar-se una prioritat de salut pública.

JUSTIFICACIÓ DE LA GRANDÀRIA MOSTRAL

La grandària de la mostra s'ha calculat a partir dels resultats del diàmetre de les partícules HDL, la qual ens ha semblat la magnitud estudiada més rellevant. En aquest estudi s'ha observat que els individus sense MCVA presentaven una grandària mitjana de 8,32

nm. En l'estudi s'ha observat que la mitjana de grandària d'HDL disminueix fins a 8,26 nm en els pacients amb MCVA. La desviació estàndard de tots dos grups és de 0,067 nm.

Amb una potència del 80% per a detectar diferències en la prova de la hipòtesi nul·la $H_0: \mu_0 = \mu_1$ utilitzant una prova T de Student de dues cues per a dues mostres independents, un nivell de significació del 5%, es precisen 33 subjectes en el primer grup i 16 en el segon per a detectar una diferència igual o superior al 0,06 unitats. S'assumeix que la desviació estàndard comuna és de 0,067. S'ha estimat una taxa de pèrdues de seguiment del 10%.

CONCLUSIONS

La separació de la subfracció HDL3 mitjançant la precipitació d'apolipoproteïna B és una metodologia aplicable en el laboratori clínic amb l'objectiu de determinar la concentració de HDL2-C i HDL3-C.

Els pacients amb hiperalfalipoproteïnèmia que han sofert una MCVA presenten partícules HDL més petites, més carregades en triglicèrids i amb menor capacitat de TRC.

Les diferències observades en la composició i estructura de les HDL en el grup-MCVA, podrien estar relacionades amb una alteració de la funcionalitat de les HDL i amb el desenvolupament de la MCVA en aquests pacients.

Els resultats d'aquest estudi posen de manifest que els pacients amb hiperalfalipoproteïnèmia han de sotmetre's a una anàlisi complementària on s'estudiï si les seves partícules HDL presenten una composició alterada i que, per tant pugui comprometre a la seva funcionalitat, incrementant el risc de sofrir una MCVA.

A més, aquest treball obre la porta al futur de la medicina personalitzada amb el desenvolupament de fàrmacs

dirigits a partícules HDL disfuncionals o a mecanismes etiopatogènics del metabolisme de les HDL.

Futurs estudis de proteòmica i lipídica en aquests grups de pacients i amb una grandària mostral major són necessaris per a poder caracteritzar correctament aquestes lipoproteïnes HDL disfuncionals.

AGRAÏMENTS

Volem agrair al Col·legi de Farmacèutics de Barcelona (COFB) i al Tri-

bunal de beques i premis pel suport d'aquest projecte, que considerem important a nivell assistencial i amb una gran utilitat en la població.

Conflicte de interès:

Els autors declaren no tenir conflicte d'interès.

Conflicte econòmic:

Aquest Treball ha estat finançat íntegrament pel Col·legi Oficial de Farmacèutics de Barcelona (COFB) gràcies a les beques de revolta.

Deure de confidencialitat:

L'estudi ha estat aprovat per Comitè Ètic de Recerca Clínica (CEIC) de l'Hospital Universitari de Bellvitge (PR119/23).

Les dades personals relatives als pacients obtinguts a través del present estudi es van processar de conformitat amb el Reglament (UE) 2016/679 del Parlament Europeu sobre Protecció de Dades. A més, l'estudi va complir els principis ètics per a la recerca mèdica en éssers humans adoptats en la Declaració de Hèlsinki de l'Associació Mèdica Mundial (revisada en 2013). ■

Bibliografia

1. Von-Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance. *Eur Heart J*. 2022.
2. Gordon T, et al. High-density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med*. 1977;62(5):707-714.
3. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA*. 1993; 269: 3015-3023.
4. Schandelmaier S, Briel M, Saccilotto R, Olu KK, Arpagaus A, Hemkens LG, Nordmann AJ. Niacin for primary and secondary prevention of cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;14(6):CD009744.5.
5. Madsen CM, et al. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J*. 2017;38:2478-2486.
6. Madahian S, et al. Inflammation, high density lipoprotein and endothelium. *Curr Med Chem*. 2014;21(25):2902-9.
7. Navab M, et al. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(4):222-232.
8. Angeloni E, et al. Lack of protective role of HDL-C in patients with coronary artery disease undergoing elective coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J*. 2013;34(46):3557-62.
9. Luc G, et al. Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. *Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;12(7):1155-61.
10. Khera AV, et al. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Particle Number, and Incident Cardiovascular Events: An Analysis From the JUPITER Trial [Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin]. *Circulation*. 2017;20;135(25):2494-2504.
11. Rizzo M, et al. Subfractions and subpopulations of HDL: an update. *Curr Med Chem*. 2014;21(25):2881-91.
12. Aguilar-Salinas C, et al. Análisis de la composición y de la función de las HDL. ¿un estudio para el clínico del futuro?. *Rev Endocrinol Nutr*. 2011;19(3):113-122.
13. Chapman MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur Heart J*. 2010;31(2):149-64.
14. Fernández-Cidón B, et al. Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. *PRESARV-SEA Study*. *J Clin Med*. 2021;29;10(7):1379.
15. Girona J. HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci*. 2019;27;20(13):3151.
16. Otvos JD, et al. Effects of pravastatin treatment on lipoprotein subclass profiles and particle size in the PLAC-I trial. *Atherosclerosis*, 2002, 160(1), 41-48.
17. Stampfer MJ, et al. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325(6), 373- 381.
18. Yu S, et al. High density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9- years follow-up in the Caerphilly Study. *Atherosclerosis*, 2003, 166(2), 331-338.
19. Joshi PH, et al. Association of high-density lipoprotein subclasses and incident coronary heart disease: The Jackson Heart and Framingham Offspring Cohort Studies. *Eur J Prev Cardiol*. 2016.
20. Hirano T, et al. A simple and precise method for measuring HDL-cholesterol subfractions by a single precipitation followed by homogenous HDL-cholesterol assay. *J Lipid Res*. 2008.
21. Márquez Contreras E, et al. Las hiperalfalipoproteinemias y el consejo médico en atención primaria. Modificaciones del patrón lipídico [Hyperalphalipoproteinemias and medical advice in primary care. Changes of the lipid pattern]. *Aten Primaria*. 1998;31;21(9):617-21.

Expansió de limfòcits T reguladors com a teràpia per frenar la neurodegeneració en la diabetis

Maria Llorián-Salvador

Investigadora postdoctoral del programa d'atracció del talent de l'estranger "Maria Zambrano" (NextGeneration EU) i Beatriu de Pinós.

Cristina Hernández

Cap de Servei d'Endocrinologia, Vall d'Hebron Institut de Recerca.

Rafael Simó

Cap de Grup Diabetes i Metabolisme, Vall d'Hebron Institut de Recerca.

Paraules clau:

Limfòcits T reguladors
Retinopatia diabètica
Neurodegeneració
Diabetis tipus 2
Immunomodulació

INTRODUCCIÓ

La diabetis tipus 2 (T2D) és una de les malalties metabòliques més comunes a les societats occidentals i es considera "l'epidèmia del segle XXI": afecta 1 de cada 11 persones a Europa¹. La retinopatia diabètica (RD) és una complicació comuna de la T2D i la principal causa de discapacitat visual evitable en la població en edat laboral², representant entre el 15 i el 17% de la ceguesa total a Europa³. Els tractaments actuals de la RD, com la fotocoagulació amb làser, les injeccions intravítries de corticosteroides o d'agents anti-factor de creixement endotelial vascular (VEGF), estan enfocats en les etapes tardanes de la malaltia. A més, els agents intravítries han demostrat una eficàcia limitada, un risc significatiu d'efectes secundaris i són molt costosos. Per tant, noves estratègies terapèutiques més efectives que limitin l'escalada de la RD des de les seves primeres etapes i així prevenen la ceguesa i la càrrega social i econòmica associada, són una necessitat urgent per al sistema de salut global.

Actualment, la RD es considera una malaltia neurovascular altament específica en lloc d'una malaltia merament microvascular⁴. Des d'un punt de vista fisiopatològic, s'ha donat una importància especial a la unitat neurovascular retiniana (UNV)⁵, que està

formada per elements vasculars, membrana basal, neurones, cèl·lules glials (glia de Müller, astròcits) i cèl·lules immunes com la microglia i els macròfags perivasculars. És àmpliament acceptat que la inflamació crònica és el principal factor patogènic comú en el curs natural de la T2D⁶ i les seves complicacions, incloent-hi la RD⁷⁻⁹. La inflamació crònica de baix grau provoca un sistema immune innat mal adaptat, contribuint al desenvolupament de la RD mitjançant la infiltració de cèl·lules immunes circulants i proteïnes sèriques a la retina⁸⁻¹⁰. Aquesta infiltració immune desencadena una inflamació retiniana localitzada, mediada per microglia, cèl·lules de Müller i cèl·lules endotelials, que al seu torn provoca dany a la UNV i una neurodegeneració posterior^{7,8,11}. L'activació glial i la posterior alliberació de citocines pro-inflamatòries i apoptòtiques i factors angiogènics és un dels mecanismes subjacents més importants d'aquesta neuroinflamació prolongada, que exacerba l'estrès oxidatiu i el dany neurovascular retinià^{7,12}.

Les cèl·lules Treg són un component clau del sistema immune adaptatiu i juguen un paper vital en la tolerància immune gràcies a les seves potents propietats immunosupressores¹³⁻¹⁵. Les cèl·lules Treg migren als teixits i redueixen la inflamació, suprimint altres cèl·lules immunes adaptatives o

innates¹³. En els darrers anys, s'han descobert noves funcions de les Treg més enllà de les seves propietats reguladores immunes, amb una creixent evidència de les funcions regeneratives i neuroprotectores de les Treg en diversos teixits, incloent el sistema nerviós central (SNC). Les cèl·lules Treg promouen la remielinització en models d'esclerosi múltiple (EM)¹⁶, mentre que en la malaltia d'Alzheimer (EA) i la malaltia de Parkinson (MP), les Treg restauren l'homeòstasi

i prevenen el deteriorament cognitiu (DC) eliminant neuroimmunògens, polaritzant la microglia, modulant els astròcits i restaurant la funció neuronal normal^{14,15}. A més, l'augment de la producció d'interleucina (IL)-2 per part dels astròcits per expandir localment el nombre de Treg al SNC prevé danys inflamatoris i facilita la reparació després d'una lesió cerebral traumàtica i del deteriorament cognitiu associat a l'edat^{17,18}. Donades aquestes funcions neuro-

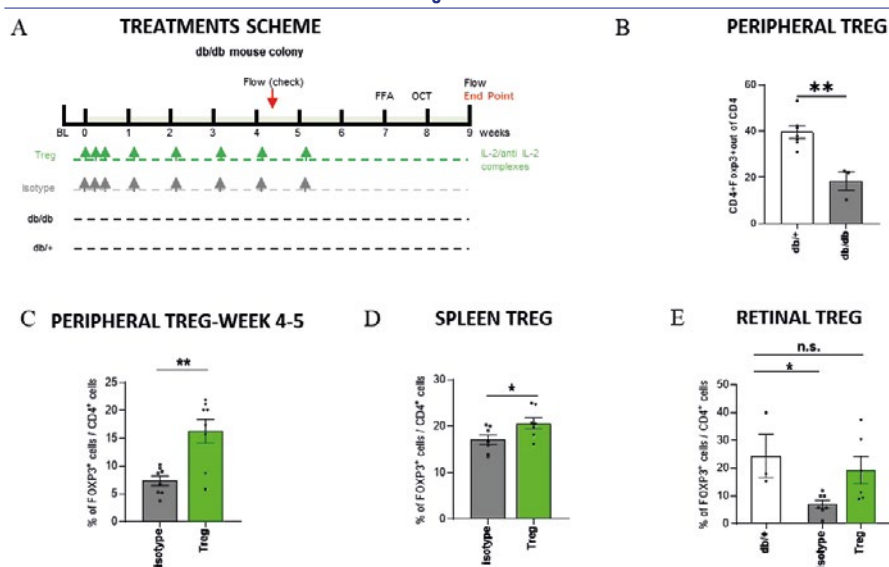
protectores, pro-regeneratives i immunomoduladores, els efectes beneficiosos de l'expansió de les Treg estan actualment sota investigació en nombrosos assajos clínics per a EA, MP o EM¹⁴. Atès que la immunomodulació juga un paper significatiu en la patogènesi de la RD, és plausible que l'expansió de les Treg també pugui ser beneficiosa en aquesta malaltia neurodegenerativa⁷⁻⁹.

Aquí, proporcionem evidència experimental que l'expansió de les Treg en les primeres etapes de la T2D rescata la patologia retiniana associada a la T2D, prevenint la neurodegeneració retiniana i la gliosi reactiva, i reduint l'activació de l'inflamasoma. Els nostres resultats mostren que les conegudes funcions immunomoduladores i neuroprotectores de les Treg es poden utilitzar per prevenir el dany en les fases inicials de la RD, i podrien representar una nova estratègia terapèutica per tractar aquesta greu complicació de la diabetis.

MATERIALS I MÈTODES UTILITZATS

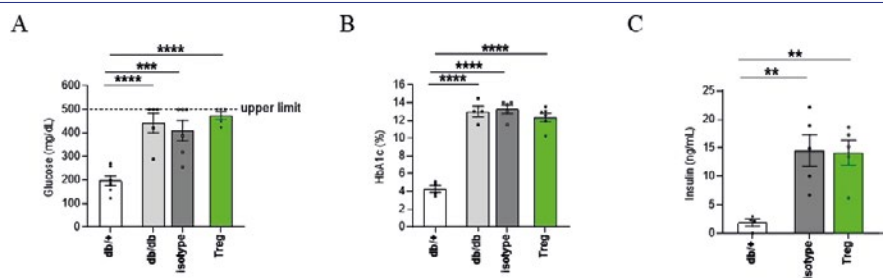
L'expansió de Treg es va aconseguir co-injectant IL-2 recombinat de ratolí amb anticossos monoclonals anti-IL-2 (19) o el seu isotip en ratolins db/db, un model establert de T2D. Els ratolins diabètics mascle db/db (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J) i els seus homòlegs no diabètics de control (db/+; BKS.Cg-Dock7m + Leprdb/+) es van adquirir de Charles River Laboratories (Calco, Itàlia) a les 6 setmanes d'edat per a les experiències. El receptor de leptina mutat que presenten els ratolins db/db dóna lloc a un fenotip de T2D induït per l'obesitat. Aquest model és el més utilitzat per a T2D a causa de la seva semblança amb les característiques clíniques en humans. L'expansió de Treg es va confirmar mitjançant ci-

Figura 1.



A. Diagrama del règim de tractament i grups de recerca: Treg - Animals que reben el complex IL-2/anti-IL-2; Isotip - Animals que reben IL-2/IgG2a de rató; db/db - Animals no injectats; i db/+, grup de control d'animals heterozigots.
B. Quantificació de cèl·lules Treg FOXP3+ CD4+ en ratolins db/db i els seus homòlegs db/+, expressades com a percentatge del total de cèl·lules CD4+ en sang.
C. Cèl·lules Treg FOXP3+ CD4+ mesurades en sang 4-5 setmanes després del primer tractament amb IL-2/anti-IL-2 o control isotip.
D. Quantificació esplènica de cèl·lules Treg FOXP3+ CD4+ al final de l'experiment.
E. Gràfic citomètric que mostra la proporció de Treg Foxp3+ dins de les cèl·lules CD4+ a la retina, amb dades agregades de 4-7 animals. Dades expressades com a mitjana ± s.e.m. A-D, *p<0,05; **p<0,01, test t no aparellat.
F. Histograma que mostra el nombre total de Treg Foxp3+ dins de la població CD4+ a la retina de ratolins de control db/+, ratolins db/db tractats amb isotip, i ratolins diabètics amb expansió de Treg, amb dades de 4-7 animals.
G. Quantificació de cèl·lules FOXP3+ CD4+ a la retina de ratolins db/+ i db/db que van rebre IL-2/anti-IL-2 o l'isotip (mitjana ± s.e.m., n=3-7, *p<0,05; ANOVA d'una via després de conversió arcsin).

Figure 2: Efectes en l'estat de la diabetis derivats de l'expansió de Treg.



A-C. Mesures metabòliques en ratolins mascle.
A. Mesura dels nivells de glucosa en els diferents grups de ratolins mascle.
B. Determinació de l'HbA1c en la sang dels diferents grups de mascles estudiats.
C. Determinació per ELISA de la insulina (ng/mL) en el plasma de ratolins db/+ mascles, db/db diabètics i db/db que van rebre l'expansió de Treg. n=4-6. Dades expressades com a mitjana ± s.e.m. *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001, ANOVA d'una via seguit de la prova de comparació múltiple de Tukey.

tometria de flux en sang, melsa i retina. Es va realitzar una angiografia de fons en animals de 17 setmanes d'edat, i estudis ex-vivo a les 18 setmanes. Per estudiar l'efecte de les Treg sobre les neurones retinals i la unitat neurovascular (NVU), es va utilitzar immunohistoquímica contra Cone-Arrestin (CA), PKC α , sinaptòfisi; ChAT (colina acetiltransferasa) i TH (tirosina hidroxilasa), per detectar neurones amacrines colinèrgiques i dopaminèrgiques respectivament; GFAP, Iba-1, calbindina, Brn3a (per cèl·lules ganglionars), isolectina B4 i albúmina (per a la filtració en la vasculatura). Els nivells de VEGF retinal es van mesurar mitjançant un assaig immunològic basat en beads magnètics, i es van analitzar NLRP3, Casp1 i IL-18 mitjançant Western Blot en homogenats retinals.

RESULTATS

Els ratolins db/db tenen una disminució sistèmica i retiniana en les proporcions de Treg que es recuperen després de l'expansió sistèmica.

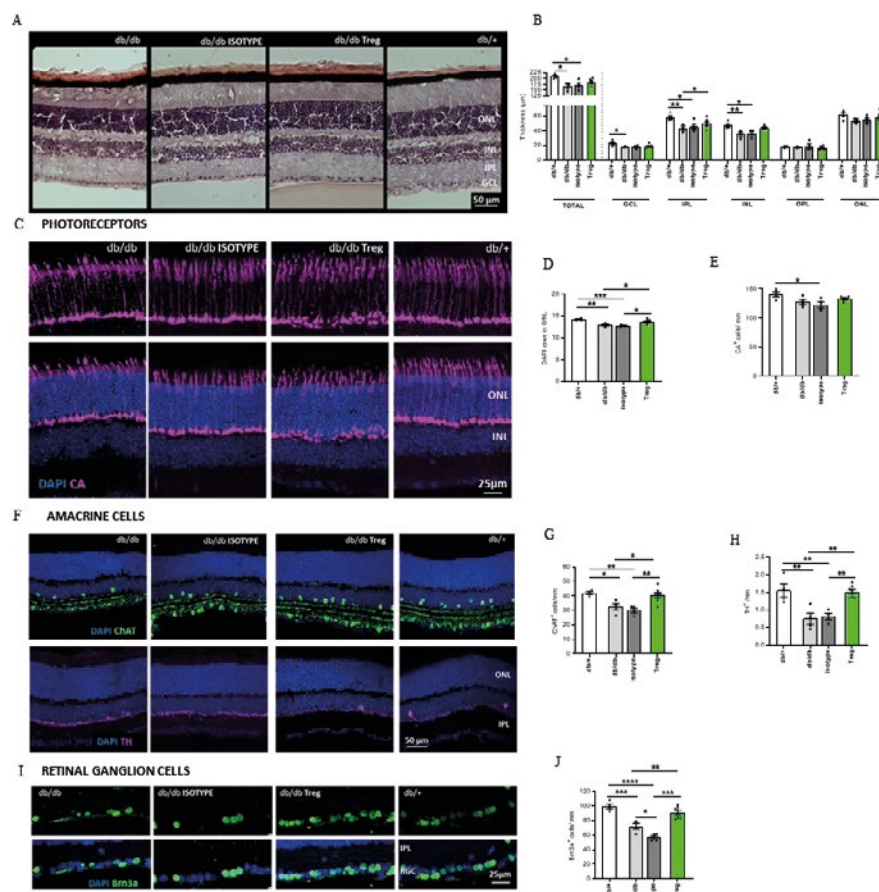
A causa de la manca de consens sobre l'alteració del nombre de cèl·lules Treg en pacients amb T2D²⁰⁻²², el nostre objectiu inicial era determinar si les Treg estan alterades en ratolins db/db amb T2D. En sang, els animals db/db presenten gairebé la meitat del percentatge de cèl·lules Foxp3+CD4+ dins dels seus limfòcits CD4+T en comparació amb els seus homòlegs de control, els animals db/+ (Figura S1B). Per superar aquesta disminució, vam expandir sistèmicament les Treg endògenes seguint el protocol de Webster et al.¹⁹, amb modificacions menors (Figura 1A). Vam confirmar l'expansió de les Treg després del tractament amb IL-2/mAb IL-2 en sang, 4-5 setmanes després de la injecció inicial (a meitat del tractament) (Figura 1C) i 9 setmanes

després de l'experiment (punt final de l'experiment) (Figura 1D). Tenint en compte que els nivells de Treg en la retina sana són molt baixos²³, vam determinar si l'impacte de l'expansió de les Treg era detectable en la retina. Tal com es va descriure per a les Treg perifèriques, els ratolins db/db van mostrar una disminució de la proporció de Treg i del nombre de Treg dins de la població de cèl·lules T CD4+ a la retina. De manera similar a la sang i la melsa, malgrat que es troben en nombre reduït, tal com s'ha descrit anteriorment²⁰, l'expansió sistèmica de Treg mediada per IL-2 també va ser efectiva a la retina²⁴ (Figura 1E-G). Un cop confirmada l'expansió local i sistèmica de les Treg, vam voler de-

terminar si l'expansió sistèmica de Treg en ratolins db/db tenia alguna conseqüència en el control metabòlic, incloent hiperglucèmia, HbA1c i nivells d'insulina a la sang. L'expansió de Treg no va canviar significativament aquests paràmetres en ratolins mascle (Figura 2A-C, respectivament).

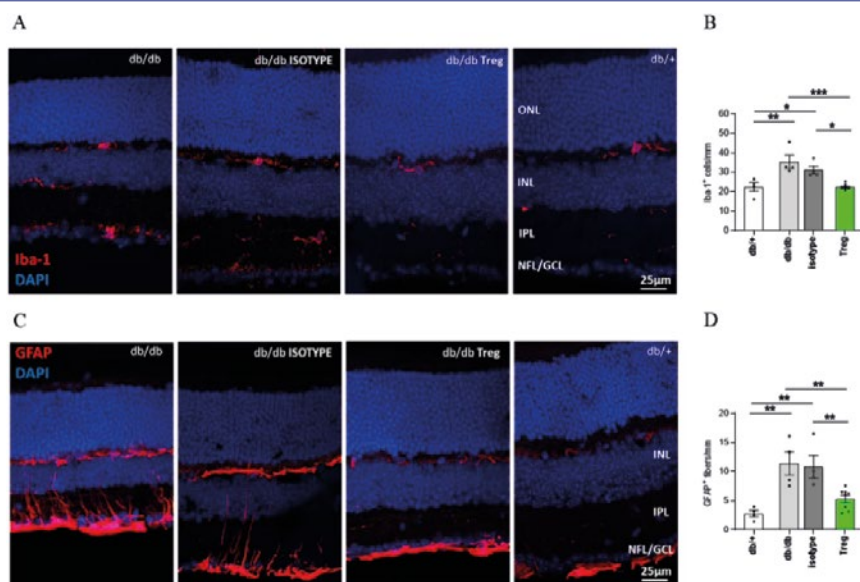
Aquests resultats suggereixen fermament que els efectes observats a la retina dels ratolins mascle són independents de qualsevol canvi en l'estat diabètic dels animals. En canvi, es poden atribuir als papers immunosupressors i neuroprotectors de les cèl·lules Treg a la retina. Tot i això, no podem descartar que un règim de tractament diferent o un altre enfocament amb Treg pugui influir en el

Figura 3: L'expansió de Tregs limita la neurodegeneració en la RD



A-B: Anàlisi d'hematoxilina-eosina del gruix retinal en ratolins db/+, db/db no injectats i db/db amb IL-2/mAb IL o control. Barra d'escala: 50 μ m. n = 4-6 ratolins.
C-E: Immunotinció dels fotoreceptors a l'ONL (C). Quantificació de nuclis DAPI+ (D) i fotoreceptors cons (E). Barra d'escala = 25 μ m. n = 4-5 ratolins.
F-H: Immunotinció de cèl·lules amacrines ChAT+ (verd) i TH+ (porpra).
G-H: Quantificació de somes ChAT+ (G) i TH+ (H) per mm de retina.
I-J: Immunotinció i anàlisi de les RGC. n = 4-7 ratolins. Dades com a mitjana $\pm$ s.e.m. ANOVA d'una via, prova de Tukey. * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005; ****P<0,001.

Figura 4: Animals amb expansió de Treg presenten característiques inflamatòries reduïdes relacionades amb la RD.



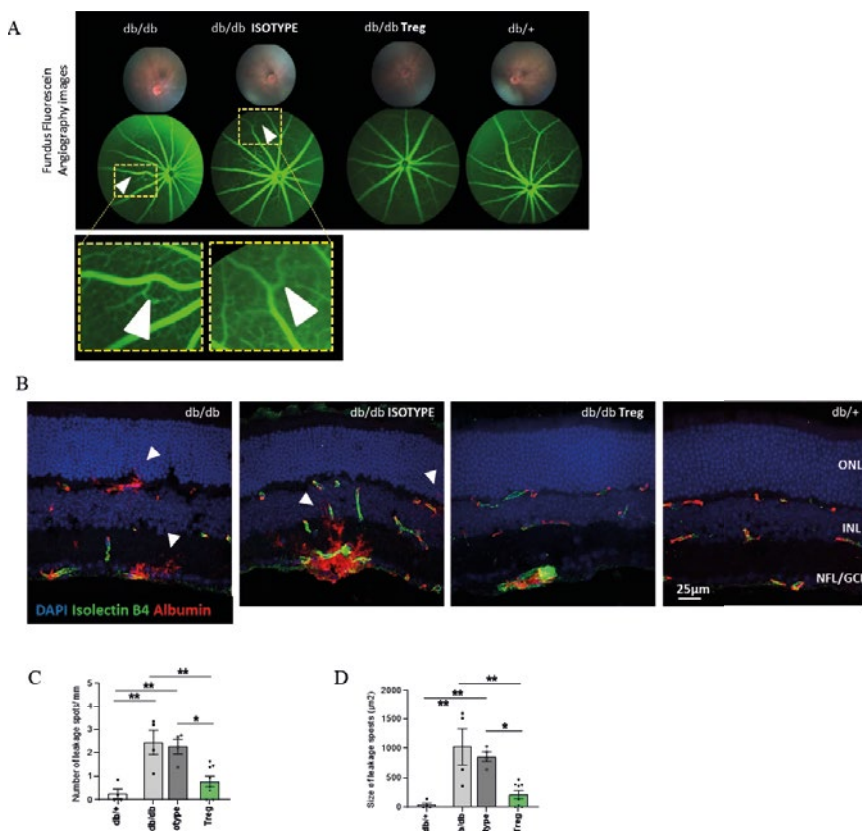
A-D: Anàlisi de cèl·lules microgials IBA-1+ i cèl·lules de Müller GFAP+ mitjançant immunofluorescència. Imatge representativa de cèl·lules microgials

(A) (IBA-1+, vermell) i cèl·lules de Müller glitòtiques (fibres GFAP+, vermell) (barres d'escala = 50 µm).

B: Anàlisi quantitativa del nombre total de cèl·lules IBA-1+ en totes les capes de la retina.

D: Nombre de fibres GFAP+ que travessen la capa plexiforme interna per mm. n=4-8. Dades presentades com a mitjana ± s.e.m. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,005; ANOVA unidireccional seguida de la prova de comparacions múltiples de Tukey.

Figura 5: L'expansió de Treg redueix danys vasculars associats a la diabetis i altera el gruix.



A: Imatge de fons amb fluoresceïna (fluoresceïna sòdica) de db/+, db/db i db/db tractats amb IL-2/anti-IL-2 o el seu isòtop, amb una imatge amplificada en groc que indica la tortuositat vascular en animals db/db.

B-D: Imatge i quantificació de la filtració de la barrera retiniana mitjançant tinció d'isolectina 4 (verd) i albúmina (vermell). Quantificació del nombre de punts de filtració per mm de retina (C) i la mida mitjana dels punts de filtració (D). Barres d'escala: 25 µm. n=4-8 (B) i n=3-6 (C).

E: Quantificació de la concentració de VEGF a la retina, normalitzada al total de proteïna. n=4-5. Dades presentades com a mitjana ± s.e.m. *P < 0,05; **P < 0,01; ANOVA unidireccional seguida de la prova de comparacions múltiples de Tukey.

control metabòlic o fins i tot en el curs de la T2D i les seves complicacions associades.

L'expansió de Treg prevé la neurodegeneració retiniana en ratolins db/db

A continuació, vam intentar determinar si l'expansió de Treg recuperava els canvis en la patologia retiniana característics dels ratolins db/db. Com s'ha descrit anteriorment²⁵, l'anàlisi histològica amb hematoxilina-eosina va identificar una disminució significativa del gruix total de la retina en ratolins db/db no injectats i en els seus controls/isotips, però aquesta disminució no es va observar en els animals que van sotmetre's a l'expansió de Treg. Els canvis en el gruix retini dels ratolins db/db semblaven deure's principalment a una disminució del gruix de la capa plexiforme interna (IPL) i la capa nuclear interna (INL) en els animals no injectats i els diabètics isotip, mentre que en els ratolins db/db que van passar per l'expansió de Treg no hi va haver una pèrdua significativa del gruix de l'IPL o de l'INL, i les capes retinianes apareixien similars a les dels ratolins no diabètics db/+ (Figura 3 A-B).

Està ben establert que la visió alterada associada a la RD en ratolins db/db està relacionada amb patologia neurodegenerativa, incloent la pèrdua de fotoreceptors, cèl·lules amacines i cèl·lules ganglionars retinianes (RGC)²⁵. Així, per determinar l'efecte de l'expansió de Treg en aquestes poblacions neuronals retinianes definides, vam examinar els canvis en el nombre total de fotoreceptors (files de cèl·lules DAPI+) en l'ONL i el Cone Arrestin (CA) (Figura 3C-E). Vam observar una disminució significativa en el nombre total de fotoreceptors tant en els animals diabètics no injectats com en els injectats amb isotip, que no

es va observar en els animals que van passar per l'expansió de Treg. En observar els fotoreceptors en con, vam notar una reducció lleu però significativa en el nombre en els ratolins db/db injectats amb isotip, que no es va observar en els que van sotmetre's a l'expansió de Treg. Aquests resultats suggereixen que la reducció dels fotoreceptors observada en animals diabètics, tant no injectats com injectats amb isotip, i absent en animals amb expansió de Treg, pot estar més relacionada amb els fotoreceptors en bastó.

Per abordar possibles canvis cel·lulars vinculats a la neurodegeneració en la RD, a continuació vam examinar les interneurons retinianes. Les alteracions eren evidents en les cèl·lules amacrines dels animals db/db (Figura 3F-H). Vam observar una disminució en el nombre de somes ChAT+ (Figura 3F, panell superior, i 3G) i TH+ (Figura 3F, panell inferior, i 3H), que representen respectivament les cèl·lules amacrines colinèrgiques i dopaminèrgiques. Els animals diabètics que van passar per l'expansió de Treg van mostrar un nombre significativament més alt de cèl·lules amacrines ChAT+ i TH+, similar als números observats en els ratolins db/+ (Figura 3A-C).

Finalment, vam examinar les alteracions en la capa de cèl·lules ganglionars retinianes (GCL) a causa de l'expansió endògena de Treg en animals amb T2D (Figura 3I, J). Tal com es va descriure anteriorment, els ratolins db/db no injectats presentaven menys RGC Brn3a+ en comparació amb els ratolins db/+ no diabètics. Aquesta disminució també es va observar en els ratolins db/db tractats amb isotip, mentre que l'expansió de Treg va mostrar un augment significatiu en el nombre de RGC Brn3a+, portant els números fins als dels ratolins db/+ no diabètics (Figura 3I, J).

L'expansió de Treg redueix la gliosi

A continuació, vam estudiar les conseqüències de l'expansió de Treg en la microglia i les cèl·lules de Müller, que són responsables d'iniciar i perpetuar la inflamació en la RD^{26,27}. Com s'esperava, vam trobar un nombre augmentat de cèl·lules microgials IBA-1+ en els animals diabètics no injectats i tractats amb isotip, en comparació amb els controls no diabètics. L'expansió de Treg va reduir significativament les cèl·lules microgials IBA-1+ a la retina db/db, fins a nivells comparables als controls no diabètics (Figura 4A-B).

L'augment de l'expressió de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) com a resposta a la gliosi reactiva és un dels signes més primerencs i prominents de l'activació de les cèl·lules de Müller en la RD. Els ratolins db/db sotmesos a l'expansió de Treg van mostrar una reducció significativa en el nombre de filaments GFAP+ que creuaven la IPL, en comparació amb els animals db/db no injectats o tractats amb isotip (Figura 4C-D).

L'expansió perifèrica de Treg millora la vasculopatia de la retinopatia diabètica

Dany vascular és una característica distintiva de la RD. Per investigar-ho, vam realitzar angiografia de fons d'ull in vivo amb fluoresceïna sódica, que va revelar vasos retinans notablement tortuosos en els ratolins db/db, tant en els no injectats com en els tractats amb isotip (fletxes, Figura 5A). Aquesta característica reflecteix la patologia vasodegenerativa de la RD²⁸, però va estar absent en els ratolins db/db que van passar per l'expansió de Treg (Figura 5A).

Per determinar si es veia afectada la barrera hemato-retiniana interna, tal com es va descriure prèviament en ratolins db/db^{12,29}, vam realitzar immunotincions amb isolectina B4 i al-

búmina, seguides de la quantificació del nombre i la mida de les àrees de fuga, que reflecteixen zones on l'albúmina present en la sang havia filtrat al neuropile (Figura 5B). Com es mostra a les Figures 5B-D, els animals db/db no injectats o els ratolins que van rebre l'isotip mostraven diverses àrees de fuga de gran mida (indicades amb fletxes, Figura 5B), mentre que els ratolins db/db amb Treg expandit mostraven menys i més petites àrees de fuga. Aquests resultats indiquen que l'expansió de Treg millora la ruptura de la barrera hemato-retiniana induïda per la diabetis.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Aquest estudi va revelar una reducció significativa de les Tregs en ratolins db/db, un model de T2D caracteritzat per hiperglucèmia, resistència a la insulina i etapes primerenques de la RD. L'expansió sistèmica de Tregs va incrementar la seva presència a la retina i va prevenir de manera efectiva característiques clau de la RD, com la pèrdua neuronal, l'activació glial i la fuga vascular. Cal destacar que aquests efectes protectors eren independents de qualsevol millora metabòlica, cosa que subratlla el potencial dels Tregs com a estratègia immunomoduladora per mitigar la disfunció de la unitat neurovascular i el dany retinós associat a la RD.

La inflamació de baix grau és un factor clau en la patogènesi de la T2D, cosa que ha motivat investigacions sobre el paper dels Tregs. Si bé estudis anteriors indiquen una disminució dels Tregs en pacients amb T2D, alguns suggereixen un desbalance entre les cèl·lules Tregs i les cèl·lules Th17 o una funcionalitat reduïda dels Tregs. En el nostre estudi, els ratolins db/db presentaven menys cèl·lules Tregs perifèriques CD4+C-D25+Foxp3+ en comparació amb els ratolins no diabètics, reforçant la

rellevància d'aquest model per a la T2D humana. L'expansió de Tregs va prevenir l'adelgantament retinós, la pèrdua neuronal i la neuroinflamació mitjançant la disminució de la gliosi de la microglia i cèl·lules de Müller i per tant, de les possibles respostes inflamatòries derivades de l'activa-

ció d'aquestes cèl·lules. A més, els Tregs van reduir el dany vascular mitjançant l'ameliorament de la fuga vascular. Donat l'efecte limitat dels tractaments actuals de la RD que s'adrecen a etapes avançades de la malaltia, els nostres resultats suggereixen que l'expansió de Tregs

presenta un enfocament terapèutic prometedor per a les etapes primerenques de la RD. No obstant això, els riscos potencials de la immunosupressió perifèrica i la necessitat d'estratègies terapèutiques dirigides en entorns clínics segueixen sent consideracions importants. ■

Bibliografia

- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109119.
- Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Mar;2:16012.
- Bourne RRA, Steinmetz JD, Saylan M, Mersha AM, Weldemariam AH, Wondmeneh TG, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health.* 2021 Feb 1;9(2):e144-60.
- Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek BL, et al. Diabetic retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017 Mar 1;40(3):412-8.
- Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia.* 2018 Sep;61(9):1902-12.
- Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2012 Jun;38(3):183-91.
- Forrester JV, Kuffova L, Delibegovic M. The Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 2020 Nov 6;11:583687.
- Xue M, Mao X, Chen M, Yin W, Yuan S, Liu Q. The Role of Adaptive Immunity in Diabetic Retinopathy. *J Clin Med.* 2022 Nov 2;11(21):6499.
- Yue T, Shi Y, Luo S, Weng J, Wu Y, Zheng X. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Front Immunol.* 2022 Dec 13;13:1055087.
- Cantón A, Martínez EM. CD4-CD8 and CD28 Expression in T Cells Infiltrating the Vitreous Fluid in Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy A Flow Cytometric Analysis. *Arch Ophthalmol.* 2004 May;122(5):743-9.
- Llorián-Salvador M, Cabeza-Fernández S, Gomez-Sanchez JA, de la Fuente AG. Glial cell alterations in diabetes-induced neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2024 Jan 18;81(1):47.
- Byrne EM, Llorián-Salvador M, Tang M, Margariti A, Chen M, Xu H. IL-17a damages the blood-retinal barrier through activating the janus kinase 1 pathway. *Biomedicines.* 2021 Jul 1;9(7).
- Okeke EB, Uzonna JE. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. *Front Immunol.* 2019 Apr 9;10:680.
- MacHhi J, Kevadiya BD, Muhammad IK, Herskovitz J, Olson KE, Mosley RL, et al. Harnessing regulatory T cell neuroprotective activities for treatment of neurodegenerative disorders. Vol. 15, *Molecular Neurodegeneration.* BioMed Central Ltd.; 2020.
- Evans FL, Dittmer M, de la Fuente AG, Fitzgerald DC. Protective and Regenerative Roles of T Cells in Central Nervous System Disorders. *Front Immunol.* 2019 Sep 12;10:2171.
- Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci.* 2017 May 1;20(5):674-80.
- Lemaitre P, Tareen SH, Pasciuto E, Mascali L, Martirosyan A, Callaerts-Vegh Z, et al. Molecular and cognitive signatures of ageing partially restored through synthetic delivery of IL2 to the brain. *EMBO Mol Med.* 2023 May 8;15(5).
- Yshii L, Pasciuto E, Bielefeld P, Mascali L, Lemaitre P, Marino M, et al. Astrocyte-targeted gene delivery of interleukin 2 specifically increases brain-resident regulatory T cell numbers and protects against pathological neuroinflammation. *Nat Immunol.* 2022 Jun 1;23(6):878-91.
- Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, et al. In vivo expansion of Treg cells with il-2-mab complexes: induction of resistance to eae and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *Journal of Experimental Medicine.* 2009 Apr 13;206(4):751-60.
- Qiao YC, Shen J, He L, Hong XZ, Tian F, Pan YH, et al. Changes of Regulatory T Cells and of Proinflammatory and Immunosuppressive Cytokines in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res.* 2016;2016:3694957.
- Sheikh V, Zamani A, Mahabadi-Ashtiyani E, Tarokhian H, Borzouei S, Alahgholi-Hajibehzad M. Decreased regulatory function of CD4 + CD25 +CD45RA+ T cells and impaired IL-2 signalling pathway in patients with type 2 diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 2018 Oct 26;88(4).
- Wang M, Chen F, Wang J, Zeng Z, Yang Q, Shao S. Th17 and Treg lymphocytes in obesity and Type 2 diabetic patients. *Clin Immunol.* 2018 Dec;197:77-85.
- Llorián-Salvador M, de Fuente AG, McMurran CE, Dashwood A, Dooley J, Liston A, et al. Regulatory T cells limit age-associated retinal inflammation and neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2024 Apr 5;19(1):32.
- Deliyanti D, Talia DM, Zhu T, Maxwell MJ, Agrotis A, Jerome JR, et al. Foxp3+ Tregs are recruited to the retina to repair pathological angiogenesis. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-12.
- Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, et al. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol.* 2022 Aug 9;13:953691.
- Altmann C, Schmidt MHH. The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 1;19(1):110.
- Coughlin, B A, Feenstra D J MS. Müller Cells and Diabetic Retinopathy. *Vision Res.* 2017;139(1):93-100.
- Sasongko MB, Wong TY, Nguyen TT, Cheung CY, Shaw JE, Wang JJ. Retinal vascular tortuosity in persons with diabetes and diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2011 Sep;54(9):2409-16.
- Simó R, Bogdanov P, Ramos H, Huerta J, Simó-Servat O, Hernández C. Effects of the topical administration of semaglutide

Erenumab, fremanezumab i galcanezumab pel tractament de la migranya: anàlisi d'ús en la pràctica clínica habitual d'un hospital de tercer nivell

Maria Monté Monté

Graduada en Farmàcia per la Universitat de Barcelona.

Paraules clau:

Migranya

Erenumab

Fremanezumab

Galcanezumab

PHF

RPT

INTRODUCCIÓ

MIGRANYA I TRACTAMENT

La migranya és una cefalea primària incapacitant comú i el motiu neurològic de consulta més freqüent amb una prevalença l'any 2019 de 14.500 casos per 100.000 habitants arreu del món i de 18.400 casos per 100.000 habitants a Espanya. La migranya afecta aproximadament al 5-8% dels homes i al 15-20% de les dones¹⁻⁴.

Segons la classificació de la IHS (*International Headache Society*)¹, la migranya es pot dividir principalment en 3 subtipus, tot i que se'n deriven moltes més classificacions: la migranya sense aura, la migranya amb aura (aquestes dues catalogades com migranyes esporàdiques) i la migranya crònica.

El dolor migranyós s'origina per l'activació del sistema trigeminovascular (STV) que allibera pèptids vasoactius, com el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), especialment rellevant per la seva acció vasodilatadora i facilitadora de la nociïcepció, amb nivells elevats tant durant les crisis, com entre elles, en el cas de la migranya crònica^{5,6}.

El tractament de la migranya es basa en la detecció de factors desencadenants, tractament simptomà-

tic, tractament preventiu i control de la cronificació. El tractament simptomàtic redueix la intensitat del dolor i altres símptomes amb AINEs, analgèsics com metamizol i triptans per a crisis lleus o moderades. El tractament preventiu busca disminuir la freqüència de crisis i millorar la resposta al tractament, utilitzant medicaments com antiepilèptics (topiramàt), betablocadors (propranolol, metoprolol), antidepressius (amitriptilina) o toxina botulínica, d'entre altres, per a la migranya crònica^{7,8,9}. Recentment s'han incorporat els anticossos monoclonals erenumab, fremanezumab i galcanezumab, autoritzats en el tractament preventiu de la migranya en adults amb almenys 4 dies de migranya al mes. Pel que fa al seu mecanisme d'acció, l'erenumab, actua unint-se al receptor del CGRP, de manera que hi competeix de forma potent i específica. En canvi, el fremanezumab i el galcanezumab, s'uneixen directament al pèptid CGRP, inhibint així la seva activitat biològica^{6,8}.

Programa d'Harmonització Farmacoterapèutica

El Programa d'Harmonització Farmacoterapèutica (PHF), creat per garantir l'accés equitatiu als medica-

ments dins el Sistema Sanitari Integral d'Utilització Pública de Catalunya (SIS-CAT), gestionat pel CatSalut, avalua l'eficàcia, la seguretat i l'impacte econòmic dels medicaments, redacta recomanacions i estableix criteris d'ús harmonitzats. També promou mesures per a la implementació òptima i en fa el seguiment pressupostari, així com del compliment clínic i dels criteris establerts, retroalimentant el procés^{10,11}. Per gestionar i implementar el PHF, es van crear tres entitats principals: la Comissió Farmacoterapèutica per al SISCAT (CFT-SISCAT), el Consell Assessor de Medicació Hospitalària (CAMH) i el Consell Assessor de Medicació de l'Atenció Primària i Comunitària i Especialitzada (CAMAPCE)¹¹.

El Registre de Pacients i Tractaments dels Medicaments Hospitalaris de Dispensació Ambulatoria (RPT-MHDA) es va crear el 2011 per mesurar els resultats en salut mitjançant la recollida de dades sobre l'efectivitat i seguretat dels tractaments. Les dades es recullen en tres nivells: informació bàsica del pacient, variables clíniques d'inici i de seguiment fins a la finalització del tractament. Aquestes variables són consensuades dins PHF per assegurar una avaluació adequada^{11,12}. En el cas del tractament profilàctic de la migranya, el PHF inclou els anticossos erenumab, fremanezumab i galcanezumab, definint els criteris d'inici, seguiment i discontinuació del tractament, així com les variables clíniques requerides¹³.

OBJECTIUS

Aquest treball té com a principal objectiu caracteritzar la utilització dels medicaments biològics en els pacients amb diagnòstic de migranya crònica o episòdica d'alta freqüència a la pràctica clínica habitual a un hospital de tercer nivell. Així, es pretén:

- Descriure les característiques dels pacients amb tractament així com l'efectivitat en la pràctica clínica habitual de dades relativa a les variables d'inici i seguiment clínic requerides pel registre de pacients i tractaments MHDA del CatSalut amb relació a l'ús d'erenumab, fremanezumab i galcanezumab per al tractament profilàctic de la migranya.
- Analitzar el compliment dels criteris clínics d'inici i seguiment d'erenumab, fremanezumab i galcanezumab per al tractament profilàctic de la migranya establerts pel CatSalut.
- Analitzar els principals motius de discontinuació pels tractaments amb erenumab, fremanezumab i galcanezumab.
- Comparar els resultats obtinguts en l'ús d'erenumab, fremanezumab i galcanezumab procedents dels assajos clínics amb la pràctica clínica habitual.

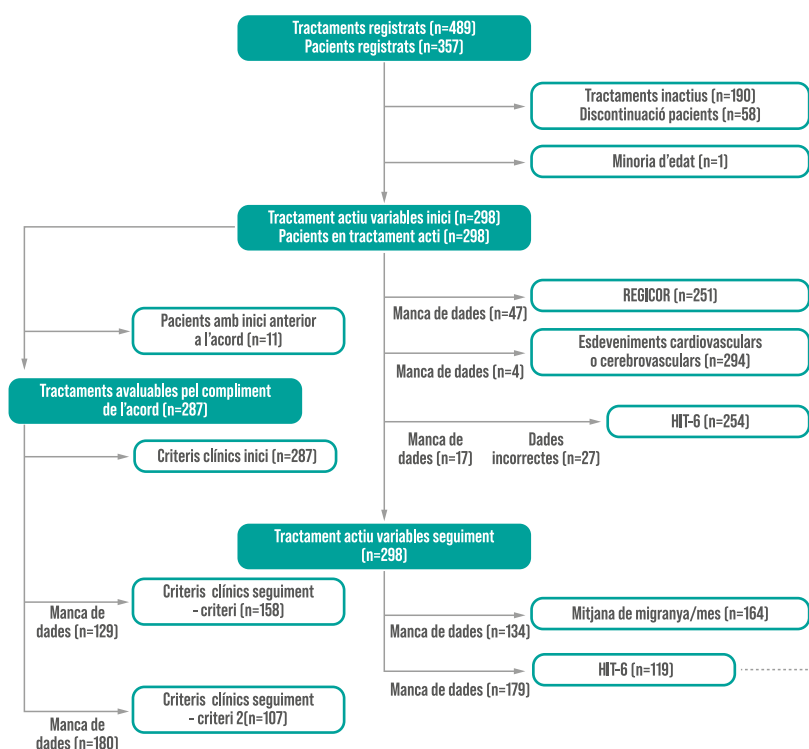
Es tracta d'un estudi transversal unicèntric dins d'un projecte més ampli multicèntric. La data de recollida de dades va ser el 30 de gener de 2023. L'estudi es va fer en l'àmbit hospitalari a l'Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Es van incloure tots els pacients amb diagnòstic de migranya que, en el moment de l'estudi, tenien prescrit activament un medicament biològic a la unitat d'atenció farmacèutica. També es van considerar dades sobre els tractaments finalitzats per analitzar les discontinuacions.

Les variables de l'estudi es van classificar en sociodemogràfiques (edat, sexe, i número de pacient); relatives a la malaltia (diagnòstic de migranya, data del diagnòstic, dies de migranya al mes durant els 3 mesos previs, i risc cardiovascular); relacionades amb els medicaments biològics (informació sobre el tractament (codi ATC, indicació, data d'inici i fi, metge prescriptor), tractaments profilàctics

MATERIALS I MÈTODES

Figura 1. Flux de pacients subjectes a estudi.



previs i concomitants (propranolol, metoprolol, topiramat, amitriptilina, toxina botulínica, altres), adherència a tractaments previs, risc cardiovascular aterotrombòtic (REGICOR), esdeveniments cardiovasculars o cerebrovasculars previs i escala HIT-6 (escala per mesurar l'impacte de la migranya en la vida diària)).

Pel tractament de les dades va dissenyar una base de dades amb el programa Excel per al registre de la informació. A la base de dades els pacients van tenir assignat un número correlatiu que va quedar descrit com a número d'estudi. Les característiques basals del pacient es van descriure en termes de nombre i percentatge per a les variables categòriques i de mitjana i desviació estàndard, o mitjana i rang interquartílic, per a les variables contínues, depenent de les distribucions.

RESULTATS

Es van analitzar les dades extremes el 30 de gener de 2023 sobre l'ús d'erenumab, fremanezumab i galcanezumab per al tractament profilàctic de la migranya, seguint els criteris del Registre MHDA i l'acord de la CFT-SIS-CAT¹³. Es van incloure 489 tractaments de 357 pacients, excloent-ne 1 per edat inferior a 18 anys. 58 pacients havien discontinuat el tractament, i 298 tractaments eren actius per a l'estudi de variables clíniques d'inici i de seguiment. D'aquests, el 89,6% (n=267) eren dones, amb una mitjana d'edat de 48,1 anys. El 72,5% (n=216) estaven en tractament amb fremanezumab, el 18,8% (n=56) amb erenumab i el 8,7% (n=26) amb galcanezumab.

Dades d'inici

La mitjana de dies de migranya/mes durant els 3 mesos previs a l'inici del tractament considerant una n=298 pacients va ser d' 11,6 (5,8). El 80,2% (n=239) dels pacients va patir més de

8 migranyes al mes, els 3 mesos previs a l'inici del tractament.

El tractament profilàctic previ i concomitant més freqüent va ser la toxina botulínica en un 81,2% (n=242) i 26,8% (n=80), respectivament. L'adherència a tractaments previs va ser del 89,9% (n=268).

En l'estudi del risc cardiovascular aterotrombòtic calculat amb REGICOR un 98,3% (n=246) van presentar un risc cardiovascular baix (inferior a 5%). El 95,9% (n=282) no van presentar esdeveniments cardiovasculars o cerebrovasculars previs.

La mitjana de les puntuacions en l'escala HIT-6 va ser de 67,0 (6,0). El 95,7% (n=243), va patir un impacte important amb una puntuació superior a 55 punts. Pels pacients tractats amb fremanezumab, erenumab i galcanezumab aquest percentatge va ser del 96,9%, 93,8% i 95,5%, respectivament.

Dades de seguiment

La mitjana de dies migranya al mes al cap de 3 mesos des del primer registre va ser de 5,4 (4,8), si es compara

amb el de l'inici que va ser d'11,7 (5,9), s'obté una diferència de -6,3 (6,5) migranyes/mes. A més, el 75,6% dels pacients (n=124) va presentar menys de 8 migranyes/mes. Pels pacients tractats amb fremanezumab, erenumab i galcanezumab aquest percentatge va ser de 76,2% (n=93), 75,8% (n=25) i 66,7% (n=6), respectivament.

La mitjana de les puntuacions de l'escala HIT-6 al seguiment al cap de 3 mesos va ser de 58,9 (8,5), si es compara amb l'inici, que va ser de 66,2 (6,3), la diferència és de -7,3 (9,8) punts. El 67,2% (n=80), va patir un impacte important amb una puntuació superior a 55 punts. Pels pacients tractats amb fremanezumab, erenumab i galcanezumab aquest percentatge va ser del 71,1% (n=64), 52,2% (n=12) i 60,0% (n=3), respectivament.

Motius de discontinuació

Els motius principals de discontinuació van ser la pèrdua de resposta (67,7%), toxicitat inacceptable (9,0%) i la decisió del pacient (5,3%). Altres causes inclouen

Taula 1. Compliment dels criteris clínics d'inici segons tipus d'anticòs.

	Fremanezumab (n=214)	Erenumab (n=48)	Galcanezumab (n=25)
Igual o més de 8 migranyes/mes	168 (78,5%)	41 (85,4%)	20(80,0%)
No han respost a almenys 3 classes diferents de tractaments profilàctics	126 (58,9%)	38 (79,2%)	17(68,0%)
Han estat adherents a tractaments preventius previs	193 (90,2%)	44 (91,7%)	22(88,0%)
Total complidors de l'acord	104 (48,6%)	30 (62,5%)	12(48,0%)

Taula 2. Compliment dels criteris clínics de seguiment segons tipus d'anticòs.

	Anticòsos monoclonals (n=107)					
	Fremanezumab		Erenumab		Galcanezumab	
	(n=85)		(n=18)		(n=4)	
Complidors (Reducció migranya ≥50%)	Si	No	Si	No	Si	No
	61 (71,8%)	24 (28,2%)	11 (61,1%)	7 (38,9%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)
	(n=24)		(n=7)		(n=3)	
Complidors (Reducció migranya ≥ 50% i disminució HIT-6)	Si	No	Si	No	Si	No
	3 (12,5%)	21 (87,5%)	0 (0,0%)	7 (100,0%)	0 (0,0%)	3(100,0%)
Total complidors de l'acord	64 (75,3%)	21 (24,7%)	11 (61,1%)	7 (38,9%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)



la pèrdua de seguiment (4,2%), embaràs i trasllat (3,2% cadascun), manca d'adherència (1,6%) i comorbiditats o interaccions (0,5%). També es van registrar altres motius (5,3%), com la remissió (experimentada per 5 pacients), empitjorament de la malaltia, mala tolerància i un cas d'anèmia hemolítica amb insuficiència renal aguda.

Compliment dels criteris de l'acord

Un 50,9% (n=146) dels pacients complia els criteris d'inici de tractament. Un 79,8% (n=287) presentava migranya episòdica o crònica amb més de 8 migranyes/mes. Un 90,2% (n=259) complia el criteri d'adherència als tractaments previs, i un 63,1% (n=181) no havia respost a almenys tres classes de tractaments preventius. En termes de tractament amb anticossos, el 48,6% (n=104) dels pacients tractats amb fremanezumab, el 62,5% (n=30) amb erenumab, i el 48,0% (n=12) amb galcanezumab complien aquests criteris. Cap pacient presentava un risc cardiovascular elevat amb una puntuació al REGICOR superior al 10%, tot i que 11 pacients amb antecedents cardiovasculars van rebre tractament inadequadament.

Pel que fa als criteris de seguiment, el 68,2% (n=73) va reduir els dies de

migranya en un 50% o més. Segons l'acord, els pacients que no compleixen aquest primer criteri, que són un total de n= 34 (31,8%), es pot considerar també que presenten resposta al tractament si pateixen una migranya amb impacte important, amb un HIT-6>55, i redueixen en un 30% o més els dies de migranya al mes i disminueixen la discapacitat amb almenys una categoria en l'escala HIT-6. Així, un 71,1% (n=76) dels pacients avaluats va presentar una resposta adequada al tractament.

DISCUSSIÓ

Un 89,6% dels pacients amb migranya en l'RPT eren dones, una dada esperada ja que la migranya afecta més les dones (16%) que els homes (7%)⁴. A més, l'edat mitjana dels pacients inclosos era de 48,1 anys, que coincideix amb l'edat on la malaltia és més prevalent⁶. El fremanezumab va ser el més utilitzat (72,5%) degut probablement a la seva posologia trimestral més còmode per al pacient^{6,8}.

Un 80,2% dels pacients patia més de 8 dies de migranya al mes abans del tractament, i un 3,02% ja havia provat altres anticossos monoclonals. Els tractaments concomitants més fre-

qüents van ser la toxina botulínica, el topiramà i l'amitriptilina, que són els que presenten una eficàcia superior en la reducció del nombre de cefalees/mes⁶ que és de -2 (-2,8 a -1,1), -1,1 (-1,9 a -0,7) i -1,2 (-1,7 a -0,8), respectivament.

L'adherència als tractaments va ser positiva en un 89,9% (n=298) dels casos, i el risc cardiovascular moderat només es va observar en l'1,3% (n=5) dels pacients mentre que el 4,2% (n=12) havia patit esdeveniments cardiovasculars o cerebrovasculars previs. El 95,7% (n=243) va mostrar un impacte significatiu de la migranya segons l'escala HIT-6, amb puntuacions superiors a 55. En canvi, el 4,3% (n=11) va obtenir una puntuació inferior a 55, i d'aquests, 10 pacients havien estat tractats prèviament amb un altre anticòs monoclonal, cosa que podria explicar les seves puntuacions més baixes.

Les dades de seguiment dels pacients s'han analitzat únicament després de 3 mesos de tractament amb fremanezumab, erenumab o galcanezumab, observant-se una reducció mitjana de 6,3 dies de migranya al mes i una disminució de 7,3 punts en la discapacitat mesurada per l'escala HIT-6. Un 62,4% (n=102) dels pacients podria considerar la discontinuació del tractament per remissió de la migranya segons els criteris de l'acord⁶. Un total de 5 pacients van experimentar una remissió completa. El compliment dels criteris de l'acord del PHF va ser del 50,9% (n=146) per als criteris d'inici i del 71,0% (n=76) per als criteris de seguiment, valors similars als observats en altres tractaments del PHF, com el de l'asma greu no controlada¹⁴, sent en aquest cas del 63,5% (n=255) i del 61,6% (n=168) segons el tipus d'anticòs.

La comparació entre els resultats del RPT i els assajos clínics aleatoritzats (ACA) per fremanezumab, erenumab i galcanezumab s'ha basat en els estudis

Taula 3. Paral·lelismes de l'RPT amb els assajos clínics segons anticòs monoclonal

Fremanezumab					Erenumab				Galcanezumab		
	HALO EM		HALO CM		RPT	20120295		RPT	REGAIN		RPT
Dosi (mg/mes)	225/ 225/ 225	675/ PBO/ PBO	675/ 225/ 225	675/ PBO/ PBO	-	70	140	-	120	240	-
Pacients (n)	290	291	379	376	122 1	191	190	33 1	278	277	9 1
					85 2			18 2			4 2
					90 3			-			-
Edat (anys)	18-70	18-70	18-70	18-70	18-76	18-65	18-65	27-78	18-65	18-65	22-69
Reducció DMM 1	-3,7	-3,4	-	-	-6,2	-6,6	-6,6	-7,6	-4,8	-4,6	-3,7
Reducció ≥ 50% migranya/ mes (%) 2	47,7	44,4	37,6	40,8	71,8	39,9	41,2	61,1	27,6	27,5	25,0
Reducció HIT-6 (punts) 3	-	-	-6,4	-6,8	-7,4	-	-	-	-	-	-

inclosos en l'informe tècnic del PHF⁶. Fremanezumab i erenumab van registrar una reducció superior en els dies de migranya al mes (DMM) en el RPT (-6,2 i -7,6, respectivament) en comparació amb els ACA (-3,7 i -3,4 per al fremanezumab, -6,6 per a l'erenumab). Tanmateix, el galcanezumab va obtenir una reducció menor en el RPT (-3,7) comparat amb els ACA (-4,8 i -4,6). Pel que fa a la reducció de la migranya $\geq 50\%$, el fremanezumab i l'erenumab també van mostrar millors resultats en el RPT (71,8% i 61,1%, respectivament) en comparació amb els ACA (47,7% i 44% pel fremanezumab i 39,9% i 41,2% per l'erenumab), mentre que el galcanezumab va obtenir un resultat inferior (25,0%) respecte als ACA (27,6% i 27,5%). Quant a la reducció en l'escala HIT-6, el fremanezumab va presentar una disminució superior en

el RPT (-7,4) en comparació amb els ACA (-6,4 i -6,8).

CONCLUSIONS

- Dels 298 pacients en tractament actiu, el fàrmac més utilitzat va ser el fremanezumab en el 72,5% dels casos, majoritàriament dones de 48 anys de mediana.
- Els anticossos monoclonals van ser efectius, amb una reducció de -6,3 migranyes/mes i -7,3 punts a l'escala HIT-6 en els 3 mesos posteriors a l'inici de l'estudi.
- 58 pacients havien discontinuat el tractament en el moment de l'extracció de les dades sent la pèrdua de resposta el motiu més freqüent (67,7%).
- El compliment dels criteris clínics d'inici i de seguiment establerts ha

estat del 50,9% i del 71,0%, respectivament.

- La reducció dels DMM i la reducció $\geq 50\%$ migranya/mes ha estat superior en l'RPT comparada amb l'ACA en el cas de fremanezumab i erenumab.
- La reducció de l'escala HIT-6 ha estat superior en l'RPT en comparació amb l'ACA en fremanezumab.
- Caldria un període de seguiment més ampli per acabar de confirmar les dades d'efectivitat dels fàrmacs estudiats i la possibilitat d'augmentar la discontinuació dels tractaments amb criteris de remissió.
- Seria d'interès conèixer els percentatges de seguiment de l'acord globals a nivell de Catalunya per valorar la necessitat d'accions dirigides per millorar l'ús d'aquests fàrmacs en el centre estudiat. ■

Bibliografia

1. Headache Classification Committee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. Cephalgia [Internet]. 2018 [consultat 28 desembre de 2022]; 38(1): 1-121. Disponible a: https://ihs-headache.org/wp-content/uploads/2020/05/3559_ichd-3-spanish.pdf
2. Galvez-Sánchez CM, Montoro Aguilar CI. Migraine and Neuroticism: A Scoping Review. Behav Sci (Basel). 2022;12(2):30. doi: 10.3390/bs12020030
3. Global Burden of Disease (GBD) Compare [Internet]. Washington: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). 2019. [consultat 28 desembre de 2022]. Disponible a: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#0>.
4. Sociedad Española de Neurología (SEN). Manual de Práctica Clínica en Cefaleas. Recomendaciones Diagnóstico-Terapéuticas de La Sociedad Española de Neurología [Internet]. 2020; Madrid [consultat 30 desembre 2022]. Recuperat de: <https://www.sen.es/pdf/2020/ManualCefaleas2020.pdf>
5. Santos S, Belvis R, Cuadrado ML, Díaz S, Gago A, Guerrero AL, et al. Calcitonin gene-related peptide in migraine: from pathophysiology to treatment. Neurologia. 2022; 37 (5): 390-402. doi: 10.1016/j.nrl.2019.03.013.
6. Programa d'harmonització farmacoterapèutica. Erenumab, fremanezumab i galcanezumab per al tractament profilàctic de la migranya [Internet]. 2020 [consultat 3 gener 2023]. Disponible a: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/4725.2/erenumab_fremanezumab_galcanezumab_tractament_profilactic_migranya_2020.pdf?sequence=5&isAllowed=y.
7. Societat Catalana de Neurologia. Protocol de diagnòstic i tractament de la cefalea [Internet]. 2019 [citat 30 desembre 2022]. Recuperat de: https://www.sneurologia.cat/wp-content/uploads/2019/07/Guia-CEFALEES_Societat-Catalana-de-Neurologia_Actualització-2019_DEF.pdf.
8. Cuadrado E, Garrido G, Marrero P. Tractament de la migranya en adults: de la crisi a la profilaxi. Butll Inf Ter. 2019; 30(5): 26-32.
9. Gómez Lluch MT, De la Calle Riaguas B. Abordaje terapéutico de la migraña. Bol Farmacoter Cast Manch. 2021; 22(2):1-10.
10. Roig M, Prat MA, Gorgas MQ, Pontes C. Registro de pacientes y tratamientos de medicamentos hospitalarios en Cataluña: 10 años de datos clínicos. Med Clin (Barc). 2020; 154(5): 185-191. doi: 10.1016/j.medcli.2019.09.009.
11. CatSalut. Instrucció 05/2017. Programa d'harmonització farmacoterapèutica del CatSalut [Internet]. 2017 [consultat 4 gener 2023]. Disponible a: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/2965/catsalut_instruccio_05_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y
12. CatSalut. Instrucció 01/2011. Criteris i condicions per a l'adequació de la indicació i condicions d'utilització de medicaments d'acord amb els informes dels comitès d'experts. Registre i seguiment clínic. Verificació i acreditació de les condicions de provisió i finançament [Internet]. 2011 [consultat 4 gener 2023]. Disponible a: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/1329/catsalut_instruccio_01_2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y
13. Servei Català de la Salut. Acord de la Comissió Farmacoterapèutica per al Sistema sanitari integral d'utilització pública de Catalunya (CFT-SISCAT) del CatSalut sobre l'ús d'erenumab, fremanezumab i galcanezumab per al tractament profilàctic de la migranya [Internet]. Barcelona; 2020. [consultat 7 gener 2023]. Disponible a: https://catsalut.gencat.cat/web/.content/minisite/catsalut/proveidors_professionals/medicaments_farmacia/harmonitzacio/informes/_compartits/migranya/acord-CFT-SISCAT-Fbiologics-migranya.pdf
14. Servei Català de la Salut. Informe de resultats d'omalizumab, mepolizumab, reslizumab i benralizumab per al tractament de l'asma greu no controlada en pacients adults [Internet]. 2021. [consultat 27 abril 2023]. Disponible a: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/6461/omalizumab_mepolizumab_reslizumab_benralizumab_tractament_asma_greu_no_controlada_pacients_adults_2021.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Tractament del càncer de mama en pacients embarassades mitjançant la utilització de doxorubicina encapsulada en nanopartícules

INTRODUCCIÓ

S'estima que el càncer afecta 1 de cada 1000 a 1500 embarassos. No obstant, aquesta incidència està creixent donat l'augment d'edat gestacional de les dones¹. A causa de la potencial toxicitat dels tractaments actuals per al fetus, les pacients embarassades experimenten una limitació important de les seves opcions terapèutiques. D'entre totes, la cirurgia és l'únic tractament recomanat durant tot l'embaràs². La quimioteràpia només està indicada entre el segon trimestre i les setmanes prèvies al part. S'administra únicament a pacients que pateixen una progressió agressiva, on el benefici és superior al risc d'exposició del fetus als fàrmacs³. En cas contrari, es prefereix retardar el tractament farmacològic fins després del part. Això exposa a les pacients a una lliure proliferació del tumor fins a etapes més avançades de la malaltia, fent que el tractament hagi perdut efectivitat en el moment que s'administra^{3,4}. A part de la toxicitat intrínseca d'aquests fàrmacs, un altre risc associat és el retràs del creixement intrauterí⁵. Això representa un risc significatiu per al fetus, ja que sovint provoca un part prematur o un baix pes en néixer. Dues condicions que, a la vegada, augmenten la probabilitat de desenvolupar malalties no transmissibles en el futur⁶. Per això, és d'alta importància la recerca de tracta-

ments dirigits, que siguin més eficaços sense causar toxicitat ni al fetus ni a la mare.

Els sistemes d'administració de fàrmacs es presenten com a una solució per a reduir els efectes secundaris de la quimioteràpia. Al llarg dels anys, han demostrat ser eficaços en millorar la seguretat i l'eficàcia dels fàrmacs, dirigint-los cap a la diana terapèutica i evitant la seva acumulació en teixits sans⁷. En teràpies oncològiques, les nanopartícules polimèriques (NP) són un dels possibles sistemes a utilitzar per a l'encapsulació dels fàrmacs. Es constitueixen de polímers biocompatibles i biodegradables, que poden ser metabolitzats i eliminats completament per l'organisme, prevenint-ne la seva acumulació i evitant qualsevol toxicitat associada. A més, l'augment de permeabilitat capil·lar en la regió tumoral permet l'acumulació d'aquestes teràpies en el tumor sense la necessitat d'incorporar una vectorització específica^{7,8}. S'han descrit diversos sistemes d'alliberament de la doxorubicina (DOX) en bibliografia incloent liposomes, exosomes i NP, entre d'altres⁹. Tanmateix, molt pocs estudien el seu pas transplacentari, fet que cal avaluar per a garantir la seguretat en el tractament de les pacients embarassades¹⁰. Davant aquest paradigma, l'objectiu d'aquest treball ha sigut desenvolupar i implementar una estratègia efectiva i segura per establir les bases de futurs tractaments

Maria Gil-Vives

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).
Blanquerna Facultat de Ciències de la Salut, Universitat Ramon Llull (URL).

Carles Bofill-Bonet

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Marta Hernández

Blanquerna Facultat de Ciències de la Salut, Universitat Ramon Llull (URL).

Cristina Fornaguera

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Paraules clau:

Nanopartícules

Doxorubicina

Càncer de mama

Emulsió

Àcid poli(làctic- co-glicòlic)

S'ha demostrat per primera vegada l'efecte de diferents concentracions d'electròlits sobre les propietats de nanopartícules formulades mitjançant el sistema de doble nano-emulsió.

del càncer durant l'embaràs, basats en sistemes d'alliberament controlat del fàrmac quimioterapèutic, amb l'objectiu d'optimitzar l'eficàcia dels tractaments mentre s'assegura el desenvolupament sa dels nounats.

EXPERIMENTAL

Materials i línies cel·lulars

Resomer® RG 502H, acetat d'etil, Tween 80, TritonX100, Pluronic F127®, DOX, DMEM, L-glutamina, Penicil·lina/estreptomicina, Trypsin-EDTA, sacarina, DMSO, NBF, Fluoromount® (Sigma-Aldrich). DPBS 10X, DAPI, Red Cell Mask® (Thermo-Fischer). FBS (Avantor). MTT (Gibco).

Les cèl·lules 4T1 i iMAECs es van adquirir d'ATCC i d'un col·laborador²⁰, respectivament. Ambdues es van mantenir en DMEM suplementat amb 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de Penicil·lina-Estreptomicina i 1% (v/v) de L-glutamina. Es van cultivar a 37 °C, amb 5% de CO₂ i 95% d'aire atmosfèric fins al 80% de confluència.

Mètodes

Estudi de la solubilitat i dimerització de la DOX:

Quantitats conegudes de DOX es van pesar en una balança analítica (Sartorius®). A cadascuna d'elles, es va afegir el volum mínim necessari de diferents solucions salines fins a la seva dis-

solució i es va analitzar visualment. La DOX dissolta en solucions aquoses amb diferents concentracions d'electròlits es va mesurar amb un dispersor de llum dinàmic (DLS, ZetaSizer NanoZS, de Malvern Co. Ltd., Regne Unit), equipat amb un làser de llum vermella He-Ne ($\lambda = 633$ nm). La taxa de recompte derivada es va representar com a intensitat (unitats arbitràries), a 90°, i 25°C.

Preparació de nano-emulsions i NP polimèriques:

Les emulsions plantilla d'aigua₁-enoli-en-aigua₂ ($W_1/O/W_2$) es van formular mitjançant el mètode d'homogeneïtzació a alta velocitat seguit del mètode de composició per inversió de fases (PIC). Primer, es va formar la nanoemulsió inversa W_1/O [DOX en solució aquosa (W_1 , 10%pv) / 1%pv Pluronic F-127® com a tensioactiu (S_1) i 4%pv PLGA en acetat d'etil (O , 90%pv)] amb un homogeneïtzador de rotor-estator a alta velocitat. La DOX es va dissoldre a la concentració màxima de solubilitat. Ambdues fases (W_1 i O) es van homogeneïtzar durant 2 minuts a 30.000 rpm utilitzant l'Ultra-Turrax® T-10 Basic (IKA, Alemanya). Immediatament, es va barrejar l'emulsió amb Tween 80®, preparant l'emulsió O/W_2 [7,78% (W_1/O) / 0,88% Tween 80® (S_2) / en solució aquosa 91,34% (W_2)] afegint gota a gota W_2 . Les nanoemulsions es van preparar amb set concentracions diferents d'electròlits. Un cop preparades, es va deixar evaporar el disolvent orgànic durant 24 h a temperatura ambient (25 °C) amb agitació constant (200 rpm), permetent la formació de NP mitjançant el mètode d'evaporació del dissolvent¹¹.

Determinació del diàmetre hidrodinàmic i l'índex de polidispersió i la càrrega superficial:

El diàmetre hidrodinàmic mitjà de les gotes de nanoemulsió i de les NP es va determinar mitjançant DLS (ZetaSizer NanoZS, de Malvern Co. Ltd., Regne Unit), equipat amb un làser de

llum vermella He-Ne ($\lambda = 633$ nm). Les mesures es van realitzar sense diluir les mostres (70 μ L), a un angle de dispersió de 173°, a una temperatura constant de 25 °C, i amb 30 repeticions per rèplica. Les dades es van tractar amb anàlisi de cumulants. El potencial zeta (ζ) es va calcular a partir de la mobilitat electroforètica aplicant l'equació de Smoluchowski^{11,21,22}. Les mostres es van diluir 1:1 amb solucions aquoses que presentaven la mateixa concentració d'electròlits.

Determinació estructural per Cryo-TEM:

La microscòpia electrònica de transmissió per criogenització (cryo-TEM) es va utilitzar per caracteritzar la mida i la forma de la dispersió de NP en la condició més representativa (2,5 mM de PBS tant per a NP carregades com no carregades) usant un Jeol 1400.

Determinació de l'eficiència d'encapsulació:

L'eficiència d'encapsulació (EE) de la DOX en les NP (NPs) es va determinar mitjançant el mètode d'ultrafiltració, utilitzant Amicon® Ultra de 0.5 mL - 50K (Merck Millipore, EUA). A continuació, les mostres es van mesurar per espectrofotometria utilitzant el lector de plaques Infinity® M Plex (Tecan), a la longitud d'ona d'excitació de la DOX ($\lambda = 485$ nm). Els resultats es van expressar com el percentatge %pv de la quantitat total de DOX carregada per a l'eficiència d'encapsulació (EE), aplicant la fórmula: $EE(\%) = [(DOX_{total} - DOX_{lliure}) / DOX_{total}] \cdot 100\%$

Determinació de la citotoxicitat per anàlisi MTT:

La viabilitat cel·lular es va avaluar mitjançant l'assaig colorimètric de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (protocol modificat dels protocols GTA-1/2 de la cascada d'assajos NCL)²³. Es van avaluar dues línies cel·lulars: 4T1 i iMAECs, seguint els protocols habituals de la bibliogra-

fia¹⁶.

Determinació de la hemòlisi:

La hemocompatibilitat es va avaluar mitjançant un assaig de hemòlisi amb glòbuls vermells, proporcionats amablement pel Banc de Sang i Teixits (protocols ètics aprovats CER_URL_2019_2020_016 i 200039) seguint protocol habitual¹⁶.

Estudis de localització subcel·lular:

La captació de DOX i de NPs carregades amb DOX es va avaluar aprofitant les propietats fluorescents de DOX ($\lambda_{\text{excitació}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissió}} = 590 \text{ nm}$) en la línia cel·lular 4T1. Les cèl·lules es van fixar amb solució de formalina (10%vv) i es va permeabilitzar la membrana cel·lular amb 0,1%vv de Triton-X durant 20 minuts. Per ténir la membrana cel·lular, es van treure els portaobjectes i es va afegir una gota de DAPI (1:10.000) per ténir els nuclis, juntament amb una gota de Red Cell Mask (1:1.000) per ténir la membrana cel·lular. Es van aplicar tres esbandides amb tampó i finalment, es van fixar els cobreobjectes amb Fluoromount®. Les cèl·lules es van observar amb un microscopi de fluorescència confocal de làser (Leica SP8) amb làsers d'Argon i He-Ne acoblats al microscopi invertit DMI 6000. La localització subcel·lular de la DOX es va calcular comparant la determinació del senyal fluorescent entre els nuclis i el citoplasma ($n=6/\text{cèl·lula}$). A continuació, els resultats es van comparar amb la citometria de flux i es va establir el coeficient de Pearson.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La concentració d'electròlits en el medi influeix en les propietats fisicoquímiques de les NPs

Les NP preparades amb DOX i sense, van presentar un diàmetre hidrodinàmic entre 200 i 350 nm, excepte per a una concentració d'electròlits 0.5 mM, que van resultar en mides micromètriques. El diàmetre real, estu-

diat per Cryo-TEM, va resultar menor (Figura 1). Un altre fenomen observat va ser l'augment de l'índex de polidispersitat (Pdl), que reflecteix l'índex d'heterogeneïtat de la població, per a les NP carregades amb DOX a elevades concentracions d'electròlits. Per tant, amb les excepcions esmentades, les NP es van considerar com a bones candidates pels estudis de biocompatibilitat.

L'avaluació de la càrrega superficial va revelar un valor negatiu per a totes les NP no carregades, tal i com s'esperava degut a les terminacions carboxil·liques del PLGA.

A més, es va observar un augment de càrrega amb l'augment de concentració d'electròlits en el medi, fet que ja s'havia observat per a les NP preparades a partir d'una emulsió simple¹¹. La incorporació de DOX també va resultar en un augment de la càrrega. D'aquesta manera, les NP carregades amb DOX, preparades a una elevada concentració d'electròlits, van presentar una càrrega propera a 0, adequada per a poder controlar selectivament la seva interacció cel·lular.

Totes les NP carregades amb DOX van mostrar una eficàcia d'encapsulació igual o superior al 50%, amb un valor màxim del 66.5% per a les NP preparades a concentració 0 mM d'electròlit. Així doncs, la eficàcia d'encapsulació obtinguda en aquest estudi va ser similar a la d'altres estudis encapsulant DOX mitjançant el mètode de la doble nanoemulsió¹²⁻¹⁵.

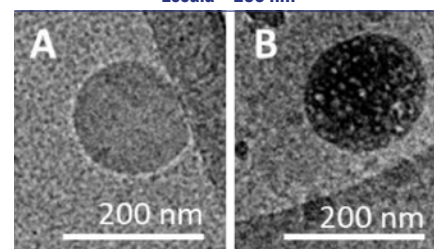
L'avaluació de les propietats fisicoquímiques de les NP va permetre validar el mètode de la doble nanoemulsió com a adequat per a la preparació de NP polimèriques carregades amb DOX a diferents concentracions d'electròlits. A més, estudis complementaris van demostrar que les NP mantenien les seves propietats després de ser liofilitzades per al seu emmagatzematge¹⁶.

Les NP polimèriques prevenen la dimerització de la DOX

Durant l'estudi de solubilitat de la DOX a diferents concentracions d'electròlits, es va observar que la solubilitat disminuïa dràsticament a major concentració d'electròlits (Figura 2). Aquest fenomen ja s'havia descrit prèviament en literatura, i s'atribuïa a la formació de dímers de DOX a concentracions fisiològiques d'electròlits que resultaven en la precipitació del fàrmac^{17,18}. L'estudi de dimerització es va realitzar basat en l'equació Rayleigh-Gans-Debye per a cada una de les dissolucions¹⁹. Utilitzant tècniques de dispersió de la llum, es va analitzar la intensitat del senyal emesa per cada mostra, que augmenta proporcionalment amb la dimerització. L'anàlisi es va fer per a la DOX lliure i les NP carregades amb fàrmac, a cada una de les concentracions d'electròlit.

Els valors de l'anàlisi van revelar que la intensitat del senyal, tant del fàrmac lliure com les NP, augmentava amb la concentració d'electròlits NP. Revelant així que la dimerització era directament proporcional a la concentració d'electròlits. Tanmateix, es va observar que la proporció de DOX dimeritzada a mateixa concentració d'electròlits era menor en les mostres de NP. Indicant que la formulació de DOX en NP era eficaç per a prevenir la seva dimerització. Aquest fet pot tenir gran repercussió en la clínica ja que la formació de dímers i per tant, d'agregats, impedeix la internalització cel·lular del fàrmac disminuint la seva eficàcia¹⁸.

Figura 1. Micrografies de Cryo-TEM d'una nanopartícula no carregada amb doxorubicina (A - 173 nm) i una nanopartícula carregada amb doxorubicina (B - 188 nm). Escala = 200 nm



Les NP carregades amb DOX són biocompatibles i aptes per a l'administració intravenosa

La determinació de la concentració mínima inhibidora (IC50) va revelar que la DOX era més tòxica per a les cèl·lules tumorals (4T1, com a

model de càncer de mama) que per a les cèl·lules control (iMAEC, com a model de cèl·lules epitelials). Fet que es pot explicar pel major metabolisme de les cèl·lules tumorals i conseqüentment, de la major internalització de fàrmac. Es va demostrar biocompatibilitat per a les NP prepa-

rades a concentracions baixes i mitges d'electròlits (0 mM a 5 mM). En canvi, les NP preparades a concentracions de 7.5 mM i 10 mM van resultar tòxiques degut a la gran quantitat de polímer introduït per arribar a la dosi de DOX establerta. Tenint en compte aquest factor, es van considerar les NP com a generalment segures i es va procedir a l'avaluació de la hemocompatibilitat.

Ambdós tipus de NP, amb i sense DOX, preparades a concentracions d'electròlit de 0 mM a 5 mM van resultar hemocompatibles a concentracions terapèutiques (0.01 μ M) (Figura 3). Les NP preparades a concentracions 7.5 mM i 10 mM van resultar en condicions hiperosmòtiques, causant toxicitat (>2%). De la mateixa manera, les NP a concentracions superiors que la terapèutica (0.1 μ M, 1 μ M), van causar hipersomolalitat.

Tot plegat, les proves de biocompatibilitat van demostrar que les NP carregades amb DOX, preparades a concentracions d'electròlits de 0 mM a 5 mM, són biocompatibles i hemocompatibles. Per tant, són aptes per a l'administració intravenosa en futurs estudis preclínic.

Les NP permeten augmentar l'eficàcia d'internalització cel·lular de la DOX

El darrer pas de validació de la teràpia va ser avaluar la eficàcia d'internalització de les NP carregades amb DOX respecte el fàrmac lliure. Els resultats de la microscòpia confocal van revelar que les NP carregades amb DOX aconseguen acumular fàrmac principalment en el nucli (Figura 4). En canvi, el fàrmac lliure tendia a acumular-se en el citoplasma. Els resultats de la citometria de flux van demostrar que l'acumulació nuclear era major per a les NP que el fàrmac lliure, sent les condicions a concentració d'electròlit 0 mM, les que presentaven major diferència

Figura 2. Aspecte visual de les dissolucions de DOX i NP carregades amb DOX a diferents concentracions d'electròlit.

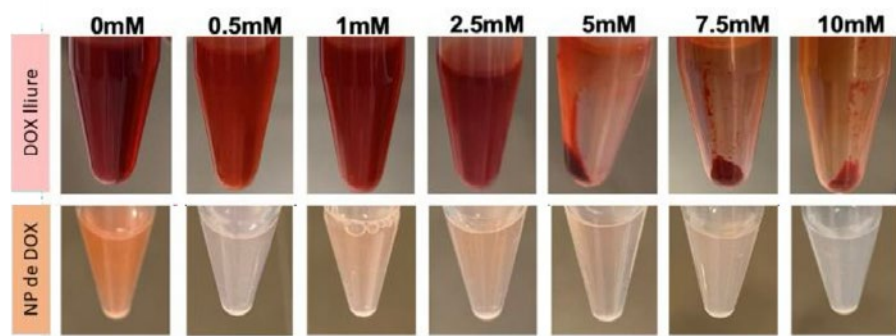


Figura 3. Imatges representatives de l'hemòlisi.

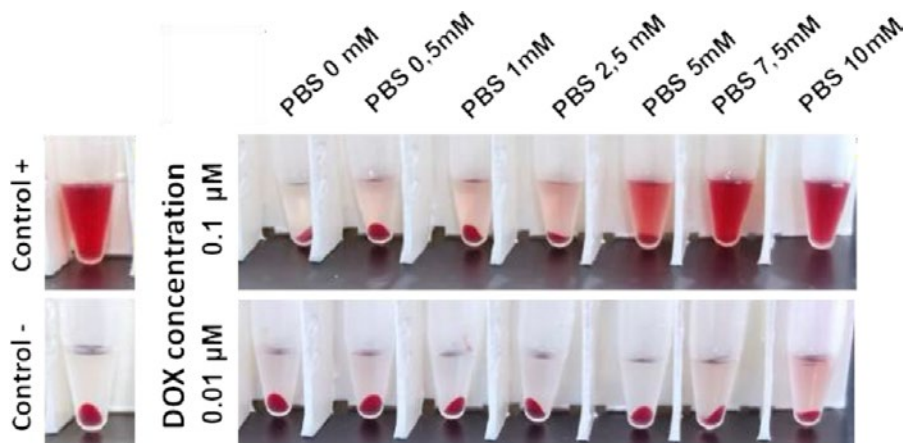
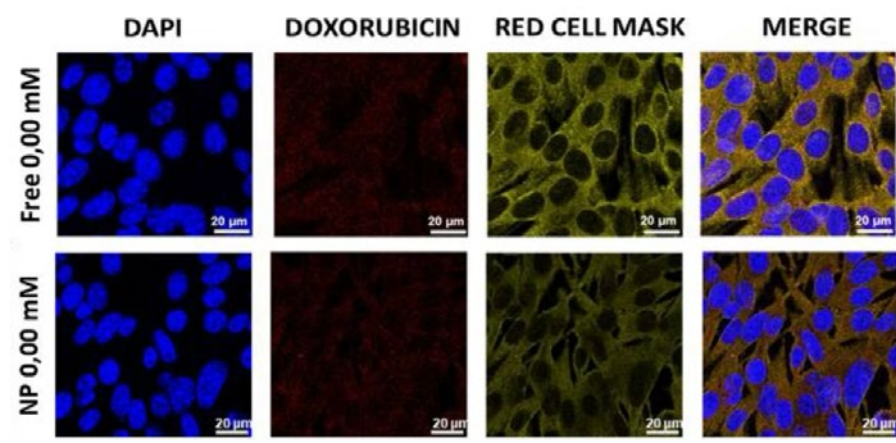


Figura 4. Micrografies de microscòpia confocal de internalització de doxorubicina lliure i en NP a concentració d'electròlits 0.0 mM en cèl·lules 4T1. Escala = 20 μ m.



d'internalització. A més, ambdós tècniques van demostrar un augment de la internalització a major concentració d'electròlits.

CONCLUSIÓ

En conclusió, es demostra per primera vegada l'efecte de diferents concentracions d'electròlits en les fases aquoses dels sistemes de doble nano-emulsió sobre les propietats de les NP formulades. En conjunt, s'observa un efecte sobre la capacitat de càrrega i solubilitat del

fàrmac, així com la biocompatibilitat i la capacitat d'internalització nuclear. Les NP preparades a concentracions d'electròlits 0 mM, 2.5 mM i 5 mM presenten la major biocompatibilitat, hemocompatibilitat i capacitat d'internalització. En resum, s'ha aconseguit desenvolupar una prova de concepte satisfactòria per a NP carregades amb DOX, que caldrà validar a través de subseqüents estudis preclínics amb models de barrera placentària abans de poder arribar a les pacients oncològiques embarassades.

AGRAÏMENTS

Agrair el suport de les companyes i companys del Grup d'Enginyeria de Materials (GEMAT), Institut Químic de Sarrià (IQS, URL). CFP agraeix el finançament de la Agència Estatal de Investigación, AGAUR-Generalitat de Catalunya i Cost Action. MGv agraeix el finançament de l'Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC) a través de la beca Pràctiques de Laboratori estiu 2023, i el Col·legi de Farmacèutics de Barcelona (COFB) pel Premi al Millor Treball de Fi de Grau 2023.

Bibliografia

1. Albright CM, Wenstrom KD. Malignancies in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 May;33:2-18.
2. National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®). NCCN Clinical practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. 2022 Jun 21;
3. Zubor P, Kubatka P, Kapustova I, Miloseva L, Dankova Z, Gondova A, et al. Current approaches in the clinical management of pregnancy-associated breast cancer-pros and cons. *EPMA J*. 2018 Sep;9(3):257-70.
4. Kourtas A, Ntounis T, Fasoulakis Z, Papalios T, Pittokopitou S, Prokopakis I, et al. Cancer Treatment and Immunotherapy during Pregnancy. *Pharmaceutics*. 2022 Oct;14(10):2080.
5. Walters B, Midwinter I, Chew-Graham CA, Jordan KP, Sharma G, Chappell LC, et al. Pregnancy-Associated Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*. 2024 Apr 1;8(2):188-99.
6. Ashorn P, Ashorn U, Muthiani Y, Aoubaker S, Askari S, Bahl R, et al. Small vulnerable newborns-big potential for impact. *Lancet*. 2023 May 20;401(10389):1692-706.
7. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Feb;20(2):101-24.
8. Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology [Internet]*. 2021 [cited 2023 Jul 19];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.601626>
9. Bertozzi S, Corradetti B, Seriau L, Diaz Nãñez JA, Cedolini C, Fruscalzo A, et al. Nanotechnologies in Obstetrics and Cancer during Pregnancy: A Narrative Review. *Journal of Personalized Medicine [Internet]*. 2022;12(8). Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85137390727&doi=10.3390%2fjpm120813246&partnerID=40&md5=84872d8a3975b1b4fd50ae4e06f1724b>
10. Shojaei S, Ali MS, Suresh M, Upreti T, Mogourian V, Helwala M, et al. Dynamic placenta-on-a-chip model for fetal risk assessment of nanoparticles intended to treat pregnancy-associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021 Jul 1;1867(7):166131.
11. Fornaguera C, Calderó G, Solans C. Electrolytes as a tuning parameter to control nano-emulsion and nanoparticle size. *RSC Adv*. 2016 Jun 15;6(63):58203-11.
12. Lee Y, Lee D, Park E, Jang S young, Cheon SY, Han S, et al. Rhamnolipid-coated W/O/W double emulsion nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin/erlotinib and combination chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021 Dec 7;19(1):411.
13. Maksimenko O, Malinovskyaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm*. 2019 Dec 15;572:118733.
14. Tahir N, Madni A, Correia A, Rehman M, Balasubramanian V, Khan MM, et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:4961-74.
15. Jain AK, Swarnakar NK, Das M, Godugu C, Singh RP, Rao PR, et al. Augmented Anticancer Efficacy of Doxorubicin-Loaded Polymeric Nanoparticles after Oral Administration in a Breast Cancer Induced Animal Model. *Mol Pharmaceutics*. 2011 Aug 1;8(4):1140-51.
16. Bofill-Bonet C, Gil-Vives M, Artigues M, Hernández M, Borrós S, Fornaguera C. Fine-tuning formulation and biological interaction of doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles via electrolyte concentration modulation. *Journal of Molecular Liquids*. 2023 Nov 15;390:122986.
17. Yamada Y. Dimerization of Doxorubicin Causes Its Precipitation. *ACS Omega*. 2020 Dec 29;5(51):33235-41.
18. Zhu L, Yang S, Qu X, Zhu F, Liang Y, Liang F, et al. Fibril-shaped aggregates of doxorubicin with poly-L-lysine and its derivative. *Polym Chem*. 2014 Aug 26;5(19):5700-6.
19. Dhont JKG. Multiple Rayleigh-Gans-Debye scattering in colloidal systems-general theory and static light scattering. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 1983 Jun 1;120(1):238-62.
20. Dosta P, Demos C, Ramos V, Kang DW, Kumar S, Jo H, et al. Delivery of siRNA to Endothelial Cells In Vivo Using Lysine/Histidine Oligopeptide-Modified Poly(β-amino ester) Nanoparticles. *Cardiovasc Eng Technol*. 2021 Feb;12(1):114-25.
21. O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc, Faraday Trans 2*. 1978 Jan 1;74(0):1607-26.
22. Ohshima H, Makino K. Electrophoretic mobility of a particle covered with a partially ion-penetrable polyelectrolyte layer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996 Apr 20;109:71-5.
23. Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. *Nano Lett*. 2008 Aug 13;8(8):2180-7.

Premis 2024. Millor article en OA (DOAJ)

Sistemes lipídics nanoestructurats duals d'apigenina per al tractament del càncer

Resum de l'article original publicat a la revista *International Journal of Nanomedicine* i el link a l'article: <https://www.dovepress.com/dually-active-api-genin-loaded-nanostructured-lipid-carriers-for-cancer-peer-reviewed-full-text-article-IJN>

Lorena Bonilla Vidal

Doctora en Ciències Farmacèutiques.

Marta Świtalska

Doctora en Ciències Biològiques.

Marta Espina

Doctora en Ciències Físiques.

Joanna Wietrzyk

Doctora en Ciències Biològiques.

María Luisa García

Doctora en Ciències Farmacèutiques.

Eliana B. Souto

Doctora en Ciències Farmacèutiques.

Anna Gliszczynska

Doctora en Ciències Biològiques i Biotecnologia.

Elena Sánchez López

Doctora en Ciències Farmacèutiques.

Paraules clau:
Nanopartícules
Compostos naturals
Càncer

INTRODUCCIÓ

El càncer és un dels principals problemes de salut a nivell mundial¹. Tot i que els tractaments existents com la quimioteràpia són efectius, en alguns casos tenen efectes secundaris importants i poden provocar resistència a les teràpies. Els compostos naturals, com l'Apigenina (APG), han mostrat un gran potencial en la lluita contra el càncer gràcies a les seves propietats antitumorals². No obstant això, la baixa solubilitat d'aquest compost limita el seu ús en terapèutica. Per superar aquest problema es van desenvolupar els sistemes lipídics nanoestructurats (NLC), per transportar fàrmacs amb baixa disponibilitat com l'APG de manera més efectiva cap a les cèl·lules canceroses. Aquests NLC poden millorar la solubilitat dels compostos liposolubles i dirigir-los cap a les cèl·lules tumorals, reduint així els efectes secundaris³.

En aquest estudi s'ha creat una nova formulació de NLC que, a més d'APG, conté oli de rosa mosqueta. Aquest oli natural pot augmentar l'eficàcia del tractament gràcies a les seves propietats antiinflamatòries i antioxidants⁴. Es van estudiar la seva caracterització fisicoquímica i morfològica, les interaccions dels components i el seu perfil d'alliberament in vitro. A més, es van avaluar les seves propietats antiangiogèniques i la internalització cel·lular. També es

va investigar la seva potencial activitat antiproliferativa en diferents línies cel·lulars tumorals.

MATERIALS I MÈTODES

Preparació dels APG-NLC

La producció dels APG-NLC es va dur a terme utilitzant el mètode d'homogeneïtzació en calent d'alta pressió (Homogeniser FPG 12800, Stansted, Regne Unit). Es va preparar una emulsió primària amb una barreja d'una fase aquosa contenint el tensioactiu i una fase lipídica que contenia els lípids i el fàrmac, utilitzant un Ultraturrax® T10 bàsic (IKA, Alemanya) durant 30 segons. Les condicions de producció van ser una temperatura de 85 °C, 3 cicles d'homogeneïtzació i 900 bar de pressió⁵.

Optimització dels APG-NLC

Es va realitzar un disseny factorial central compost utilitzant el programari Statgraphics Centurion® 18 (Virginia, EUA). Es van analitzar quatre variables independents, la concentració d'APG, la concentració de tensioactiu, la concentració de fase lipídica i la concentració de lípids sòlids, per determinar el seu efecte sobre les propietats fisicoquímiques dels NLC. Les variables dependents estudiades van ser la mida mitjana de la partícula (Z_{av}), l'índex

L'encapsulació de l'APG en NLC augmenta la biodisponibilitat i la bioactivitat del flavonoide

de polidispersió (PDI), el potencial zeta (ZP) i l'eficiència de l'encapsulació (EE)⁶.

Caracterització fisicoquímica dels APG-NLC

El Z_{av} i el PDI van ser avaluats mitjançant la tècnica de dispersió dinàmica de la llum amb el ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Regne Unit). Per avaluar el ZP es va utilitzar l'estudi de la mobilitat electroforètica. Les formulacions es van diluir amb aigua Milli-Q⁷. L'EE es va mesurar indirectament mitjançant la quantificació de l'APG no encapsulada en els APG-NLC, amb un sistema de filtració/centrifugació. L'APG no encapsulada va ser quantificada utilitzant cromatografia de líquids d'alt rendiment (HPLC) de fase inversa.

Estudis d'interacció i morfologia

La calorimetria diferencial d'escorbrat (DSC) es va realitzar en un sistema DSC 823e (Mettler-Toledo, Barcelona, Espanya). Els termogrames dels APG-NLC i els seus components purs es van obtenir utilitzant una rampa d'escalfament de 25 a 105 °C a una velocitat de 10 °C/min. Els espectres d'infraroig de transformada de Fourier (FTIR) dels APG-NLC i els seus components es van determinar utilitzant un espectròmetre Thermo Scientific Nicolet iZ10 acoblat a un cristall ATR de diamant i un detector

DTGS (Barcelona, Espanya). També es va avaluar el perfil de difracció de raigs X (XRD) dels APG-NLC i els seus components col·locant les mostres entre dues capes de polièster de 3,6 mm i exposant-les a la radiació CuK⁸.

La microscòpia electrònica de transmissió (TEM) es va utilitzar per determinar la morfologia dels APG-NLC utilitzant un microscopi Jeol 1010 (Jeol USA, Massachusetts, EUA). En primer lloc les reixetes de coure es van activar amb llum UV i els APG-NLC es tenyien negativament amb acetat d'uranil (2 %)⁶.

Estudis d'estabilitat

Els APG-NLC es va emmagatzemar a 3 temperatures diferents (4, 25 i 37 °C) durant uns mesos. L'estudi es va dur a terme mitjançant l'anàlisi dels perfils de retrodispersió de la llum (BS) mitjançant l'equip Turbiscan Lab Lab (Formulation Inc, Worthington, EUA). Es van obtenir dades BS i els valors de Z_{av} , PDI, ZP i EE es van mesurar cada 15-30 dies simultàniament⁹.

Comportament biofarmacèutic

L'estudi d'alliberament d'APG *in vitro* es va dur a terme utilitzant cèl·lules de difusió de tipus Franz (PermeGear, Alemanya). Les formulacions es van comparar amb l'APG lliure. L'assaig es va dur a terme a 37.0 ± 0.5 °C durant 48 h. El contingut d'APG es va mesurar mitjançant HPLC. Cada mostra es va analitzar per triplicat i es va calcular la quantitat d'APG acumulada¹⁰.

Capacitat antiangiogènica

Per determinar els efectes antiangiogènics dels APG-NLC es va utilitzar un test de membrana corioal·lantòica (CAM) modificat, utilitzant ous de gallina fertilitzats. Per a fer l'assaig

es va obrir una finestra lateral a la closca dels ous i es van inocular les mostres a la CAM. Posteriorment, la membrana va ser segellada i incubada durant 48 h. Un cop avaluada la CAM, les membranes es van fixar i posteriorment es van quantificar³.

Estudis biològics

Determinació de l'activitat antiproliferativa

Per a determinar la capacitat antiproliferativa, es van sembrar cèl·lules de diferents línies tumorals en plaques de 96 pous. Es va estudiar la capacitat antiproliferativa a quatre concentracions diferents després de 24 i 72 hores d'exposició. Els efectes citotòxics es van examinar mitjançant assajos MTT (MV4-11) o SRB i es va calcular l'IC50 (concentració inhibidora 50 %)¹¹.

Determinació de l'acumulació en cèl·lules per citometria de flux

Els APG-NLC es van marcar fluorescentment amb Nile Red (NR) per determinar la seva acumulació a les cèl·lules. Concretament es van fer servir cèl·lules de leucèmia, que van ser incubades durant 5, 15, 30 minuts i 1, 2 i 4 hores. La fluorescència mitjana de les cèl·lules incubades amb els compostos marcats amb NR va ser analitzada per citometria de flux, utilitzant un citòmetre BD LSR Fortessa (BD Bioscience, San Jose, USA)¹¹.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Caracterització i optimització dels APG-NLC

El Z_{av} de les formulacions va ser majoritàriament inferior a 200 nm, amb valors de PDI al voltant de 0.2, indicant així una distribució unimodal de nanopartícules. Els APG-NLC desenvolupats van mostrar una càrrega superficial negativa de -20 mV. En tots els casos l'EE era superior al 95 %, el que significa que l'APG estava

completament encapsulada. Tenint en compte tots els paràmetres avaluats i les tendències, es va obtenir una formulació optimitzada que contenia 0,1 % d'APG, 7,5 % de fase lipídica, 65 % de lípid sòlid i 3,5 % de tensioactiu.

Estudis d'interacció dels APG-NLC

El DSC es va utilitzar per estudiar les variacions en la cristallinitat i la temperatura de fusió (T_m) de les mescles de lípids en comparació als APG-NLC. La T_m de la barreja de lípids era lleugerament inferior a la de la barreja de lípids amb l'APG. A més, la T_m dels APG-NLC era lleugerament inferior al de la barreja física, probablement a causa de la seva petita mida i incorporació del tensioactiu. Els valors d'entalpia (ΔH) menors dels APG-NLC van indicar tenien una estructura més amorfa que la mescla de lípids. L'anàlisi FTIR es va utilitzar per investigar les interaccions entre l'APG, el tensioactiu i la matriu lipídica. Els estudis van confirmar que no es van formar enllaços covalents entre el fàrmac i la matriu lipídica, de manera que els enllaços d'hidrogen i les forces hidròfobes podrien ser les forces principals entre ells, facilitant l'acomodació de l'APG dins dels NLC i promovent el seu alliberament. En els perfils de XRD es van observar pics intensos i aguts per a l'APG i la barreja sòlida de lípids, el que indica que aquests components tenen una estructura cristal·lina. El perfil dels APG-NLC va mostrar un pic molt intens, atribuït a una forma molt estable dels triacilglicerols, indicant una bona estabilitat de la formulació³.

Estudis morfològics

Utilitzant el TEM es va confirmar que es van obtenir nanopartícules rodones gairebé esfèriques amb valors de Z_{av} inferiors a 200 nm. Aquests valors van coincidir amb els trobats per

dispersió dinàmica de la llum. A més, com prediuen els valors ZP obtinguts (-20 mV), no es va observar l'agregació de partícules.

Estabilitat dels APG-NLC

La formulació dels APG-NLC va ser estable a 4 °C durant un període d'11 mesos, mantenint constants els paràmetres fisicoquímics, mentre que a 25 °C l'estabilitat va durar 3 mesos i a 37 °C va ser estable durant només 15 dies. Les altes temperatures van accelerar la desestabilització de les partícules en disminuir el ZP, promovent fenòmens d'agregació¹¹.

Comportament biofarmacèutic

El perfil d'alliberació *in vitro* de l'APG des dels NLC en comparació a l'APG lliure va demostrar que la formulació lipídica tenia un perfil cinètic característic de formulacions d'alliberament prolongat de fàrmacs. Durant les primeres 2 hores es va observar un alliberament inicial de l'APG des dels NLC ràpid, seguit d'un alliberament lent. L'APG lliure va mostrar un alliberament ràpid, aconseguint un 100 % abans de les 24 hores, mentre que els APG-NLC van alliberar menys del 30 %.

Capacitat antiangiogènica

Els APG-NLC van ser capaços de reduir la densitat vascular de manera significativa ($p < 0,01$) en comparació amb el control negatiu (NaCl). L'APG lliure i els NLC buits no van tenir cap efecte en la vasculatura de la CAM. Aquests resultats indiquen que l'encapsulació de l'APG en NLC augmenta la biodisponibilitat i la bioactivitat del flavonoide. A més, ja que l'angiogènesi és un procés que aporta oxigen i nutrients als tumors, la seva inhibició podria proporcionar una eina eficaç per a la teràpia anticancerígena³.

Els APG-NLC
van ser actius
contra totes
les línies cel·lulars
cancerígenes
estudiades,
fins i tot en una
línia de càncer
de mama triple
negatiu

Estudis de l'activitat antiproliferativa

Els estudis de citotoxicitat van demostrar que mentre que l'APG només tenia activitat antiproliferativa en les cèl·lules de leucèmia, els APG-NLC van ser actives contra totes les línies cel·lulars cancerígenes estudiades, fins i tot en una línia de càncer de mama triple negatiu, que és un càncer normalment més agressiu, més difícil de tractar i més probable que hi hagi recaigudes que els càncers que són hormonals¹². Per altra banda, els NLC buits van mostrar una gran activitat antiproliferativa contra totes les línies cel·lulars tumorals i una alta selectivitat, demostrant una excel·lent seguretat i eficàcia. Aquest efecte va ser principalment atribuït a l'oli de rosa mosqueta que portava la formulació, que a més de l'ús medicinal tradicional tòpic, en els últims anys els investigadors han estat reportant noves característiques farmacològiques antitumorals¹³.

Acumulació dels APG-NLC en cèl·lules tumorals

Les cèl·lules de la leucèmia MV4-11 es van incubar amb una formulació

Els APG-NLC s'han desenvolupat amb èxit i s'han caracteritzat fisicoquímicament, mostrant un alliberament prolongat

d'APG-NLC-NR. Els resultats obtinguts confirmen que les formulacions de NLC són un mètode eficaç per lliurar substàncies biològicament actives dins de les cèl·lules. La intensitat mitjana de fluorescència (MFI) de les cèl·lules després de la incubació amb els APG-NLC-NR es va com-

parar amb la del control (cèl·lules no marcades). Després de 5 minuts d'incubació amb els APG-NLC-NR, es va observar una fluorescència significativament més alta. Durant tot l'experiment, es va obtenir una MFI significativament més alta que la del control ($p < 0,05$). A més, l'acumulació dels APG-NLC a les cèl·lules va ser ràpida i estable, i després de 5 minuts es van obtenir diferències significatives comparant amb el control. Després de 240 minuts d'incubació, es van mantenir els valors MFI. Demostrant així la ràpida i mantinguda internalització cel·lular dels APG-NLC.

CONCLUSIÓ

L'APG es va encapsular amb èxit en NLC que contenia oli de rosa mosqueta amb una mida de partícula in-

ferior a 200 nm i una elevada EE. Els APG-NLC van mostrar una estabilitat adequada durant gairebé un any, així com un alliberament prolongat. En els assajos *in ovo* i *in vitro* en cèl·lules tumorals es va confirmar que l'APG augmentava la seva activitat quan era encapsulada en els NLC. Els APG-NLC van disminuir la formació de nous vasos sanguinis, destacant la seva activitat antiangiogènica. A més, els assajos antiproliferatius van confirmar la selectivitat dels APG-NLC contra les cèl·lules tumorals i la citotoxicitat en les cèl·lules de càncer de leucèmia, pulmó i mama.

En conclusió, els APG-NLC s'han desenvolupat amb èxit i s'han caracteritzat fisicoquímicament, mostrant un alliberament prolongat, propietats antiangiogèniques i activitat antiproliferativa contra les línies cel·lulars tumorals. ■

Bibliografia

1. Hyuna S, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Jemal ISA, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-49.
2. Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y, Shao H. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci* 2017 71. 2017;7(1):1-16.
3. Bonilla-Vidal L, Świtalska M, Espina M, Wietrzyk J, García ML, Souto EB, et al. Dually active apigenin-loaded nanostructured lipid carriers for cancer treatment. *Int J Nanomedicine.* 2023;18:6979-97.
4. Strugała P, Gładkowski W, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Gabrielska J. Antioxidant activity and anti-inflammatory effect of fruit extracts from blackcurrant, chokeberry, hawthorn, and rosehip, and their mixture with linseed oil on a model lipid membrane. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2016;118(3):461-74.
5. Llorente X, Esteruelas G, Bonilla L, Agudelo MG, Filgaira I, Lopez-Ramajo D, et al. Riluzole-loaded nanostructured lipid carriers for hyperproliferative skin diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):8053.
6. Esteruelas G, Souto EB, Espina M, García ML, Świtalska M, Wietrzyk J, et al. Diclofenac loaded biodegradable nanoparticles as antitumoral and antiangiogenic therapy. *Pharmaceutics.* 2022;15(1):102.
7. Cimino C, Sánchez López E, Bonaccorso A, Bonilla L, Musumeci T, Badia J, et al. In vitro and in vivo studies of ocular topically administered NLC for the treatment of uveal melanoma. *Int J Pharm.* 2024;660:124300.
8. Esteruelas G, Halbaut L, García-Torra V, Espina M, Cano A, Ettcheto M, et al. Development and optimization of Riluzole-loaded biodegradable nanoparticles incorporated in a mucoadhesive in situ gel for the posterior eye segment. *Int J Pharm.* 2022;612:121379.
9. Bonilla-Vidal L, Espina M, García ML, Cimino C, Carbone C, Baldomà L, et al. Melatonin loaded nanostructured lipid carriers for the treatment of uveal melanoma. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2024;106057.
10. Bonilla-Vidal L, Espina M, García ML, Baldomà L, Badia J, González JA, et al. Novel nanostructured lipid carriers loading Apigenin for anterior segment ocular pathologies. *Int J Pharm.* 2024;658:124222.
11. Bonilla-Vidal L, Świtalska M, Espina M, Wietrzyk J, García ML, Souto EB, et al. Antitumoral melatonin-loaded nanostructured lipid carriers. *Nanomedicine.* 2024;1-16.
12. Wojtowicz W, Wróbel A, Pyziak K, Tarkowski R, Balcerzak A, Bębenek M, et al. Evaluation of MDA-MB-468 cell culture media analysis in predicting triple-negative breast cancer patient sera metabolic profiles. *Metabolites.* 2020;10(5):173.
13. Cagle P, Idassi O, Carpenter J, Minor R, Goktepe I, Martin P. Effect of rosehip (*Rosa Canina*) extracts on human brain tumor cell proliferation and apoptosis. *J Cancer Ther.* 2012;2012(05):534-45.



cofb.org