



Nano y Microfarmacología

ARTÍCULOS DE REVISIÓN EN NANO Y MICROFARMACOLOGÍA

- **NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS**
Carolina Gómez-Gaete.
- **DESARROLLO DE UN CARRIER NANOPARTICULADO COMO ESTRATEGIA DE TRANSPORTE A TRAVÉS DEL SISTEMA NERVIOSO** Eileen Castillo y cols.
- **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN PROLONGADA DE PRAMIPEXOL** Constanza Fuentes y cols.
- **EL SECADO POR PULVERIZACIÓN DESDE LOS FUNDAMENTOS A LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS** Nicolas Tsapis.
- **DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES DE CAPSAICINA Y EVALUACIÓN DE CESIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS**
Paula Mantellero G. y cols.

ARTÍCULO ORIGINAL EN FARMACOLOGÍA ONCOLÓGICA

- **EL DICLOROACETATO: MEDICAMENTO HUÉRFANO CON UN POSIBLE USO EN ONCOLOGÍA**
Niyireth Novoa Santander y cols.

ARTÍCULO DE REVISIÓN EN FARMACOLOGÍA CLÍNICA

- **FARMACOLOGÍA CLÍNICA Y SEGURIDAD DE LOS MEDIOS DE CONTRASTE YODADOS (Clinical Pharmacology and Safety of Iodinated Contrast Media).**
Juan Carlos Prieto-Rayó y Cristian Varela

PANEL DE EDITORES

La Revista de Farmacología de Chile tiene un panel de editores conformado por connotados farmacólogos nacionales que son miembros de la Sociedad de Farmacología de Chile y académicos de las principales universidades chilenas.

Comité Editorial:

Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, Editor en Jefe

(Universidad de Valparaíso, Chile)

Dr. Pablo Jara Picas, Co-Editor

(Universidad de Santiago de Chile, Chile)

Dr. Hernán E. Lara

(Universidad de Chile, Chile)

Dra. Viviana Noriega

(Universidad de Chile, Chile)

Dr. Juan Carlos Prieto

(Universidad de Chile, Chile)

Dra. Jacqueline Sepúlveda

(Universidad de Concepción, Chile)

Dr. Juan Pablo G. Huidobro-Toro

(Universidad de Santiago de Chile, Chile)

Dra. Katia Gysling

(Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile)

Dra. Gabriela Díaz-Véliz

(Universidad de Chile, Chile)

Dra. Carolina Gómez Gaete

(Universidad de Concepción, Chile)

Dr. Alfonso Paredes V.

(Universidad de Chile, Chile)

Dr. Rodrigo Castillo P.

(Universidad de Chile, Chile)

Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez

(Universidad de Chile, Chile)

Dra. Georgina M. Renard

(Universidad de Valparaíso, Chile)

Evaluadores Asociados:

Dr. Hugo F. Miranda

Dra. María Eugenia Letelier

Dr. Sergio Mora

Dr. Jorge Farías Avendaño

Dr. Raúl Corrales V.

Dr. Guillermo Díaz-Araya

Dra. Verónica Donoso

Dr. Mario Faúndez

Dra. Jenny Fiedler

Dr. Miguel Reyes-Parada

Dr. Yedy Israel

Dr. Ricardo Maccioni

Dra. Verónica Kramer

Dr. Sergio Lavandero

Dr. Juan Diego Maya

Dr. Antonio Morello

Dra. Myriam Orellana

Dra. María Elena Quintanilla

Dra. Teresa Pelissier S.

Dr. Javier Puente

Dr. Luis Quiñones

Dr. Patricio Saéz-Briones

Dra. Coralia Rivas

Dr. Leonel Rojo

Dra. Inés Ruiz

Dra. Gladys Tapia

Dra. M. Antonieta Valenzuela

Dra. M. Araceli Valle

Dr. Luis Videla

Dr. Raúl Vinet

Dr. Bruce K. Cassels

Dr. Iván Saavedra S.

Revista de Farmacología de Chile es publicada por la Sociedad de Farmacología de Chile

Derechos Reservados a la Sociedad de Farmacología de Chile.

ISSN 0718-8811 versión impresa

ISSN 0718-882X versión digital

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema alguno de tarjetas perforadas o transmitida por otro medio -electrónico, mecánico, fotocopiador, registrador, etcétera- sin permiso previo por escrito del comité editorial.

MISIÓN

La Revista de Farmacología de Chile es considerada el órgano oficial de difusión científica y de opinión de la Sociedad de Farmacología de Chile. En un principio esta revista nació como un remozado libro de resúmenes del XVIII Congreso Latinoamericano de la Asociación de Farmacología realizado en Chile el año 2008. Desde 2009 y hasta ahora la Revista de Farmacología de Chile ha recibido varios trabajos originales de investigación y diversas revisiones de temas farmacológicos relevantes.

La Revista de Farmacología de Chile aborda temas relacionados con la farmacología básica y experimental, así como investigaciones clínicas. Las áreas temáticas principales son: farmacocinética, farmacodinamia, farmacología cardiovascular, farmacología pulmonar, farmacología endocrina, neurofarmacología, farmacología clínica, estudios preclínicos, estrés oxidativo, fitofarmacología, ciencias farmacéuticas, química-médica y toxicología. También la revista actualmente permite divulgar opiniones sobre los principales temas de salud relacionados con medicamentos en Chile, la presentación de líneas de investigación de laboratorios nacionales en donde se realizan investigaciones farmacológicas, información de curso y programas de postgrados nacionales en farmacología y la publicación de resúmenes científicos del Congreso Anual SOFARCHI.

Audiencia:

La Revista de Farmacología de Chile esta dirigida a farmacólogos nacionales e internacionales interesados en la divulgación de la farmacología. También está dirigida a estudiantes de pregrado de carreras universitarias del área de la salud y ciencias biomédicas, y a estudiantes de postgrado que cursen maestrías y doctorados en farmacología.

Periodicidad:

Se editaran 3 números anuales (Abril, Agosto y Diciembre) en formato digital e impreso. El número de Diciembre incluirá trabajos originales y los resúmenes del Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.

Temas a Publicar:

- Artículos originales en Farmacología Básica, Farmacología Clínica, Farmacoterapia y Toxicología.
- Artículos originales de investigación nacional e internacional en Farmacocinética y Farmacogenética.
- Artículos de revisión de temas farmacológicos importantes sobre las diversas temáticas de la disciplina.
- Artículos de Información de nuevos fármacos incorporados al arsenal terapéutico nacional.
- Opiniones oficiales de la sociedad sobre los aspectos regulatorios y nuevas políticas de medicamentos.
- Artículos sobre nuevas metodologías docentes, aplicadas en Farmacología.
- Información detallada de nuevos reportes de reacciones adversas reportadas a nivel internacional y nacional.
- Libros y revistas de los temas.
- Promoción de actividades académicas, congresos y cursos nacionales e internacionales en farmacología.
- Publicitar las ofertas de trabajo de inserción académica en Universidades Chilenas y extranjeras, así como las oportunidades de inserción laboral en la industria privada ligada al desarrollo de fármacos.

Revista de Farmacología de Chile es publicada por la Sociedad de Farmacología de Chile

Contacto: Avenida Independencia 1007, Independencia, Santiago, Chile. Teléfono: 56-2-29786050; Correo Electrónico: consultas.sofarchi@gmail.com; farmacologia@med.uchile.cl

Editor: Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Avenida Gran Bretaña 1111, Playa-Ancha, Valparaíso, Chile. Teléfono: 56-32-2508050; Correo Electrónico: ramon.sotomayor@uv.cl

EDITORIAL

Ramón Sotomayor-Zárate, Pharm.D., Ph.D.

Editor en Jefe

Vice-Presidente de la Sociedad de Farmacología de Chile

Este nuevo número de la Revista de Farmacología de Chile cuya temática es la Nano y Microfarmacología, cuenta con la valiosa co-edición de la Dra. Carolina Gómez-Gaete de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, quien pone a disposición de nuestros lectores nuevos avances tecnológicos realizados en Chile en el campo de la Nanociencia, en específico en la Nanofarmacología. Las aplicaciones de estos Nanosistemas de liberación de fármacos, abren un amplio campo en la medicina, permitiendo en un futuro cercano un mejor diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades con mayor precisión, seguridad, selectividad y eficacia. Sin duda, los trabajos presentados en este número son de extraordinaria calidad y son un ejemplo de una gran integración entre la tecnología farmacéutica y la farmacología aplicada.

Además, en este número también contamos con otros 2 trabajos originales, uno en el campo de la farmacología oncológica enviado desde Colombia y otro en el área de la farmacología clínica. Sin duda, esperamos que la visibilidad nacional e internacional de nuestra revista se vea reflejada en un nuevo interés por parte de nuestros lectores para enviar trabajos originales de investigación. Esperamos que la incorporación de la Revista de Farmacología de Chile al catálogo Latindex sea un estímulo para enviar nuevos artículos y estamos seguros que prontamente podremos acceder al catálogo de Revistas SciELO.

Un cordial saludo y un gran abrazo



Dr. Ramón Sotomayor-Zárate

EDITORIAL: NANO Y MICROFARMACOLOGÍA

Carolina Gómez Gaete, Pharm.D., Ph.D.

Profesor Asociado, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile.

Director por Concepción de la Sociedad de Farmacología de Chile.

En esta edición de la Revista de Farmacología de Chile enfocada en nano y microtecnología terapéutica, se presentan trabajos que abordan diversos aspectos del desarrollo, caracterización y aplicación terapéutica de sistemas nano y microparticulados. Estos sistemas de liberación de fármacos constituyen poderosas herramientas que pueden ser aplicadas en el campo del diagnóstico y el tratamiento de patologías tan severas como el cáncer. Es así como hoy en día se encuentran disponibles en el mercado diversos productos nano/microtecnológicos que ofrecen entre otras ventajas, mayor biodisponibilidad de las moléculas terapéuticas y mejor selectividad en los tratamientos.

El artículo de revisión enfocado en nanotecnología terapéutica aborda aspectos que van desde lo tecnológico a las aplicaciones terapéuticas. Se destacan las ventajas de estos sistemas coloidales con respecto a los principios activos al estado libre en formulaciones convencionales, los métodos de fabricación y los principales materiales empleados. La caracterización fisicoquímica también es abordada teniendo en cuenta su importancia dependiendo de la vía de administración y de las propiedades de superficie deseadas. Al respecto, se detalla la evolución que han sufrido las nanopartículas desde su creación, la cual ha estado principalmente enfocada en modificar las propiedades de superficie, otorgando funcionalización celular.

Continuando con la línea nanotecnológica, el trabajo de Eileen Castillo y cols., se enfoca en aspectos tecnológicos relacionados con la fabricación de nanopartículas de quitosano como potencial carrier de moléculas activas al SNC. En particular se optimiza el método de gelificación iónica para la obtención de estos nanovectores, así como también la incorporación de un agente de superficie que reduzca la captura por el sistema retículo endotelial y aumente el paso a través de la barrera hematoencefálica. Finalmente la formulación optimizada es evaluada in vivo tras su administración por vía endovenosa.

El trabajo de Constanza Fuentes y cols., está enfocado en el desarrollo de microesferas biodegradables de pramipexol como potencial sistema de liberación controlada de administración parenteral. En este artículo se evalúan dos métodos de fabricación, comparando posteriormente las microesferas formadas en cuanto a morfología, tamaño, eficiencia de encapsulación e interacción principio activo/polímero. El perfil de liberación determina finalmente el método de elaboración óptimo, es decir, aquel que permite la obtención de microesferas que retarden la salida de pramipexol y por ende que actúan como sistemas de liberación controlada.

Uno de los métodos escalables para la obtención de micropartículas es el secado por atomización, éste destaca por la versatilidad de los excipientes que pueden ser utilizados. El trabajo del Dr. Nicolas Tsapis, investigador de la Université Paris-Sud 11 e Institut Galien, Francia, describe cómo ocurre el proceso de secado de gotas que contienen dispersiones coloidales, demostrando que tanto las fuerzas intercoloidales como las viscosidad del solvente utilizado juegan un papel importante en la morfología de éstas, aspecto relevante para la administración pulmonar de fármacos a la forma de polvos. Paralelamente se describe en este artículo la encapsulación de tres moléculas de interés terapéutico en partículas porosas para la inhalación, estas son: un agente quelante de plutonio, alendronato sódico y pirazinamida.

Finalmente, el trabajo de Paula Mantellero y cols., está enfocado en desarrollo de nanopartículas de capsaicina con el propósito de reducir los efectos adversos que ocurren tras su administración por vía tópica. Inicialmente se optimiza el proceso de fabricación de las nanopartículas, luego se caracterizan y finalmente se evalúa la cesión del activo desde las nanopartículas, cuando éstas son incorporadas en crema base, versus la cesión de capsaicina a partir de una formulación comercial.

Revista de Farmacología de Chile

AÑO 2014 VOLUMEN 7 NÚMERO 2

ARTÍCULOS DE REVISIÓN EN NANO Y MICROFARMACOLOGÍA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS (Polymeric nanoparticles: technology and pharmaceutical applications). Carolina Gómez-Gaete.

DESARROLLO DE UN CARRIER NANOPARTICULADO COMO ESTRATEGIA DE TRANSPORTE A TRAVÉS DEL SISTEMA NERVIOSO (Development of nanoparticulate carrier as a transport strategy through the nervous system). Eileen Castillo, Guillermo Jiménez, Carolina Gómez-Gaete y Carlos von Plessing.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN PROLONGADA DE PRAMIPEXOL (Development and evaluation of sustained-release pramipexole-loaded biodegradable microspheres). Constanza Fuentes, Carlos von Plessing y Marcos Fernández.

EL SECADO POR PULVERIZACIÓN DESDE LOS FUNDAMENTOS A LA ADMINISTRACION PULMONAR DE MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS (Spray-drying from fundamentals to pulmonary administration of therapeutic molecules). Nicolas Tsapis.

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES DE CAPSAICINA Y EVALUACIÓN DE CESIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS (Development of biodegradable capsaicin nanoparticles and evaluation of active release from semisolid formulations). Paula Mantellero G., Carolina Gómez-Gaete, Javiana Luengo C., Ricardo Godoy R. y Rayén Pinto S.

ARTÍCULO ORIGINAL EN FARMACOLOGÍA ONCOLÓGICA

EL DICLOROACETATO: MEDICAMENTO HUÉRFANO CON UN POSIBLE USO EN ONCOLOGÍA (Dichloroacetate: Orphan drug with a possible use in oncology). Niyireth Novoa Santander, David Esteban Rebellón Sánchez y Bibiana Matilde Bernal Gómez.

ARTÍCULO ORIGINAL EN FARMACOLOGÍA CLÍNICA

FARMACOLOGÍA CLÍNICA Y SEGURIDAD DE LOS MEDIOS DE CONTRASTE YODADOS (Clinical Pharmacology and Safety of Iodinated Contrast Media). Juan Carlos Prieto-Rayó y Cristian Varela

ARTÍCULO DE REVISIÓN

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS
(Polymeric nanoparticles: technologie and pharmaceutical applications)

Carolina Gómez-Gaete¹

¹Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

RESUMEN

La nanotecnología terapéutica es una disciplina relativamente reciente en el campo de las ciencias farmacéuticas, que ha revolucionado la medicina moderna. Esta disciplina implica el empleo de nanopartículas como sistemas de vectorización, protección y liberación controlada de moléculas de interés terapéutico, cuyo tamaño fluctúa en el orden de los nanómetros. Estos vectores permiten mejorar la biodistribución de moléculas frágiles o complejas y favorecer su interacción con tejidos específicos, protegiendo a su vez el tejido sano. Para cumplir estas funciones, deben ser elaboradas con materiales biocompatibles y biodegradables que aseguren inocuidad y que a su vez otorguen las propiedades deseadas dependiendo del objetivo terapéutico. Dentro de estos materiales destacan los polímeros, debido a su naturaleza fisicoquímica y propiedades de funcionalización con ligandos específicos para ser reconocidos por receptores sobreexpresados en la superficie de determinadas células. Las aplicaciones médicas de las nanopartículas poliméricas son diversas, pudiendo ser útiles como eficientes medios de diagnóstico y/o herramientas terapéuticas contra patologías severas como las enfermedades neurodegenerativas, infecciones y cáncer. El presente artículo de revisión detalla los aspectos más relevantes para la obtención de estos sistemas, así como también las aplicaciones de la nanotecnología en medicina.

Palabras Claves: Nanomedicina, Nanotecnología, Nanopartículas, Vectorización, Drug Delivery Systems, Polímeros.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 7-16

Recivido 01-04-2014; Revisado 01-05-2014; Aceptado 10-05-2014

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la nanotecnología ha mostrado logros significativos en diversas disciplinas como la electrónica, fotónica, química de materiales y área médica (Jena et al. 2013). En este último aspecto, el término nanomedicina involucra el empleo de sistemas nanoparticulados como eficientes herramientas para diagnóstico y tratamiento. Dentro de los nanocarriers empleados en terapéutica se encuentran los liposomas, las micelas, las nanopartículas metálicas, lipídicas y las poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm (Brigger et al. 2002), generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad.

Las nanopartículas terapéuticas fueron elaboradas por primera vez por Speiser y colaboradores durante la década de los 70, pensando en desarrollarlas como medio de liberación de moléculas activas y vacunas (Kreuter 2007). Actualmente sus aplicaciones terapéuticas son tan diversas

como las vías por las cuales pueden ser administradas destacando dentro de ellas la vía oral, pulmonar, oftálmica, endovenosa, intramuscular, intraocular e intraarticular, entre otras (Viswanathan et al. 2010).

Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas destacan (De Jong & Borm 2008):

- Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados.
- Aumentar la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad.
- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.

Correspondencia a: Dra. Carolina Gómez-Gaete, Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Barrio Universitario S/N, Casilla 237, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-2661334, Fax: 56-41-2207086, Correo electrónico: cargomez@udec.cl

- Otorgar protección de la molécula encapsulada, por ejemplo, contra la degradación enzimática, química o inmunológica.

Considerando estos objetivos, las investigaciones que involucran nanotecnología se enfocan en evaluar la incorporación y liberación de principios activos, conocer la estabilidad de la formulación y su vida media, evaluar su biocompatibilidad, biodistribución y targeting.

Considerando la estructura física, las nanopartículas pueden clasificarse en nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas matriciales, en donde el fármaco está disperso en una matriz polimérica. En el caso del empleo de polímeros biodegradables, la liberación del fármaco se produce ya sea por difusión a través de los poros de la matriz, por degradación o erosión del polímero, o bien por una combinación de ambos mecanismos. Cuando se emplean polímeros no biodegradables, la liberación se produce por un proceso de difusión lenta a través de la matriz. Las nanocápsulas por su parte son sistemas de tipo reservorio, en donde el fármaco se encuentra en una cavidad central cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación dependiendo de su naturaleza química. La selección de una u otra estructura dependerá del método de elaboración de las nanopartículas, de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de las características del fármaco.

Considerando los avances a la fecha referidos a las aplicaciones de la nanotecnología en el área médica, esta revisión detallará los aspectos más relevantes para la obtención de estos sistemas, así como también sus principales aplicaciones médicas.

1) MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Existen numerosos métodos para elaborar nanopartículas poliméricas que permitan la encapsulación de moléculas hidrófobas o hidrófilas, simples o complejas. Estos métodos pueden ser clasificados en dos categorías. Los de elaboración directa y aquellos a base de polímeros preformados. Entre los métodos de elaboración directa se pueden mencionar la polimerización de una emulsión (que permite crear nanoesferas) y la polimerización interfacial a partir de monómeros (para formar nanocápsulas). Dentro de los métodos que emplean polímeros preformados destacan la emulsión evaporación de solvente (simple o doble) que permite obtener nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente y la nanoprecipitación por inyección.

La emulsión evaporación de solvente consiste en formar una emulsión a partir de dos fases inmiscibles. Una fase acuosa o continua provista de un agente emulgente apropiado y una fase dispersa orgánica que contiene el principio activo y el polímero destinado a la formación de la matriz. Una fuente de energía permite formar pequeñas gotas de la fase dispersa, generalmente se emplea una

sonda de ultrasonido. Una vez formada la emulsión, el solvente orgánico es evaporado, por lo que debe ser suficientemente volátil. El polímero precipita atrapando al fármaco, lo que permite la formación de nanoesferas (figura 1 A). La principal ventaja de este método es la alta eficiencia de encapsulación de principios activos hidrófobos. La obtención de nanopartículas encapsulantes de moléculas hidrófilas se logra a partir de una doble emulsión (dando lugar a nanocápsulas).

Por su parte, la nanoprecipitación por inyección, requiere el empleo de dos solventes miscibles. Su principio se fundamenta en la interdifusión de éstos al estar en contacto. Tanto el polímero como el fármaco deben ser disueltos en un solvente orgánico. El segundo solvente debe ser elegido en base a su miscibilidad con el primero, siendo un no solvente para el polímero. Normalmente es una solución acuosa de un tensioactivo que permita la estabilización de las partículas obtenidas por precipitación de la gota al entrar en contacto con el agua. La incorporación de la fase polimérica debe ser efectuada gota a gota bajo constante agitación. La utilización de soluciones diluidas permite la precipitación del polímero en la escala nanométrica (Figura 1 B). La principal ventaja de este método radica en que permite obtener nanopartículas de tamaño inferior a aquellas obtenidas por emulsión evaporación de solvente, lo cual estabiliza al sistema. Además, puede prescindir del empleo de solventes tóxicos. Su principal inconveniente es la baja encapsulación de activos con respecto al método de emulsión evaporación de solvente.

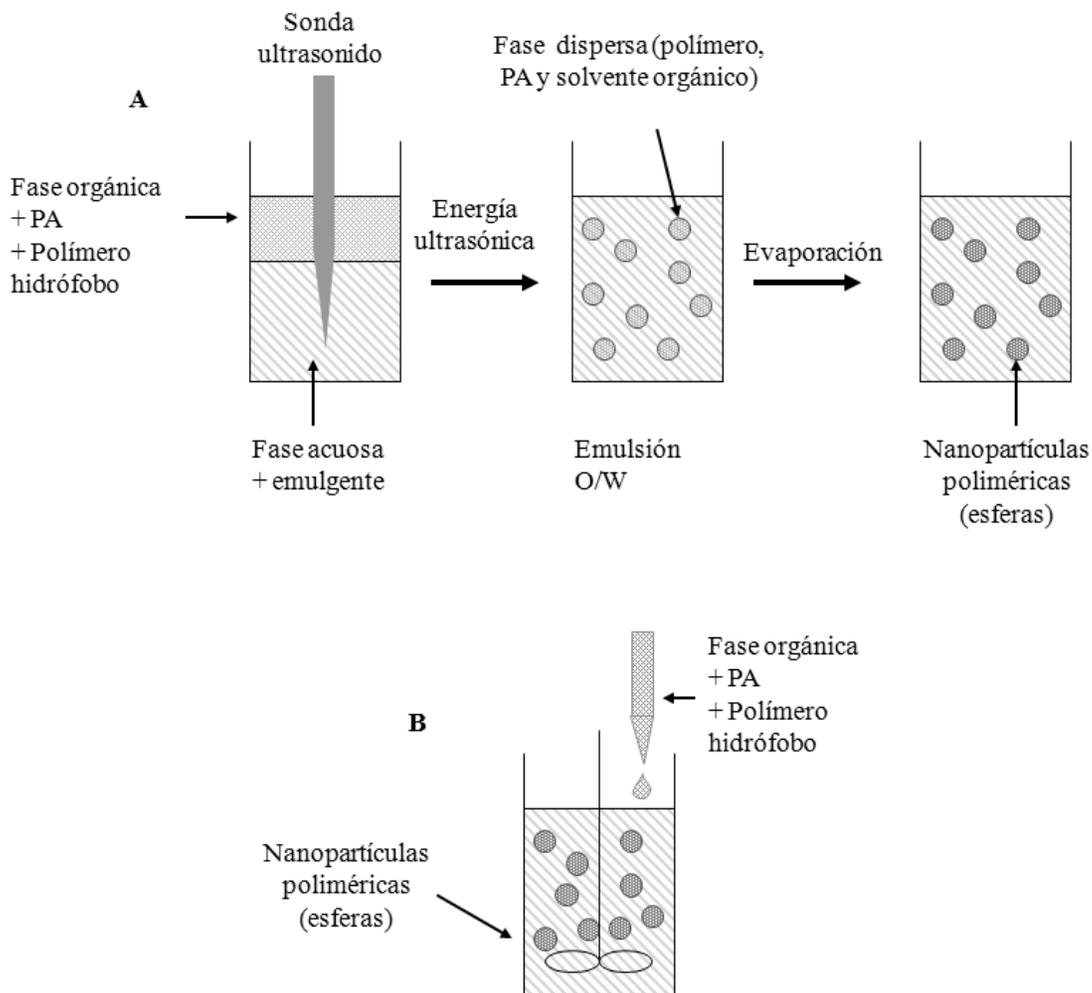
2) COMPOSICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Existen diversos materiales empleados como componente principal de la matriz que formará las nanopartículas biodegradables encapsulantes de moléculas terapéuticas, dentro de éstos se incluyen las grasas (fosfolípidos, ácidos grasos), las proteínas (gelatina, albúmina) y los polímeros, ya sea naturales (dextrano, quitosano), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos poly(acrilatos), poly(anhídridos), poly(acrilamidas) y poly(ésteres). Entre estos últimos, el más utilizado para la elaboración de nanopartículas mediante el método emulsión evaporación de solvente es el copolímero sintético ácido poly (láctico-co-glicólico) (PLGA) (Song et al. 2008, Mundargi et al. 2008). Este polímero es biodegradable y biocompatible. Presenta baja toxicidad comparada con otros polímeros y es muy apropiado como sistema de liberación en ambientes biológicos, siendo aprobado por la FDA para su utilización en sistemas de liberación controlada de fármacos. Es importante considerar que la estructura química del polímero determinará el comportamiento de las nanopartículas en términos de encapsulación, degradación y liberación del fármaco. El PLGA por ejemplo es un poly(éster) formado por cadenas de ácido láctico y

ácido glicólico, la proporción de cada co-polímero puede variar, lo cual modificará su degradación. Entre los distintos co-polímeros disponibles comercialmente el más utilizado es el que posee la proporción 50:50, ya que presenta la tasa de degradación *in vivo* más rápida (Derakhshandeh et al. 2007). En condiciones fisiológicas, el

PLGA es hidrolizado en ácido láctico y glicólico respectivamente, metabolitos que el organismo se eliminan finalmente en forma de CO₂ y H₂O (Vasir & Labhassetwar 2007).

Figura 1. (A): Elaboración de nanopartículas por emulsión evaporación de solvente. (B): Elaboración de nanopartículas por nanoprecipitación.



3) PROGRESOS EN EL DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

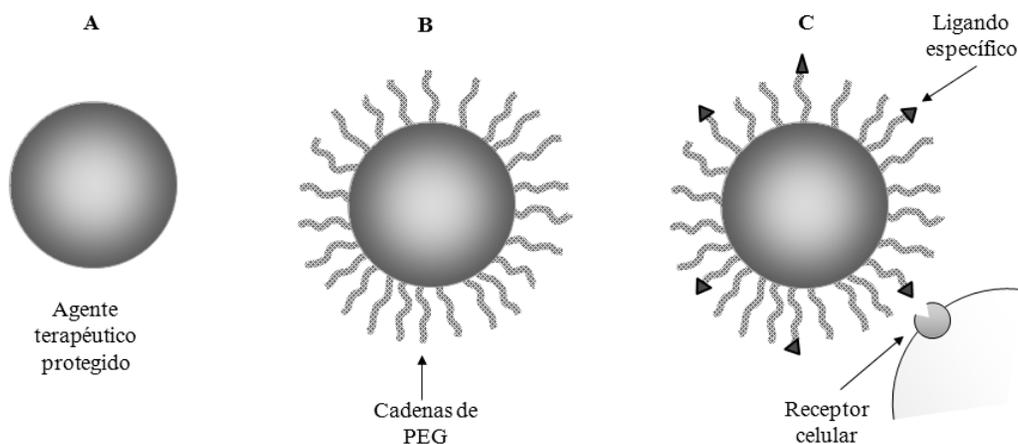
Las nanopartículas poliméricas pueden ser incorporadas al organismo por diversas vías de administración. Cuando éstas se administran por vía intravenosa, deben tener la capacidad de circular libremente por los capilares sanguíneos y no ser reconocidos como un cuerpo extraño. Los primeros nanovectores desarrollados fueron los liposomas, vesículas formadas por una o varias bicapas lipídicas en cuyo interior se encuentra encapsulada la molécula activa. Debido a su gran superficie específica, estudios revelaron que los liposomas, una vez administrados por vía intravenosa, interaccionaban fuertemente con las proteínas plasmáticas, en particular con las opsoninas, fijándose a su superficie (Gregoriadis 1978). Dentro de las propiedades de superficie, la hidrofobicidad de éstos parece ser un factor clave para la opsonización. Similar comportamiento fue reportado cuando se administran por vía endovenosa nanopartículas elaboradas con polímeros hidrófobos como PLA (polímero del ácido láctico), PLGA y PACA (poly(alquilcianoacrilato)), puesto que se verificó una adsorción importante de inmunoglobulinas, complemento y otras proteínas plasmáticas (uniones de van der Waals), produciendo posteriormente su rápida captura por parte de los fagocitos mononucleares presentes en el hígado y bazo (Leroux et al. 1995, Esmaeili et al. 2008, Bertholon et al. 2006, Gibaud et al. 1996). Esta primera generación de vectores (Figura 2 A) fue considerada entonces como ideal para vectorizar fármacos hacia el hígado, en caso de patologías a este nivel, como hepatocarcinomas, o

metástasis hepática, o bien, en caso que se desee administrarlas en medios biológicos confinados.

Con el fin de evitar la captura hepática de las nanopartículas administradas por vía endovenosa y así favorecer la circulación por más tiempo en los vasos sanguíneos alcanzando otros órganos diana, las nanopartículas fueron recubiertas con polímeros hidrófilos y flexibles como el polietilenglicol (PEG) impidiendo que las proteínas plasmáticas se adsorbieran a nivel superficial. Estos vectores no son reconocidos ni capturados por las células de Kupffer, prolongando su vida media (Peracchia et al. 1999, Owens & Peppas 2006). Dado que a nivel tumoral o en presencia de inflamación aumenta la permeabilidad del endotelio, estos vectores pueden atravesarlo y acumularse a este nivel. A estas nanopartículas recubiertas con polímeros hidrófilos se les conoce como de segunda generación (Figura 2 B).

Actualmente están siendo desarrolladas y evaluadas una tercera generación de nanopartículas que contienen ligandos en su superficie (biotina, ácido fólico, hialuronano, etc.), capaces de reconocer receptores sobreexpresados en células cancerosas y fijarse en ellos (Russell-Jones et al. 2004, Low et al. 2008, Turley et al. 2002). Estos sistemas son complejos desde el punto de vista fisicoquímico, pues además de formar la nanopartícula debe incorporarse una capa de polímero hidrófilo (PEG) que evite el reconocimiento por los macrófagos del hígado, y además, un ligando capaz de reconocer ciertas moléculas específicas que se encuentren en esas membranas celulares. Una vez fijada a la célula, el vector es internalizado, liberando el fármaco encapsulado (Figura 2 C).

Figura 2. (A): nanopartículas de primera generación. (B): nanopartículas de segunda generación o pegiladas. (C): nanopartículas de tercera generación o vectores furtivos.



4) INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS

El paso de los agentes terapéuticos a través de la membrana celular en un tejido específico es fundamental especialmente cuando el blanco farmacológico se encuentra a nivel intracelular. Para ello se requiere atravesar varias membranas biológicas (mucosa, endotelio, epitelio), difundir a través de la membrana plasmática y finalmente acceder al organelo blanco. La nanotecnología ofrece posibilidades únicas de superar barreras celulares con el fin de mejorar la liberación de varias moléculas activas, incluyendo las biomacromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). Existen varios mecanismos de internalización celular que son influenciados por las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Estos son la fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas y macropinocitosis (Hillaireau & Couvreur 2009). La actividad farmacológica de la molécula encapsulada depende no sólo del mecanismo de penetración celular, sino que también de su liberación en el citoplasma, ya sea que se encuentre en el ambiente enzimático del lisosoma o bien, directamente en el citoplasma. Con respecto a la fagocitosis, el macrófago ingiere nanopartículas de gran tamaño (0,25 a 3,00 μm) y de superficie hidrófoba, que han sido previamente reconocidas como cuerpo extraño y opsonizadas. Estudios también han revelado que las nanopartículas cargadas (ya sea positiva o negativamente) son más fagocitadas que las partículas neutras (Roser et al. 1998). Al interior del macrófago el fagolisosoma se acidifica debido a una bomba de protones vacuolar localizada en la membrana y adquiere enzimas (incluyendo esterases y catepsinas). Tanto el pH ácido como el contenido enzimático son claves para que las nanopartículas poliméricas se degraden y no generen toxicidad. Por ejemplo, en el caso de las nanopartículas de PLGA, éstas se degradan por mecanismos hidrolíticos facilitados por el pH ácido (Shive & Anderson 1997).

La endocitosis no fagocítica mediada por clatrina puede ser dependiente de receptores. En este caso las nanopartículas internalizadas son aquellas que poseen en su superficie ligandos específicos (tercera generación). Dentro de los ligandos empleados destaca la transferrina, riboflavina y la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Bareford & Swaan 2007). Una vez unida la nanopartícula al receptor, se genera la invaginación de la vesícula, la cual tiene un diámetro cercano a los 120 nm, sin embargo, a pesar de este tamaño, se ha reportado la internalización de nanopartículas de 200 nm (Rejman et al. 2004). Esta vesícula entrega su contenido a los endosomas, los cuales se acidifican por la bomba de protones dependiente de ATP. Los endosomas a su vez, se fusionan con las vesículas lisosomales generando un ambiente hostil que degrada la carga interna (Mukherjee et al. 1997).

Las nanopartículas también pueden ser internalizadas por endocitosis mediada por caveolas, es decir, a través de invaginaciones de la membrana cuyo tamaño es inferior a los 80 nm (Conner & Schmid 2003). Después de la unión a la superficie celular, las partículas se mueven a lo largo de la membrana plasmática hacia las invaginaciones, donde son mantenidas a través de interacciones receptor-ligando (Bareford & Swaan 2007). La vesícula ingresa al citosol donde no existe ningún cóctel enzimático. Esto puede ser ventajoso para las nanopartículas que encapsulan moléculas frágiles altamente sensibles a las enzimas, como péptidos o ácidos nucleicos ya que evitan de la degradación lisosomal (Hillaireau & Couvreur 2009).

Algunos nanocarrier ingresan a las células por macropinocitosis, mecanismo que se caracteriza por la formación de proyecciones membranales sostenidas por una red de filamentos de actina. Se generan grandes vesículas endocíticas, los macropinosomas, con un tamaño del orden de los micrómetros (1-5 μm). El destino intracelular varía dependiendo del tipo de célula, pero en la mayoría de los casos los macropinosomas se acidifican y destruyen. Eventualmente pueden fusionarse con los lisosomas (Hillaireau & Couvreur 2009, Conner & Schmid 2003).

5) CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Considerando la importancia de las propiedades superficiales y características fisicoquímicas de las nanopartículas, éstas deben ser caracterizadas durante su elaboración, de tal manera de poder asociar estas propiedades con el comportamiento *in vitro/in vivo*. Teniendo en cuenta el reducido tamaño de las nanopartículas, el diámetro medio debe ser evaluado a través de métodos altamente sensibles como lo es la difracción láser (light scattering). Existen otras técnicas que además de entregar información con respecto al diámetro medio proporcionan datos relacionados con la forma de las partículas, dentro de ellas se encuentra la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM). Eventualmente, partículas mayores de 100 nm pueden ser evaluadas con un Contador Coulter.

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de la nanopartícula. Esta a su vez, condiciona las interacciones entre estos sistemas y las membranas celulares. Para efectuar esta determinación se emplean técnicas electroforéticas o anemometría láser doppler. Por otro lado, el potencial zeta describe la estabilidad de las dispersiones coloidales. Cuando éste fluctúa entre ± 30 mV, la dispersión coloidal es estable.

La cantidad de fármaco encapsulado puede ser determinado mediante diversas metodologías analíticas como HPLC, HPTLC o espectrofotometría ultravioleta. Para

ello es necesario implementar y validar un apropiado proceso de extracción del fármaco atrapado, ya sea de manera directa (rompiendo las nanopartículas) o indirecta (fármaco no encapsulado en la fase continua). En ambos casos es necesario realizar ultracentrifugación para separar las nanopartículas de la fase continua. Una vez cuantificada la muestra, es posible determinar la eficiencia de encapsulación (%) que define la relación entre la cantidad de fármaco encapsulado y aquel que fue añadido durante la elaboración de las nanopartículas. También puede ser medida la carga (drug loading) relacionando la masa de fármaco encapsulado con la masa de polímero. Por último, es posible determinar el rendimiento del proceso, considerando la cantidad de materia prima empleada durante el proceso de elaboración de nanopartículas y la cantidad de nanopartículas que es posible recuperar una vez que éstas han sido elaboradas.

La interacción principio activo/polímero, así como el estado físico en que se encuentra la molécula activa una vez encapsulada pueden ser determinados empleando técnicas como difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta última también permite evaluar el comportamiento térmico de los componentes de las nanopartículas después de ser sometidas a las condiciones de fabricación.

La liberación del fármaco a partir de las nanopartículas puede ser determinada *in vitro*, empleando bolsas de difusión de diálisis inmersas en soluciones de tampón isotónico, a un pH fisiológico, en condición sink. La cinética de liberación obtenida (% liberado versus tiempo), permitirá comprender los mecanismos involucrados en la entrega de la molécula encapsulada. Por último, es posible efectuar ensayos de viabilidad celular, los cuales darán un indicio del posible daño o efecto que pudieran sufrir los tejidos circundantes al sitio de administración del sistema nanoparticulado, para el cual ha sido diseñado. Con estos datos *in vitro*, será posible planificar estudios *in vivo*, en animales de experimentación.

6) APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Las aplicaciones de la nanotecnología en el ámbito biomédico han sido tema de interés durante las últimas décadas debido a su potencial aporte en enfermedades severas como el cáncer, enfermedades neurológicas e infecciones. En particular los nanocarrier de tercera generación, debido a su especificidad, lo que se traduce en una reducción de la toxicidad y efectos adversos de las moléculas activas encapsuladas.

6.1) Terapia contra el cáncer:

El empleo de nanopartículas en la terapia contra el cáncer ha sido uno de los tópicos más estudiados, como lo respaldan numerosos estudios (Nie et al. 2007, Misra et al.

2010, Bolhassani et al. 2014). En general se han empleado liposomas y nanopartículas poliméricas. Dentro de las formulaciones comerciales a base de liposomas destaca Doxil® (doxorubicina), cuyo tamaño fluctúa entre los 80 y 90 nm; también se encuentra Marqibo®, liposomas de 115 nm que encapsulan vincristina (disminuyendo la neurotoxicidad del fármaco con una elevada semivida plasmática) y Daunoxome®, daunorrubicina en liposomas de 35-60 nm. Con respecto a nanopartículas poliméricas, el quimioterapéutico Paclitaxel (Abraxane®) ha sido uno de los fármacos más evaluados. Éste interfiere con la función de las células cancerígenas por estabilización de los microtúbulos, resultando una apoptosis de la célula tumoral (Koziara et al. 2006). El producto nanotecnológico Abraxane® aprobado el año 2005 para uso clínico corresponde a nanopartículas de albúmina elaboradas usando emulsificación a alta presión (tecnología de la American Biosciences Inc.). Esta formulación ha permitido evitar la hipersensibilidad (debido a su excipiente Cremophor®) generada al usar la formulación Taxol® que existía hasta entonces en el mercado y que obligaba a recurrir a corticosteroides y antihistamínicos como premedicación (Micha et al. 2006). Pero Abraxane® también presenta otras ventajas ya que este nanocarrier mejora el transporte de la molécula activa desde el torrente sanguíneo hasta el sitio tumoral, con una mejor concentración terapéutica si se le compara con el uso de Taxol® (Ibrahim et al. 2002). Esto se debe a que la albúmina interacciona con dos proteínas que la transportan hacia la masa tumoral. Adicionalmente Paclitaxel asociado a nanopartículas ha demostrado una disminución de la resistencia de la célula tumoral a la molécula activa (Koziara et al. 2006).

Las nanopartículas que incorporan ligandos en su estructura han sido ampliamente estudiadas como vectores selectivos para el tratamiento contra el cáncer. El ligando más estudiado es el ácido fólico, debido a la significativa sobreexpresión de los receptores de folato en el tejido tumoral (100 a 300 veces mayor) (Low et al. 2008, Lu et al. 2004). Varios quimioterapéuticos han sido encapsulados en estos sistemas (paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, 5-FU, etc.), mejorando notoriamente la citotoxicidad sobre células cancerosas si se les compara con nanopartículas sin este ligando (Liu et al. 2012, Yang et al. 2008). También se ha estudiado el efecto *in vitro* de nanopartículas cargadas con plásmidos, confirmando una exitosa transfección (Nie et al. 2009). Estudios *in vivo* han evidenciado en el tejido tumoral la acumulación de nanocarriers de tercera generación cargados con quimioterapéuticos y una consecuente reducción en la velocidad de crecimiento dicho tejido (Patil et al. 2009). Las investigaciones además incluyen la combinación de quimioterapéuticos con moléculas magnéticas como el óxido de hierro. Así por ejemplo, cuando se encapsula este compuesto en nanopartículas de quitosano, la aplicación

de un campo magnético externo, permite guiarlas hacia el tejido tumoral (Shen et al. 2012).

Otro ligando que ha sido empleado en nanopartículas de PLA, PLGA o quitosano es el péptido RGD, capaz de reconocer al receptor $\alpha v\beta 3$ integrina que se encuentra sobreexpresado en la neovascularización de áreas subyacentes al tejido tumoral (Zhou et al. 2012, Danhier et al. 2009, Karatas et al. 2009). Un estudio in vivo reportado por Hu y colaboradores efectuado en ratones con cáncer de mama (MDA-MB-435) tratados una vez a la semana con micelas de PLA-PEG-RGD encapsulantes de paclitaxel reveló una significativa actividad apoptótica de las células tumorales con este tratamiento, sin el efecto sistémico asociado a la terapia convencional (Hu et al. 2008). Además de citostáticos (doxorubicina, paclitaxel), se han encapsulado en estos vectores agentes antiangiogénicos (combrestatina)(Wang et al. 2010a).

Los receptores de transferrina, también sobreexpresados en determinados tumores como el cáncer de mama y de próstata, han sido el blanco para la elaboración de nanopartículas funcionalizadas con este ligando, tal como lo reportó Sahoo y colaboradores, en un estudio efectuado in vivo (Sahoo et al. 2004). Se encontró una significativa inhibición del crecimiento tumoral cuando las nanopartículas de paclitaxel fueron decoradas con este ligando, lo cual fue correlacionado a un incremento de la captura de las nanopartículas mediado por el receptor de transferrina.

6.2) El cerebro como órgano diana en enfermedades neurodegenerativas:

Bajo condiciones normales, la barrera hematoencefálica (BHE) limita el pasaje de solutos hacia el sistema nervioso central, bloqueando el paso de sustancias dañinas que circulan en la sangre, como patógenos o agentes tóxicos. Esto obliga a emplear altas concentraciones de moléculas activas para alcanzar niveles terapéuticos en caso de patologías cerebrales, lo cual incrementa el riesgo de presentar efectos adversos. Sin embargo, las propiedades de barrera pueden ser modificadas para permitir el pasaje de agentes terapéuticos. Es así como Calvo y colaboradores demostraron que nanopartículas de poly(cianoacrilato) recubiertas con PEG además de no ser reconocidas por los macrófagos aumentando su vida media circulante, fueron capaces de atravesar la BHE bajo condiciones de encefalomiелitis alérgica experimental en un mayor porcentaje que nanopartículas no recubiertas (Calvo et al. 2001, Calvo et al. 2002). Por otro lado, está comprobado que las características de superficie de las nanopartículas pueden afectar la integridad de la BHE favoreciendo su captura cerebral (Lockman et al. 2003). Los estudios de Kreuter y colaboradores sugieren que el exitoso transporte de nanopartículas recubiertas con polisorbato a través de la BHE se debe a un proceso de endocitosis vía receptor de

lipoproteínas de baja densidad (LDL) luego de la adsorción de apolipoproteína B y/o E sobre las nanopartículas durante su circulación sistémica (Kreuter 2004).

Otra posibilidad evaluada para que los agentes terapéuticos atraviesen el endotelio cerebral se basa en favorecer las interacciones por carga (Nicolas et al. 2013). Es así como moléculas policationicas pueden ser internalizadas de manera eficiente después de su unión a las células cargadas negativamente. Al respecto, el trimetil quitosano ha sido evaluado junto al PLGA como material polimérico útil para facilitar el ingreso de nanopartículas a través de la BHE cargadas con coenzima Q10 (Wang et al. 2010b). Estas fueron evaluadas in vivo en un modelo animal con enfermedad de Alzheimer, observándose mejorías en cuanto a memoria y aprendizaje, además de una disolución de placas seniles, comparado con el control. También han sido usadas nanopartículas de tercera generación para vectorizar moléculas terapéuticas al SNC. Para seleccionar el ligando adecuado se han efectuado estudios con lactoferrina, una glicoproteína de la familia de las transferrinas, útil para la incorporación de quimioterapéuticos y moléculas neuroprotectoras (Hu et al. 2009, Yu et al. 2012). Estudios in vivo de biodistribución empleando nanopartículas de PLGA-PEG-lactoferrina encapsulantes de cumarina 6, demostraron una extensa distribución de fluorescencia en la corteza, sustancia nigra, tercer ventrículo y regiones periventriculares. Cuando se encapsuló en estas partículas urocortina, un agente neuroprotector y se evaluó su eficacia en un modelo de Parkinson en ratas (6-OHDA), se observó una reducción en la actividad rotatoria inducida por apomorfina, confirmando así su actividad antiparkinsoniana, además de una acumulación en el cerebro (Hu et al. 2011).

6.3) Tratamiento de infecciones:

Las nanopartículas pueden ser consideradas poderosas herramientas para el tratamiento de infecciones, debido a que éstas son usualmente captadas por las células por endocitosis, lo cual podría beneficiar la liberación del fármaco en el caso de infecciones intracelulares. Además, debido a la posibilidad de controlar y prolongar la liberación de las moléculas encapsuladas, las nanopartículas cargadas con antibióticos podrían ser muy útiles en la prevención o tratamiento de infecciones locales (Danhier et al. 2012).

Numerosos son los antibióticos que han sido encapsulados en nanopartículas poliméricas. Rifampicina y azitromicina, por ejemplo, fueron encapsulados en nanopartículas de PLGA. Estudios de captura celular demostraron que las nanopartículas fueron eficientemente concentradas en células infectadas con Chlamydia, aumentando la efectividad de los antibióticos al reducir la carga microbiana (Toti et al. 2011). Por otro lado, nanopartículas de PLGA cargadas con gentamicina, fueron fagocitadas por

monocitos alcanzando el bazo e hígado, órganos diana de la brucelosis (Lecaroz et al. 2006, Lecaroz et al. 2007). Ciprofloxacino también ha sido encapsulado en nanopartículas de PLGA siendo éstas evaluadas in vivo, observando una inhibición efectiva en el crecimiento de *Escherichia coli* debido a las características de liberación sostenida de las nanopartículas (Jeong et al. 2008). Por otro lado, micelas poliméricas cargadas con este antibiótico y, recubiertas con PEG-TAT, un péptido activador, fueron capaces de atravesar la BHE, después de ser administradas por vía endovenosa (Liu et al. 2008). La liberación de agentes antivirales también ha sido estudiada empleando nanopartículas poliméricas. Numerosas investigaciones se enfocan en el citomegalovirus, empleando nanopartículas cargadas con aciclovir o ganciclovir para el tratamiento de infecciones locales a nivel intraocular ya sea por instilación o administradas directamente en el segmento posterior del ojo (Fresta et al. 2001, Merodio et al. 2001, Giannavola et al. 2003). Si bien la eficacia terapéutica aumenta considerablemente, el rápido clearance intravitreal hace suponer que un implante elaborado con biopolímeros sería una alternativa más promisoriosa.

Considerando como blanco terapéutico a los macrófagos (reservorio de virus), se han evaluado nanoesferas de poly(alquilocianoacrilato) cargadas con azidotimidina (AZT). Estudios in vivo demostraron que estas nanopartículas fueron capaces de concentrar AZT en los macrófagos del sistema reticuloendotelial después de administración endovenosa (Lobenberg et al. 1998). Recientes investigaciones muestran que nanocápsulas con corazón acuoso pueden encapsular la forma activa del AZT (trifosfato) (demasiado hidrofílico para atravesar la célula). Estas nanopartículas funcionaron exitosamente in vitro, sin embargo, el costo y la complejidad de trabajar con un modelo animal infectado por HIV parecen retardar la investigación.

Si bien existen pocos estudios in vivo sobre sistemas de liberación de fármacos para tratar HIV, De Jaeghere y colaboradores desarrollaron nanopartículas pH-sensibles elaboradas a base de PLA y copolímeros del ácido metacrílico cargadas de un agente antiviral inhibidor de la proteasa, (CPG 70726), demostrando su eficacia para aumentar la biodisponibilidad oral de esta molécula (De Jaeghere et al. 2000).

7) CONCLUSIONES

Los aspectos tratados en este artículo de revisión constituyen sólo una pequeña fracción de las investigaciones realizadas en torno a la nanotecnología con aplicación terapéutica. Las nanopartículas poliméricas ofrecen una plataforma versátil y robusta para mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos convencionales. Los

esfuerzos se han centrado en emplear materiales biocompatibles y biodegradables que permitan la obtención de nanosistemas con características óptimas dependiendo de la vía de administración y el blanco terapéutico. Dentro de estas características parece ser el tamaño y la carga superficial las que condicionan el mecanismo por el cual las nanopartículas ingresan a la célula. La incorporación de moléculas hidrófilas y ligandos en su superficie, ha permitido aumentar la vida media de las nanopartículas y mejorar la especificidad de la terapia, lo que ha resultado en poderosas herramientas terapéuticas capaces de reducir los efectos adversos indeseables incluso de moléculas altamente complejas como las que han sido revisadas en este artículo.

AGRADECIMIENTOS:

Proyecto Fondecyt N°1140706.

BIBLIOGRAFÍA:

- Bareford, L. M. and Swaan, P. W. (2007) Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, 748-758.
- Bertholon, I., Vauthier, C. and Labarre, D. (2006) Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharm Res*, 23, 1313-1323.
- Bolhassani, A., Javanad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M. R. and Sadat, S. M. Polymeric nanoparticles: Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 10.
- Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 631-651.
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H. et al. (2001) Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm Res*, 18, 1157-1166.
- Calvo, P., Gouritin, B., Villarroja, H., Eclancher, F., Giannavola, C., Klein, C., Andreux, J. P. and Couvreur, P. (2002) Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur J Neurosci*, 15, 1317-1326.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. and Preat, V. (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161, 505-522.
- Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N. et al. (2009) Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *J Control Release*, 140, 166-173.
- De Jaeghere, F., Allemann, E., Kubel, F., Galli, B., Cozens, R., Doelker, E. and Gurny, R. (2000) Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. *J Control Release*, 68, 291-298.

- De Jong, W. H. and Borm, P. J. (2008) Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3, 133-149.
- Derakhshandeh, K., Erfan, M. and Dadashzadeh, S. (2007) Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. *Eur J Pharm Biopharm*, 66, 34-41.
- Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Esmaeili, B., Khoshayand, M. R., Atyabi, F. and Dinarvand, R. (2008) PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm*, 349, 249-255.
- Fresta, M., Fontana, G., Bucolo, C., Cavallaro, G., Giammona, G. and Puglisi, G. (2001) Ocular tolerability and in vivo bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J Pharm Sci*, 90, 288-297.
- Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M. A., Puglisi, G., Lee, V. H. and Fresta, M. (2003) Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res*, 20, 584-590.
- Gibaud, S., Demoy, M., Andreux, J. P., Weingarten, C., Gouritin, B. and Couvreur, P. (1996) Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J Pharm Sci*, 85, 944-950.
- Gregoriadis, G. (1978) Liposomes in the therapy of lysosomal storage diseases. *Nature*, 275, 695-696.
- Hillaireau, H. and Couvreur, P. (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2873-2896.
- Hu, K., Li, J., Shen, Y., Lu, W., Gao, X., Zhang, Q. and Jiang, X. (2009) Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: in vitro and in vivo evaluations. *J Control Release*, 134, 55-61.
- Hu, K., Shi, Y., Jiang, W., Han, J., Huang, S. and Jiang, X. (2011) Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *Int J Pharm*, 415, 273-283.
- Hu, Z., Luo, F., Pan, Y., Hou, C., Ren, L., Chen, J., Wang, J. and Zhang, Y. (2008) Arg-Gly-Asp (RGD) peptide conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) micelle for targeted drug delivery. *J Biomed Mater Res A*, 85, 797-807.
- Ibrahim, N. K., Desai, N., Legha, S. et al. (2002) Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 8, 1038-1044.
- Jena, M., Mishra, S., Jena, S. and Mishra, S. (2013) Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 2, 353-359.
- Jeong, Y. I., Na, H. S., Seo, D. H. et al. (2008) Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int J Pharm*, 352, 317-323.
- Karatas, H., Aktas, Y., Gursoy-Ozdemir, Y. et al. (2009) A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci*, 29, 13761-13769.
- Koziara, J. M., Whisman, T. R., Tseng, M. T. and Mumper, R. J. (2006) In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *J Control Release*, 112, 312-319.
- Kreuter, J. (2004) Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*, 4, 484-488.
- Kreuter, J. (2007) Nanoparticles--a historical perspective. *Int J Pharm*, 331, 1-10.
- Lecaroz, C., Gamazo, C. and Blanco-Prieto, M. J. (2006) Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J Nanosci Nanotechnol*, 6, 3296-3302.
- Lecaroz, M. C., Blanco-Prieto, M. J., Campanero, M. A., Salman, H. and Gamazo, C. (2007) Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1185-1190.
- Leroux, J. C., De Jaeghere, F., Anner, B., Doelker, E. and Gurny, R. (1995) An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci*, 57, 695-703.
- Liu, L., Venkatraman, S. S., Yang, Y. Y., Guo, K., Lu, J., He, B., Mochhala, S. and Kan, L. (2008) Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier. *Biopolymers*, 90, 617-623.
- Liu, Q., Shen, Y., Chen, J., Gao, X., Feng, C., Wang, L., Zhang, Q. and Jiang, X. (2012) Nose-to-brain transport pathways of wheat germ agglutinin conjugated PEG-PLA nanoparticles. *Pharm Res*, 29, 546-558.
- Lobenberg, R., Araujo, L., von Briesen, H., Rodgers, E. and Kreuter, J. (1998) Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *J Control Release*, 50, 21-30.
- Lockman, P. R., Koziara, J., Roder, K. E., Paulson, J., Abbruscato, T. J., Mumper, R. J. and Allen, D. D. (2003) In vivo and in vitro assessment of baseline blood-brain barrier parameters in the presence of novel nanoparticles. *Pharm Res*, 20, 705-713.
- Low, P. S., Henne, W. A. and Doorneweerd, D. D. (2008) Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc Chem Res*, 41, 120-129.
- Lu, Y., Segal, E., Leamon, C. P. and Low, P. S. (2004) Folate receptor-targeted immunotherapy of cancer: mechanism and therapeutic potential. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 1161-1176.
- Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M. J. and Irache, J. M. (2001) Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci*, 12, 251-259.
- Micha, J. P., Goldstein, B. H., Birk, C. L., Rettenmaier, M. A. and Brown, J. V., 3rd (2006) Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions. *Gynecol Oncol*, 100, 437-438.
- Misra, R., Acharya, S. and Sahoo, S. K. (2010) Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today*, 15, 842-850.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*, 77, 759-803.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P. and Aminabhavi, T. M. (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*, 125, 193-209.

- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N. and Couvreur, P. (2013) Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*, 42, 1147-1235.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J. and Simons, J. W. (2007) Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 257-288.
- Nie, Y., Zhang, Z., Li, L., Luo, K., Ding, H. and Gu, Z. (2009) Synthesis, characterization and transfection of a novel folate-targeted multipolymeric nanoparticles for gene delivery. *J Mater Sci Mater Med*, 20, 1849-1857.
- Owens, D. E., 3rd and Peppas, N. A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 307, 93-102.
- Patil, Y. B., Toti, U. S., Khadair, A., Ma, L. and Panyam, J. (2009) Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials*, 30, 859-866.
- Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J. P., Gomis, J. M., Appel, M., d'Angelo, J. and Couvreur, P. (1999) Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release*, 60, 121-128.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. and Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 377, 159-169.
- Roser, M., Fischer, D. and Kissel, T. (1998) Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, 46, 255-263.
- Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J. and Nowotnik, D. (2004) Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J Inorg Biochem*, 98, 1625-1633.
- Sahoo, S. K., Ma, W. and Labhasetwar, V. (2004) Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int J Cancer*, 112, 335-340.
- Shen, J. M., Guan, X. M., Liu, X. Y., Lan, J. F., Cheng, T. and Zhang, H. X. Luminescent/Magnetic Hybrid Nanoparticles with Folate-Conjugated Peptide Composites for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Bioconjug Chem*. 2012 May 16;23(5):1010-21.
- Shive, M. S. and Anderson, J. M. (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 28, 5-24.
- Song, X., Zhao, Y., Wu, W., Bi, Y., Cai, Z., Chen, Q., Li, Y. and Hou, S. (2008) PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Int J Pharm*, 350, 320-329.
- Toti, U. S., Guru, B. R., Hali, M., McPharlin, C. M., Wykes, S. M., Panyam, J. and Whittum-Hudson, J. A. (2011) Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 6606-6613.
- Turley, E. A., Noble, P. W. and Bourguignon, L. Y. (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, 277, 4589-4592.
- Vasir, J. K. and Labhasetwar, V. (2007) Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, 718-728.
- Viswanathan, S., Han, C. and Kelvin, W. (2010) Nanotechnology in biomedical applications: a review. *Int. J. of Nano and Biomaterials*, 3, 119-139.
- Wang, Y., Yang, T., Wang, X., Wang, J., Zhang, X. and Zhang, Q. (2010a) Targeted polymeric micelle system for delivery of combretastatin A4 to tumor vasculature in vitro. *Pharm Res*, 27, 1861-1868.
- Wang, Z. H., Wang, Z. Y., Sun, C. S., Wang, C. Y., Jiang, T. Y. and Wang, S. L. (2010b) Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials*, 31, 908-915.
- Yang, X., Deng, W., Fu, L., Blanco, E., Gao, J., Quan, D. and Shuai, X. (2008) Folate-functionalized polymeric micelles for tumor targeted delivery of a potent multidrug-resistance modulator FG020326. *J Biomed Mater Res A*, 86, 48-60.
- Yu, Y., Pang, Z., Lu, W., Yin, Q., Gao, H. and Jiang, X. (2012) Self-assembled polymersomes conjugated with lactoferrin as novel drug carrier for brain delivery. *Pharm Res*, 29, 83-96.
- Zhou, J., Patel, T. R., Fu, M., Bertram, J. P. and Saltzman, W. M. (2012) Octa-functional PLGA nanoparticles for targeted and efficient siRNA delivery to tumors. *Biomaterials*, 33, 583-591.

ABSTRACT

The therapeutic nanotechnology is a relatively recent tool in the field of pharmaceutical sciences, which has revolutionized modern medicine. This discipline involves the use of nanoparticles as systems of targeting, protection and controlled release of therapeutic interest molecules, with size ranging in the order of nanometers. These vectors can improve the biodistribution of fragile or complex molecules and facilitate their interaction with specific sites, while protecting healthy tissue. To perform these functions, they should be made from biocompatible and biodegradable materials to ensure safety and to provide desired properties depending on the therapeutic purpose. Among these materials, including polymers, due to their physico-chemical nature and properties of functionalization with specific ligands to be recognized by receptors overexpressed on the surface of certain cells. Medical applications of polymeric nanoparticles are diverse, and may be useful as an effective means of diagnosis and / or therapeutic tools against severe pathologies such as neurodegenerative diseases, infections and cancer. This review article details the most relevant aspects for the production of these systems as well as applications of nanotechnology in medicine.

Keywords: Nanomedicine, Nanotechnology, nanoparticles, targeting, Drug Delivery Systems and Polymers.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 7-16

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 10-05-2014

ARTÍCULO ORIGINAL

DESARROLLO DE UN CARRIER NANOPARTICULADO COMO ESTRATEGIA DE TRANSPORTE A TRAVÉS DEL SISTEMA NERVIOSO

(Development of nanoparticulate carrier as a transport strategy through the nervous system)

Eileen Castillo¹, Guillermo Jiménez¹, Carolina Gómez-Gaete¹ y Carlos von Plessing^{1,*}

¹Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

RESUMEN

En esta investigación se desarrollaron y caracterizaron nanopartículas de quitosano a través del método de gelificación iónica donde se usó como agente entrecruzante tripolifosfato de sodio (TPP). Se analizó la influencia de distintos parámetros como la relación en masa quitosano/TPP, pH, tiempo, velocidad y tipo de agitación, sobre las nanopartículas formadas, así como también su traspaso a través de la barrera hematoencefálica. El método fue altamente reproducible y robusto, donde se obtuvo nanopartículas con un diámetro medio de $77 \pm 0,8$ nm, de distribución normal, con un índice de polidispersión de 0,22. Las nanopartículas además tuvieron forma irregular y superficie lisa, con un potencial zeta positivo de $29,8 \pm 2,0$ mV. Una vez desarrolladas las nanopartículas se realizaron pruebas in vivo en ratas Sprague Dawley donde se administraron vía intravenosa dos formulaciones. En la formulación que contenía quitosano/tripolifosfato y polisorbato 80 (agente incorporado para mejorar las propiedades de superficie), se observó un aumento de la presencia de nanopartículas cercana a las neuronas tanto del hipocampo como del neocórtex, así como también en las paredes de los vasos de la microcirculación cerebral.

Palabras Claves: Quitosano, gelificación iónica, nanopartículas, barrera hematoencefálica

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 17-24

Recivido 01-04-2014; Revisado 01-05-2014; Aceptado 10-05-2014

1) INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC), es una compleja e importante red de tejidos y tipos celulares, de importancia fundamental para un organismo. Está encargado de la regulación de la mayoría de la funciones del organismo, que van desde simples actos reflejos, hasta elaborados procesos cognitivos. Este sistema debe protegerse de sustancias y daños físicos que puedan afectar su normal funcionamiento y homeostasis, esto se realiza por la llamada barrera hematoencefálica (BHE) (Kandel et al. 2003, Purves et al. 2001).

Las células especializadas de la BHE tienen un transporte vesicular escaso y no están fenestradas, estas células están adheridas unas a otras por complejas uniones estrechas, las cuales dificultan la difusión de sustancias hacia el líquido cefalorraquídeo (Kandel et al. 2003, Purves et al. 2001).

Debido a la selectividad que presenta la BHE se ve dificultado el ingreso de fármacos de naturaleza hidrófila al sistema nervioso central. Así ocurre con muchos agentes terapéuticos que necesitan llegar al cerebro para mostrar su efecto farmacológico, como por ejemplo los

anticonvulsivantes, antidepresivos, antibióticos y los fármacos para enfermedades neurodegenerativas, como lo son el Alzheimer y el Parkinson (Xu et al. 2007).

Con el aporte de la tecnología farmacéutica se han desarrollado nuevas estrategias que solucionarían este problema, siendo el uso de nanopartículas (NP) como sistema de entrega de fármacos a nivel del sistema nervioso central, una de estas soluciones. Los resultados son dispares ya sea por la baja concentración de NP que traspasan la BHE o el uso de polímeros de gran toxicidad para ésta (Zhang et al. 2012).

Los materiales nanoestructurados son materiales con tamaños en el rango comprendido entre 1 y 1000 nm (Xu et al. 2007). Las NP pueden ser obtenidas a partir de diversos métodos de elaboración, como los son el método emulsión evaporación de solvente o gelificación iónica, así como con diferentes tipos de matrices, ya sea iones metálicos como el oro, plata y cobre, o polímeros de origen natural o sintético; como por ejemplo el quitosano (natural), y los poliácrilatos (sintéticos).

Correspondencia a: Dr. Carlos von Plessing R., Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Barrio Universitario S/N, Casilla 237, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-2203019, Fax: 56-41-2207086, Correo electrónico: cvonples@udec.cl

La selección del polímero base depende de muchos factores como: el tamaño deseado de las NP, las propiedades del principio activo (solubilidad en agua, estabilidad, etc.), las características de superficie y funcionalidad, grado de biodegradación y biocompatibilidad y el perfil de liberación del principio activo en el producto final (Mukherjee et al. 2009., Mahapatro et al. 2011).

Uno de los polímeros usados en la elaboración de NP es el quitosano. Este polímero es un polisacárido compuesto por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina, 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa, derivado de la desacetilación parcial de la quitina, la cual es generalmente obtenida del exoesqueleto de crustáceos y hongos (Rudzinski et al. 2010). Respecto a las propiedades del quitosano para la elaboración de NP, el grado de desacetilación (DD) y el peso de la cadena del polímero (MW), son muy influyentes, en cuanto al tamaño, morfología, tipo de superficie y porcentaje de encapsulación del principio activo en las NP (Aranaz et al. 2009, Goycoolea et al. 2009).

El tripolifosfato de sodio (TPP), es un compuesto inorgánico con fórmula $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Se trata de la sal de sodio del polifosfato penta-anión, que es una base conjugada del ácido trifosfórico. Es usado como agente entrecruzante para la formación de las NP, al tener cinco cargas negativas que interaccionan con las cargas positivas que posee el contraión (Zhao Jiayin 2006, Nicoleta Butoescu 2008, Theerasak Rojanarata 2008).

La gelificación iónica entre el quitosano y el TPP ha sido utilizada en diversos estudios y dentro de ellos el tamaño de las NP toma un valor preponderante. En los últimos 3 años, más de 60 publicaciones han acreditado un tamaño inferior a los 200 nm, pero sólo un 4% fluctúa entre los 10 – 50 nm y un 18% entre los 50 – 100 nm (Zhao Jiayin et al. 2006, Butoescu et al. 2008, Rojanarata et al. 2008). Esta característica, hace que la obtención de NP con un tamaño inferior a los 100 nm sea un factor de gran relevancia, cuando se pone en juego la internalización de éstas en distintos tipos de tejidos, favoreciendo el proceso de mucoadhesión de las mismas, proceso que aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre las membranas y las NP, lo cual, permite una liberación del principio activo óptima, reduciendo así la necesidad de administración de varias dosis en un corto tiempo, siendo ésta una de las características más relevantes para las nuevas formas farmacéuticas (Zhao Jiayin et al. 2006, Butoescu et al. 2008, Rojanarata et al. 2008).

Considerando la información anteriormente expuesta se piensa que el uso de NP de quitosano, podría servir como un carrier hacia el sistema nervioso central, por su capacidad de interacción con las uniones estrechas presentes en las células especializadas que conforman la

BHE. De esta manera, surge la necesidad de optimizar la elaboración de NP a base de quitosano y TPP para evaluar su transporte a través de la BHE.

2) MATERIALES Y MÉTODOS

2.1) Materiales:

Protasan UP CL 113, Novamatrix, tripolifosfato penta sódico, Merck, ácido acético 100%, grado análisis, Merck, ácido Clorhídrico 1 N, fluoresceína de isotiocianato, grado análisis, Sigma Aldrich-Chemic GmbH, placas de sílica gel 60 F254 espesor de capa 0,25 mm, Merck. Equipo HPTLC Camag, aplicador automático ATS 4, Automatic TLC Sampler 4, Camag, fotografías con Reproscann 3, Camag, TLC Scanner 3 y programa WinCATs 1.4.3, Camag, Suiza para el análisis de las muestras.

2.2) Métodos:

2.2.1) Elaboración de nanopartículas de quitosano.

Las nanopartículas fueron preparadas utilizando el método de gelificación iónica, basándose en modificaciones efectuadas al método descrito por Calvo et al. (Zhao Jiayin et al. 2006, Butoescu et al. 2008, Rojanarata et al. 2008). El quitosano (Protasan® CL 113) fue disuelto en una solución de ácido acético al 1%, obteniéndose una solución final de quitosano con concentraciones que fluctuaron entre 0,05 – 0,25 % p/v. El TPP, utilizado como agente entrecruzante, fue disuelto en agua nanopura, en concentraciones que fluctuaron entre 0,1 – 0,2 % p/v. La obtención de NP de quitosano se realizó mezclando ambas soluciones, en diferentes proporciones con agitación magnética o agitación a alta velocidad.

2.2.2) Método de incorporación del marcador fluorescente.

En un primer paso, se disolvió 250 mg de quitosano (Protasan® UP CL 113) en 25 mL de agua nanopura y 10 mg de tiocianato de fluoresceína (FITC) fueron disueltos en 1 mL de etanol. Ambas soluciones fueron mezcladas, con agitación magnética permanente por 24 horas en una pieza oscura temperada a 37°C. El conjugado resultante fue purificado por diálisis, durante 72 horas, (empleando tubos de diálisis de tamaño de poro 12 KDa), cambiando el medio cada 24 horas. La solución aislada de Quitosano-FITC, fue congelada a -55 °C en un baño de etanol, y posteriormente liofilizada, para extraer completamente el solvente residual.

2.2.3) Determinación del porcentaje de unión entre quitosano y FITC.

Se evaluó la incorporación del FITC unido al quitosano, para ello se realizó una curva de calibración con un rango de concentraciones entre 0,1 y 0,6 ng/μL en metanol. La cuantificación se realizó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), para ello se utilizaron placas de sílica gel de 20x10 cm², y el desarrollo se realizó en cámaras simples con una fase móvil de

cloroformo/acetona 90/10 % v/v. las placas previamente se lavaron con metanol y fueron activadas a 90°C por 15 minutos. Para la cuantificación se utilizó una lámpara de mercurio con una longitud de onda de trabajo (λ) de 366 nm. Para el cálculo del porcentaje de unión entre el quitosano y el FITC, se sembraron dos volúmenes de 20 y 30 μ L de la solución de 0,5 mg/mL de quitosano-FITC. Con las áreas obtenidas, por medio de HPTLC, de los estándares de FITC y de la muestra de quitosano-FITC, se calculó su porcentaje de unión.

2.2.4) Elaboración de NP fluorescentes de quitosano-FITC /TPP recubiertas de polisorbato 80.

Debido a las características de superficie que otorga el polisorbato 80 a las NP, respecto a su incorporación al SNC (Karsten Ulbrich 2009), éste fue incluido como agente de recubrimiento. Para ello el quitosano-FITC fue disuelto en agua nanopura y su pH fue ajustado a 4,5. La solución de TPP fue mezclada junto con el polisorbato 80 (1% v/v) por 24 horas, para luego, proceder con la elaboración de las NP.

2.2.5) Caracterización de las NP.

En la caracterización de las NP obtenidas, se evaluó su tamaño, morfología y carga eléctrica.

- **Microscopía electrónica de transmisión (TEM):**

La observación de NP se realizó depositando una gota de suspensión sobre una grilla de cobre cubierta por una película de carbón, la que se dejó secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas. En ellas, se evaluó la presencia de micropartículas, NP y polímero disperso presente en la suspensión. Este método se utilizó para evaluar todas las muestras de las suspensiones obtenidas.

- **Dispersión dinámica de la luz:**

El análisis de dispersión dinámica de la luz, se realizó con el equipo Zetasizer ZS90 para determinar tamaño y distribución de tamaño de la suspensión de NP. Las suspensiones fueron irradiadas por un láser y producto del movimiento browniano de las partículas y la dispersión del láser, el equipo puede interpretar estas señales como los tamaños de las NP presentes. Las muestras fueron filtradas previamente por membranas de Nylon (diámetro de poro 0,45 μ m), diluidas con agua nanopura en proporción 2:1 y depositadas en una cubeta de poliestireno. Las mediciones fueron realizadas por triplicado, a una temperatura de 25°C y en un ángulo de 90°.

- **Potencial Zeta:**

El análisis de potencial Zeta se realizó con el equipo Zetasizer ZS90, el principio de esta medición es la aplicación de un campo eléctrico a una celda, en este caso una cubeta especial de policarbonato que posee celdas conductoras. La medición del potencial zeta se realiza por

electroforesis de láser Doppler. Las muestras de las suspensiones fueron medidas directamente y diluidas en proporción 2:1, desde las celdas de conducción. Cada análisis se realizó por triplicado a 25 ° C.

2.2.6) Ensayos in vivo.

Una vez caracterizadas las NP, y con el objetivo de verificar el traspaso a través de la BHE por parte de las NP se realizaron ensayos in vivo. Estos ensayos se efectuaron según el protocolo de uso de animales de la Universidad de Concepción. Para ello se emplearon 5 ratas de raza Sprague Dawley, machos y hembras de peso entre los 250 y 450 gramos. La suspensión de NP fue administrada por vía intravenosa (IV). Las tablas N° 1 y 2 resumen las condiciones del estudio:

Tabla 1. Formulaciones administradas en estudio in vivo.

Formulación	Composición NP	Recubrimiento polisorbato 80
N°1	quitosano-FITC/TPP	No
N°2	quitosano-FITC/TPP	Si
Control	NaCl 0,9 % p/v.	No

Tabla 2. Estudio in vivo.

Rata N°	Volumen administrado* [μ L]	Formulación administrada	Vía de administración	Tiempo de sacrificio [min.]
1 - 2	500	1°	IV	60
3 - 4	300	2°	IV	60
5	300	Control	IV	60

*Los volúmenes inyectados fueron calculados de acuerdo al peso de cada rata. La concentración de la suspensión estaba bajo la DL50 de todos los componentes de la formulación.

Una vez sacrificados los animales, se procedió a extraer su cerebro, hígado y bazo. Se depositaron en una solución de fijador, compuesta por paraformaldehído al 4 % y buffer fosfato salino (PBS) 1 M. Posteriormente éstos se cortaron para mejorar la penetración del fijador y se guardaron por 24 horas a temperatura ambiente.

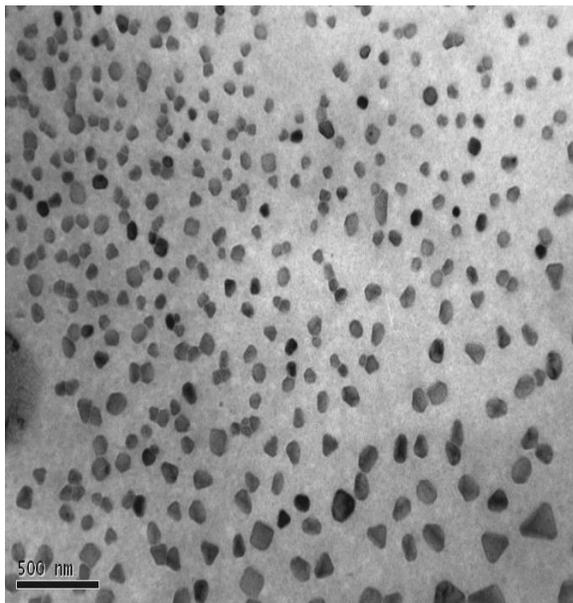
Los cortes histológicos de los diferentes órganos se realizaron con un vibratomo. Los cortes de cerebro tuvieron un espesor entre los 50-60 μ m, 40 μ m para hígado y 30 μ m para bazo. Los cortes de cerebro fueron teñidos mediante tinción Dapi, por inmersión durante 30 minutos (1/1000 en PBS). Posteriormente los cortes fueron observados por microscopía confocal y microscopía confocal espectral (Microscopio confocal Espectral LSM780 NLO, Zeiss).

3) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1) Elaboración de nanopartículas de quitosano:

Se elaboraron NP de quitosano a través del método de gelificación iónica usando una solución de tripolifosfato de sodio como agente entrecruzante, Fig. 1.

Figura 1. NP de quitosano/TPP observadas por TEM, escala 500 nm.



Se obtuvieron suspensiones de color blanquecino con partículas cuyo diámetro medio fluctuó alrededor de los 500 nm. La posterior optimización de los parámetros de proceso, permitió la reducción estadísticamente significativa del diámetro medio a $77 \text{ nm} \pm 0,8 \text{ nm}$ (valor $p < 0,05$) (Software GraphPat Instant 3), con un índice de polidispersión de 0,22 y un potencial zeta positivo de $29,8 + 2,0 \text{ mV}$. El valor del índice de polidispersidad refleja una distribución de tamaño de partícula estrecha, unimodal y homogénea. Este potencial presente en la formulación refleja la fuerte repulsión, la falta de agregación de las partículas y por lo tanto una buena estabilidad física de la suspensión, lo que puede atribuirse a la carga positiva del quitosano, situado en la superficie de las partículas. Los análisis por TEM revelaron la existencia de NP de forma irregular, relativamente monodispersas. Para los propósitos de los estudios in vivo las NP bajo los 100 nm se pueden utilizar para estudios de traspaso de la BHE (Akta et al. 2005).

3.2) Determinación del porcentaje de unión entre quitosano y FITC.:

Para la cuantificación del complejo quitosano-FITC, se realizó una curva de calibración, de FITC en metanol, en un rango de concentraciones que fluctuó entre 0,1- 0,6 ng/ μL . Se sembraron 20 y 30 μL de la muestra de Quitosano-FITC al 0,5 mg/mL, previamente diluida en el mismo solvente. El porcentaje de unión al quitosano fue de un 0,78 % promedio. Aun cuando este valor es inferior al 1 % , el FITC como fluorocromo es capaz de ser detectado en microscopia confocal con valores de fijación desde 0,2%, debido a la intensidad de su luz de emisión que se produce al ser excitada por una luz de longitud de onda de aproximadamente 495 nm (azul), como resultado de esto el FITC emite una luz de color verde cuya longitud de onda está alrededor de 519 nm la cual es fácilmente detectada por el equipo utilizado.

3.3) Elaboración de NP marcadas con FITC recubiertas con polisorbato 80:

Para obtener NP marcadas con FITC y recubiertas con polisorbato 80 se procedió utilizando una modificación de la técnica descrita por Sharma, V., Ali, M., donde el polisorbato 80 fue añadido a la solución de TPP (Sharma et al. 2007). Finalmente se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento iónico para la formación de las NP, con la solución de quitosano. Las suspensiones obtenidas fueron analizadas por dispersión dinámica de la luz para conocer su diámetro medio (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de tamaños de NP marcadas con FITC.

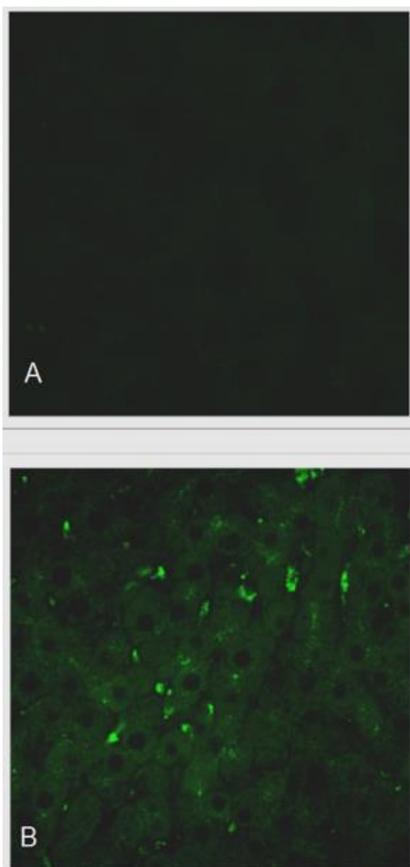
Composición de NP	Diámetro promedio $\pm \text{DS}$ [nm].	PDI
Quitosano/TPP/ sin polisorbato 80	131 ± 13	0,23
Quitosano/TPP/ con polisorbato 80	75 ± 11	0,46

Se evidenciaron NP de FITC cuyos diámetros medios fluctuaron entre 75 y 130 nm, en presencia o no de polisorbato 80, respectivamente. Con estas NP se realizaron las siguientes pruebas para verificar su traspaso al SNC.

3.4) Ensayos *in vivo*:

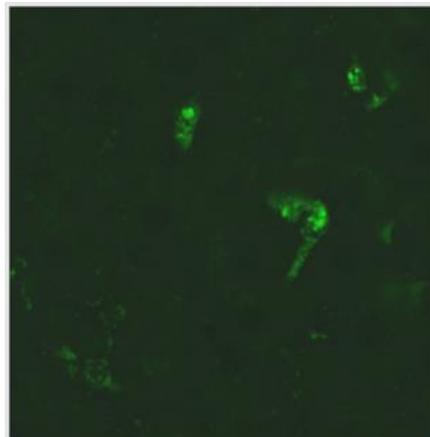
En el análisis histológico del hígado de la rata control se pudo apreciar escasas de fluorescencia (Fig. 2-A), a diferencia de aquel obtenido de ratas que recibieron la suspensión de NP N°1 (Fig. 2-B), donde es posible observar a las NP dentro de los hepatocitos, además de una mayor fluorescencia en los vasos de este órgano. La llegada de la formulación al hígado, da cuenta de éste como parte del sistema reticular, siendo el depurador de sustancias que ingresan al torrente sanguíneo (Costanzo, L. 2011).

Figura 2. (A) Hígado control, administración IV de suero fisiológico. (B) Hígado de rata administración IV, suspensión NP N°1. Análisis realizado mediante Microscopia Confocal [MC].



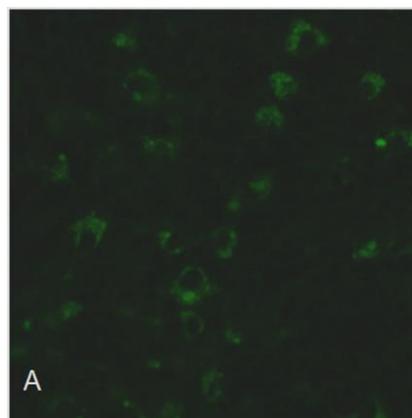
En la formulación de NP que fue recubierta por polisorbato 80 (Fig. 3), se pudo observar la disminución de NP dentro de los hepatocitos, pero aún así éstas se encuentran presentes en los vasos de este órgano. Esto permitió comprobar la eficacia del recubrimiento para ayudar a las NP a sortear este órgano del sistema reticular (Ulbrich et al. 2009).

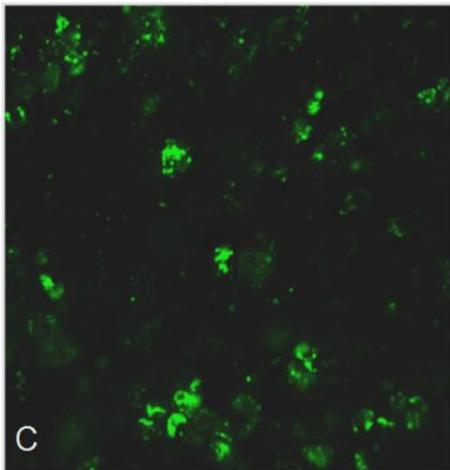
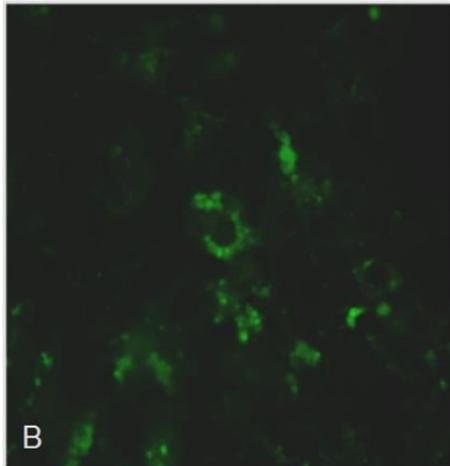
Figura 3. Hígado de rata, administración IV de suspensión NP N°3. MC



En el análisis del bazo de las ratas (Fig. 4) órgano que también pertenece al sistema reticular, se pudo observar en los cortes histológicos realizados una alta fluorescencia basal del tejido (A), la cual aumenta al inyectarse las suspensiones de NP fluorescentes (B y C). Dado que el análisis del bazo de las ratas sin la incorporación de NP arroja fluorescencia basal debido a la presencia de componentes de metabolización, no se puede aseverar en un 100 % que la presencia de fluorescencia en éste sea atribuible a la presencia de NP, dificultando el análisis de este órgano en particular.

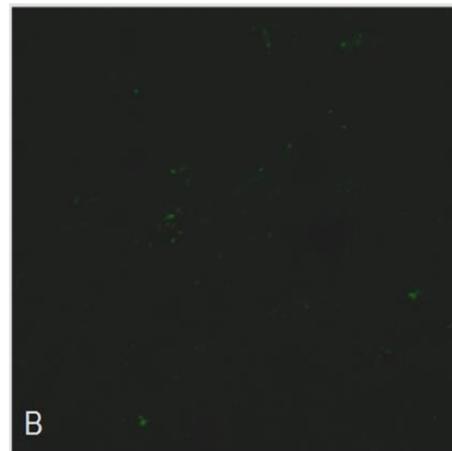
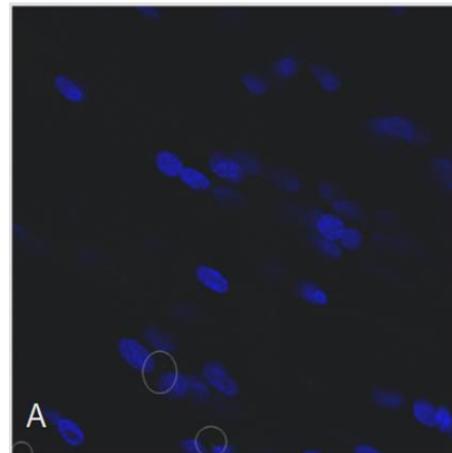
Figura 4. (A) Bazo control (B) Bazo de rata inoculado IV, suspensión NP N°1. (C) Bazo de rata inoculado IV, suspensión NP N°2. MC





polisorbato 80 se unen con la apolipoproteína E presente en el plasma (Walters et al. 2013). La unión puede ser responsable de la orientación de las NP a nivel cerebral. Esta unión puede llevar a imitar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y así obligar a los receptores de LDL presentes en las células endoteliales vasculares del cerebro a reconocerlas como tal y desencadenar su absorción (Walters et al. 2013), a través de un mecanismo de endocitosis seguido por transcitosis a través del endotelio y la posterior recaptación por las neuronas en el parénquima cerebral (Walters et al. 2013). Siendo el tamaño de las NP lo que controla la tasa de endocitosis a través de las células endoteliales de los capilares del cerebro, debido a que su tamaño es similar al de las LDL, asociado a la presencia de polisorbato 80 en su superficie de las NP, lo que desencadena el reconocimiento de los receptores específicos favoreciendo así la internalización de estas a través de la BHE.

Figura 5: (A) Hipocampo de rata control tinción Dapi. (B) Cerebro de rata administración IV, de la suspensión NP N°1.* corte no presenta tinción Dapi. MC

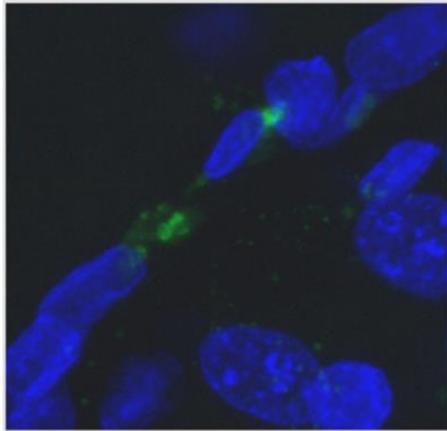


En el análisis del cerebro de las ratas (Fig.5) se pudo observar una escasa fluorescencia verde cerca de los núcleos de las neuronas del hipocampo, tras administrar el control (A), esta fluorescencia es producto de residuos de metabolización de las neuronas (Walters et al. 2013).

También se observó una escasa fluorescencia en los cortes de cerebros de rata a las cuales se les administro la suspensión de NP N°1 (B), pudiendo deberse ya sea a los residuos de metabolización de las neuronas o bien, a una baja concentración en los vasos de NP fluorescentes, lo cual podría estar confirmando un débil traspaso a través de la BHE.

En la figura 6 se observa una imagen del hipocampo de las ratas que fueron inyectadas con NP recubiertas con polisorbato 80, donde se observó que las NP se encontraban presentes en el vaso de la microcirculación cerebral, y en las zonas cercanas a ellas, también se encontraron puntos fluorescentes cercanos a los núcleos de las neuronas. El mecanismo de especificidad cerebral de las NP recubiertas con polisorbato 80 no se conoce totalmente, pero se cree que las NP recubiertas con

Figura 6: Hipocampo de rata tras la administración IV de suspensión NP N° 2 Tinción Dapi. MC



4) CONCLUSIONES

Se desarrollaron NP de quitosano/TPP por el método de gelificación iónica, con un diámetro medio de 77 nm y un índice de polidispersidad de 0,22. Las NP obtenidas fueron de forma irregular y de superficie lisa. Cuando fueron recubiertas con polisorbato 80, tuvieron un diámetro medio de 75 nm con un índice de polidispersidad de 0,46. El potencial Zeta observado luego de la optimización de la formulación de NP fue cercano a 30 mV. Con respecto a los estudios *in vivo*, fue posible observar que las NP fluorescentes recubiertas de polisorbato 80 presentan una menor llegada al hígado y bazo de las ratas, lo anterior probablemente debido a que el recubrimiento protege a la NP de procesos de depuración. Además, fue posible comprobar preliminarmente que a través de la administración IV de suspensiones de NP de quitosano es posible atravesar la BHE ya que se presenciaron NP fluorescentes en los vasos de la microcirculación cerebral y en las células nerviosas del SNC. La explicación de este hallazgo podría deberse a que el recubrimiento con polisorbato 80 generaría la interacción de estas NP con la apolipoproteína E, lo cual produciría su interacción con el receptor de LDL (LRP1). La interacción con estos receptores, seguido por un proceso de endocitosis y de transcitosis a través de las células endoteliales de los capilares del cerebro parece ser el mecanismo subyacente para la administración de fármacos mediante carriers nanoparticulados hacia el sistema nervioso central. Sin embargo, se propone la administración de las NP mediante la vía intranasal e intratecal con el fin de verificar la distribución de las NP fluorescentes dentro del encéfalo, en las células nerviosas, así como su distribución en los vasos de la microcirculación cerebral y entre las células que lo componen, además de realizar estudios *in vitro* frente a la interacción que se genera entre el polisorbato 80 y la apolipoproteína E.

Finalmente con estos resultados, es posible proseguir con los estudios de incorporación de fármacos a NP de quitosano, así como con posteriores estudios de cinética de distribución y citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen al Proyecto Innova Chile CORFO N° 11IDL2-10437. MSc (c) Eileen Castillo, agradece a CONICYT-PCHA/Magister Nacional/2013-2213162

BIBLIOGRAFÍA:

- Mahapatro A, Singh DK. (2011) Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in-vivo* delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology*. 2011 Nov 28;9:55.
- Costanzo, L. S. (2011) *Fisiología*. 4^{ta} Edición.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, and Williams SM. (2001) *Neuroscience*. 3^{ra} Edición.
- Goycoolea FM, Lollo G, Remuñán-López C, Quaglia F, Alonso MJ. (2009) Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*. 2009 Jul 13;10(7):1736-43.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G and Heras A (2009) Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology Current Chemical Biology*, 2009, 3, 203-230
- Kandel, ER, Schwartz, JH. ; Thomas MJ (2003) *Principios de Neurociencia* Editorial: McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A.
- Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. (2009) Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Feb;71(2):251-6.
- Zhang L, Bai R, Liu Y, Meng L, Li B, Wang L, Xu L, Le Guyader L, Chen C. (2012) The dose-dependent toxicological effects and potential perturbation on the neurotransmitter secretion in brain following intranasal instillation of copper nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2012 Aug;6(5):562-75.
- Butoescu N, Seemayer CA, Foti M, Jordan O, Doelker E. (2008) Dexamethasone-containing PLGA superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(9):1772-80.
- NovaMatrix (2002) Safety and toxicology of PROTASAN™ UP chitosans.
- Walters R, Kraig RP, Medintz I, Delehanty JB, Stewart MH, Susumu K, Huston AL, Dawson PE, Dawson G. (2013) Nanoparticle Targeting to Neurons in a Rat Hippocampal Slice Culture Model. *ASN Neuro*. 2012 Oct 23;4(6):383-92.
- Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. (2009.) Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. *Indian J Pharm Sci*. 2009 Jul;71(4):349-58.
- Sharma, V., Ali, M. (2007) Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for nose to brain delivery of a cholinesterase of inhibitor. *Amity institute of nanotechnology, Amity University, India., 69, 712-713.*
- Rojanarata T1, Opanasopit P, Techaarpornkul S, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U. (2008) Chitosan-Thiamine Pyrophosphate as a Novel Carrier for siRNA Delivery. *Pharm Res*. 2008 Dec;25(12):2807-14.

Rudzinski WE, Aminabhavi TM. (2010) Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. International Journal of Pharmaceutics. Int J Pharm. 2010 Oct 31;399(1-2):1-11.

Xu T, Z. N., Nichols HL, Shi D, Wen X: (2007) Modification of nanostructured materials for biomedical applications.

Aktaş Y, Yemisci M, Andrieux K, Gürsoy RN, Alonso MJ, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Riguera R, Sargon MF, Celik HH, Demir AS, Hincal AA, Dalkara T, Capan Y, Couvreur P. Couvreur (2005)

Development and Brain Delivery of Chitosan-PEG Nanoparticles Functionalized with the Monoclonal Antibody OX26. Bioconjugate Chem. Bioconjug Chem. 2005 Nov-Dec;16(6):1503-11.

Zhao Jiayin, W. J. (2006) Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, 34.

ABSTRACT

In this study Chitosan nanoparticles were developed and characterized through ionic gelation method which used as crosslinking agent sodium tripolyphosphate (TPP). The influence of various parameters such as the ratio chitosan / TPP mass, pH, time, speed and type of agitation on the formed nanoparticles as well as their transfer through the blood brain barrier was tested. The method was highly reproducible and robust, wherein nanoparticles were obtained with an average diameter of 77 ± 0.8 nm, with normal distribution and a polydispersity index of 0.22. The nanoparticles also had irregular shape and smooth surface with a positive zeta potential of 29.8 ± 2.0 mV. Once obtained the nanoparticles in vivo tests were performed on Sprague Dawley rats which were administered intravenously two formulations. In the formulation containing chitosan / tripolyphosphate and polysorbate 80 (incorporated to improve the surface properties agent), an increase in the presence of nanoparticles near to neurons of both hippocampal as neocortex was observed, as well as to the vessels of the cerebral microcirculation.

Keywords: Chitosan, ionic gelation, nanoparticles, blood-brain barrier

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 17-24

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 10-05-2014

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN PROLONGADA DE PRAMIPEXOL

(Development and evaluation of sustained-release pramipexole-loaded biodegradable microspheres)

Constanza Fuentes, Carlos von Plessing y Marcos Fernández

Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

RESUMEN

Pramipexol (PMX) es un agonista dopaminérgico no ergótico utilizado para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (EP). El desarrollo de una formulación de liberación prolongada de PMX podría constituir una estrategia terapéutica eficaz para prevenir o retrasar las disquinesias en la EP. Además, supondría una mejora fundamental en el tratamiento de estos pacientes al mejorar su calidad de vida y reducir el número de administraciones. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar una nueva formulación para el tratamiento de la EP, consistente en microesferas biodegradables de PMX. Las microesferas fueron preparadas usando el copolímero del ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA 50:50, Resomer® RG 502) mediante la técnica de emulsión/evaporación de solvente a partir de una emulsión O/W (método A) y a partir de una emulsión W/O/W (método B). Las microesferas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos láser, calorimetría diferencial de barrido y rayos X. Asimismo, se determinó la eficacia de encapsulación (EE) y se realizaron estudios de cesión *in vitro*. Las microesferas desarrolladas presentan características de composición y tamaño que hacen factible su administración *via parenteral*. La EE fue significativamente mayor para las microesferas preparadas por el método B ($60,9 \pm 8,9\%$) que para las preparadas por el método A ($45,0 \pm 5,2\%$). El mejor perfil de liberación de PMX se logra con la formulación obtenida por el método A, con una liberación constante del fármaco durante dos semanas ($K_0=23,3 \mu\text{g}/\text{día}/30\text{mg}$). La formulación de microesferas obtenida por el método A, constituye una alternativa interesante como sistema de liberación prolongada para la administración *parenteral* de PMX en el tratamiento de la EP.

Palabras Claves: Pramipexol, microesferas, PLGA, enfermedad de Parkinson

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 25-32

Recivido 01-04-2014; Revisado 01-05-2014; Aceptado 10-05-2014

1) INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer afectando aproximadamente al 2% de las personas mayores de 80 años (Rajput & Birdi, 1997; Thomson et al., 2001; Alves et al., 2008). Se manifiesta principalmente con síntomas como temblor, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural (Obeso et al., 2010). La farmacoterapia de la EP emplea dos estrategias básicas: (1) uso del precursor de dopamina, levodopa para compensar la pérdida de neuronas que sintetizan dopamina y (2) administración de agonistas dopaminérgicos para sustituir el neurotransmisor disminuido a nivel de receptores de dopamina (Nutt & Wooten, 2005).

Aunque el tratamiento con levodopa es considerado el "Gold Standard" y la principal terapia en la EP (Odin et al., 2008), su efectividad va disminuyendo con el tiempo y además, van apareciendo efectos secundarios relacionados con su uso prolongado, tales como fluctuaciones motoras,

fenómenos de wearing-off u on-off, discinesias y síntomas psiquiátricos (Cao et al., 2006). Los agonistas dopaminérgicos a pesar de tener una menor eficacia sintomática que la levodopa, poseen varias ventajas. En primer lugar, tienen una vida media larga que permite una estimulación estriatal más continua y fisiológica, la cual posiblemente permite retrasar la aparición de complicaciones motoras (Holloway et al., 2004). Además, actúan directamente sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos, de modo que resultan efectivos en fases avanzadas de la enfermedad, a pesar de la degeneración progresiva de la vía dopaminérgica presináptica (Möller et al., 2005).

Pramipexol, o (-)-2-amino-4, 5,6,7-tetrahidro-6-D-propilamino-benzotiazol (PMX), es un potente agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3 no ergótico eficaz en el tratamiento sintomático de la EP (Mierau & Schingnitz, 1992; Mierau et al., 1995). Es efectivo como monoterapia en fases iniciales de la enfermedad y en

Correspondencia a: Dr. Marcos Fernández Escobar, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Barrio Universitario S/N, Casilla 237, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-2661328, Fax: 56-41-2207086, Correo electrónico: marferna@udec.cl

terapia combinada con levodopa en etapas avanzadas de la enfermedad (Shannon et al., 1997; Reichmann et al., 2003; Bonuccelli, 2003). Además, PMX ha demostrado tener varios efectos neuroprotectores, que se han relacionado con sus propiedades antioxidantes (Le et al., 2000) y con la inhibición de la apoptosis (Abramova et al., 2002). En modelos experimentales de parkinsonismo, el PMX se ha asociado a una disminución de la pérdida neuronal dopaminérgica secundaria a tóxicos (Hall et al., 1996; Iravani et al., 2006). También se ha sugerido que protege las neuronas dopaminérgicas de la citotoxicidad secundaria al metabolismo de la dopamina endógena (Izumi et al., 2007). PMX se encuentra comercialmente disponible a la forma de comprimidos de liberación inmediata y comprimidos de liberación prolongada, de administración tres veces al día y una vez al día, respectivamente.

La mayoría de los efectos adversos asociados a la terapia de la EP han sido atribuidos a la estimulación pulsátil de los receptores dopaminérgicos (Engber et al., 1989; Mouradian et al., 1990). Una terapia que permitiera mantener niveles plasmáticos constantes durante largos periodos de tiempo sería de gran utilidad para prevenir o retrasar la aparición de disquinesia en la EP (Olanow et al., 2006). Los sistemas parenterales de liberación prolongada ofrecen ventajas sobre las formas de dosaje orales. Pueden ser localizados en regiones específicas del cuerpo, y desde ahí conseguir una respuesta terapéutica continua y uniforme durante el tiempo deseado (desde semanas hasta meses), disminuyendo los efectos secundarios (Bhaskaran & Suresh, 2004; Naha et al., 2009). La adherencia al tratamiento es un problema para los pacientes de edad avanzada, especialmente cuando reciben múltiples tratamientos en trastornos crónicos tales como EP (pacientes con enfermedad avanzada tienen 8-10 comprimidos por día (Fargel et al., 2007)). La terapia de administración parenteral puede mejorar el cumplimiento del paciente debido a que es posible reducir significativamente el número de administraciones. También beneficiaría a los pacientes que no pueden tomar medicamentos orales, o los que tienen dificultades para tragar debido al estado de enfermedad avanzada. Dentro de estos sistemas se encuentran los sistemas microparticulados elaborados con polímeros biodegradables y biocompatibles que constituyen una buena alternativa, ya que desaparecen del lugar de acción una vez que han ejercido el efecto terapéutico. Entre los polímeros biodegradables el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), aprobado por la FDA y la EMEA para uso parenteral (Xiaomei et al., 2013), es uno de los más utilizados dada su probada biocompatibilidad y disponibilidad comercial (Moshfeghi & Peyman, 2005; Mundargi et al., 2008).

En este trabajo se desarrolló y caracterizó un nuevo sistema de liberación prolongada, microesferas

biodegradables de PLGA conteniendo PMX para su administración parenteral en el tratamiento de la EP.

2) MATERIALES Y MÉTODOS

2.1) Materiales:

Diclorhidrato de pramipexol fue obtenido desde Waterstone Pharmaceuticals, Inc. (USA). Resomer® RG 502 (ácido poli-DL-láctico-co-glicólico, 50:50)), Mw 15.000 Da, viscosidad relativa 0,2 dL/g, fue adquirido a Evonic Industries AG (Alemania). Alcohol polivinílico (PVA) Mw 30.000-70.000 Da, fue suministrado por Sigma-Aldrich (USA). El agua utilizada en la preparación de tampones y soluciones fue purificada en un equipo Purelab Classic (Elga, UK). Todos los otros reactivos y solventes fueron de grado analítico y adquiridos a Merck S.A. (Alemania).

2.2) Preparación de microesferas de PLGA cargadas con PMX:

Las microesferas de PLGA cargadas con PMX fueron elaboradas mediante la técnica de emulsión/evaporación del solvente a partir de dos métodos: una emulsión aceite/agua (O/A) (método A) y una doble emulsión agua/aceite/agua (A/O/A) (método B).

Para la optimización del método A se evaluaron las siguientes variables: cantidad de PMX (10-40 mg), cantidad de PLGA (200-400 mg), volumen de CH₂Cl₂ (1-2 mL), concentración de PVA (0,5-3% p/v), concentración de NaCl (0-5% p/v).

Para la optimización del método B se evaluaron las siguientes variables: cantidad de PMX (20-40 mg), cantidad de PLGA (300-500 mg), volumen de CH₂Cl₂ (1-2 mL), concentración de PVA (0,25-1,0% p/v), concentración de NaCl (0-5% p/v).

La optimización de las variables de formulación se llevó a cabo con el fin de obtener la mayor eficacia de encapsulación y rendimiento de proceso posibles. De acuerdo a esto, se seleccionaron las siguientes condiciones finales para cada método:

2.3) Método A (emulsión O/A):

Finalmente, las cantidades de PMX y PLGA usadas para la preparación de las microesferas fue 10 mg y 400 mg, respectivamente. La fase orgánica fue preparada disolviendo el PLGA en 1 mL de CH₂Cl₂, con la ayuda de un vortex y luego, dispersando el PMX en la solución de PLGA mediante agitación con vortex y luego aplicando ultrasonido, cada uno durante 60 s. La fase acuosa estuvo constituida por 5 mL de PVA al 0,5 % p/v. Ambas fases fueron emulsificadas con un homogeneizador (Heidolph modelo Diax 600, Alemania) a 8.000 r.p.m durante 30 s. La emulsión O/A resultante fue adicionada a 100 mL de PVA 0,1% p/v y NaCl 5% p/v y se dejó en agitación magnética (600 r.p.m.) durante 3 h a temperatura ambiente, con el fin de evaporar completamente el solvente orgánico. Luego, las microesferas fueron filtradas al vacío a través de un

filtro de membrana 0,45 μm , lavadas tres veces con agua desionizada y secadas (-40°C y $133 \times 10^{-3} \text{ mBar}$) en un liofilizador (Labconco modelo Freezone 4.5, USA) por al menos 12 h. Las microesferas liofilizadas fueron mantenidas en un desecador hasta su uso.

2.4) Método B (emulsión A/O/A):

Una solución acuosa de PMX (20 mg/100 μL de agua purificada) fue emulsificada en una solución de PLGA (400 mg) en CH_2Cl_2 (1,0 mL) con un homogeneizador a 14.000 r.p.m durante 60 s. La emulsión resultante (A/O) fue incorporada en 500 ml de una solución de PVA 0,25% p/v y NaCl 5% p/v, utilizando para ello un homogeneizador durante 30 segundos a 8.000 r.p.m., obteniéndose una emulsión A/O/A. La doble emulsión se dejó en agitación magnética (600 r.p.m.) durante 3,5 h a temperatura ambiente. Las microesferas sólidas fueron filtradas al vacío a través de un filtro de membrana 0,45 μm , lavadas tres veces con agua desionizada y secadas en un liofilizador por al menos 12 h. Las microesferas liofilizadas fueron mantenidas en un desecador hasta su uso.

2.5) Caracterización de las formulaciones:

2.5.1) Determinación de la eficacia de encapsulación: Las microesferas cargadas con PMX (20 mg) preparadas por ambos métodos fueron disueltas en 3 mL de CH_2Cl_2 . PMX fue extraído tres veces desde la fase orgánica con 3 mL de PBS (pH 7,4). A continuación las muestras se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 5 min. Procediéndose a retirar el sobrenadante. El volumen total de muestra (9 mL) se completó a 25 mL con PBS (pH 7,4). Las muestras se filtraron (0,45 μm) y se procedió a la cuantificación del PMX por espectrofotometría UV (espectrofotómetro Varian modelo Cary 50, Australia) a 262 nm.

2.5.2) Caracterización morfológica y distribución de tamaño de partícula: El estudio se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Jeol, JSM-6380, USA), tanto en microesferas cargadas como no cargadas. Las muestras fueron secadas y recubiertas con una película de oro, antes de la observación por SEM a 20 kV.

El tamaño de partícula y la distribución de tamaños de partículas, fueron medidos por difracción de rayos láser (Microtrac-S3550, Microtrac, USA). Antes de cada determinación, las muestras liofilizadas fueron suspendidas en PBS (pH 7,4) y sometidas a ultrasonido durante 30 s, para prevenir la agregación de las partículas. Los resultados fueron descritos en términos de diámetro medio y desviación estándar (SD).

La distribución de tamaños de partículas fue descrito cuantitativamente usando el coeficiente de dispersión de tamaño de partícula (Span), calculado como $Span = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, donde D_n (n = 10, 50 y 90) expresa el diámetro de partícula al 10%, 50% y 90% del volumen de distribución. Un valor de Span alto es indicativo de una distribución de

tamaños más heterogénea. Una población de microesferas puede ser considerada como monodispersa si el valor de Span es menor que 0,4 (Xiao et al., 2005).

2.5.3) Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Se utilizó un equipo Mettler Toledo (DSC 822, Suiza). Las muestras (5 – 10 mg) fueron selladas en crisoles de aluminio y calentadas en atmósfera de nitrógeno (flujo 40 mL/min). Como referencia se utilizó un crisol de aluminio vacío. Las muestras fueron escaneadas entre 10 – 300°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Bajo estas condiciones, se obtuvieron los termogramas de PMX, PLGA, microesferas blanco y microesferas cargada con PMX.

2.5.4) Difracción de rayos X (XRD): Se utilizó un difractómetro automático de polvo (Bruker modelo D4 Endeavor, Alemania), en configuración θ -2 θ , en el rango angular 5-50° 2 θ , tamaño de paso 0,04° 2 θ y tiempos de conteo 1 seg/paso. Bajo estas condiciones, se analizaron muestras de PMX, PLGA, microesferas blanco, microesferas cargada con PMX y mezclas físicas de PLGA/PMX en proporciones de 5/95, 10/90, 25/7 y 50/50.

2.5.5) Estudio de cesión *in vitro*: Se suspendieron 30 mg de microesferas en 5 mL de PBS (condiciones Sink). Las muestras se mantuvieron a 37°C bajo agitación constante (100 r.p.m). A intervalos de tiempo predeterminados, las muestras fueron centrifugadas y se extrajo el sobrenadante con una jeringa, que luego fue filtrado a través de filtro 0,45 μm y reemplazado con un volumen de PBS fresco. La cuantificación de PMX se realizó por espectrofotometría UV a 262 nm. El test de cesión *in vitro* fue realizado por triplicado para cada lote de microesferas (4 lotes por cada método).

2.6) Análisis estadístico:

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (media \pm S.E.M.). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics® Plus v. 5.1 (John Wiley and Sons, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se utiliza la técnica de emulsión/evaporación del solvente para la microencapsulación de compuestos hidrosolubles, tales como PMX (solubilidad en agua 200 mg/mL), por lo general es difícil lograr una encapsulación eficaz del fármaco en el interior del polímero, así como conseguir una liberación inicial (burst) baja. Para intentar superar estas dificultades, se han preparado microesferas de PLGA cargadas con PMX mediante dos métodos de microencapsulación por la técnica de evaporación del solvente: método A y método B. En el método A se partió

de una emulsión O/A y en el método B de una emulsión A/O/A.

En el proceso de obtención de microesferas por el método A, se observa que a medida que aumenta la cantidad de PLGA (200 mg a 400 mg), se incrementa la eficacia de encapsulación (EE) (3,0% a 16,0%). Sin embargo, no se observan cambios significativos en estos parámetros al aumentar la cantidad de PLGA hasta 600 mg. Estudios realizados por otros autores (Li et al., 2008) indicaron que cuando se utiliza la menor cantidad de polímero, se producen gotas de fase polimérica menos viscosas que podrían provocar el paso del principio activo hacia la parte más exterior de las microesferas, o incluso a la fase externa durante el proceso de maduración de las microesferas. En consecuencia, una elevada concentración de polímero originaría una mayor viscosidad de la fase dispersa; de esta manera se obtendría un mayor tamaño de partícula y una EE más elevada (Li et al., 2008). Sin embargo, en nuestro caso no se observaron cambios significativos en la EE al aumentar la cantidad PLGA de 400 mg hasta 600 mg, probablemente debido a que se produce un aumento poco marcado en la viscosidad de la fase dispersa.

Si se desean obtener microesferas por la técnica de evaporación del solvente a partir de la emulsión doble A/O/A, es necesario estabilizar la emulsión primaria para lograr una adecuada encapsulación de principios activos hidrosolubles, ya que la solución polimérica separa ambas fases acuosas, controlando la difusión del principio activo hacia la fase externa acuosa (Leo et al., 1998). Por ello, el aumento en la viscosidad de la fase orgánica elevando la concentración del polímero, puede mejorar la EE de fármacos hidrosolubles. Por otra parte, el aumento de la viscosidad de la fase orgánica estabiliza la película polimérica formada alrededor de las gotículas de fase acuosa interna, reduciendo así la posible coalescencia de la fase interna, evitando de esta manera los intercambios entre las dos fases acuosas de la emulsión (Pistel & Kissel 2000). En nuestro estudio, y con el método B (A/O/A), al incrementar la cantidad del polímero (300mg a 400 mg) se observa un aumento en la cantidad de fármaco encapsulado. Cuando el PLGA se aumenta a 500 mg, la fase oleosa resulta una solución altamente viscosa que dificulta su uso.

Independiente del método de microencapsulación empleado, la EE disminuye al aumentar el volumen de fase orgánica, con rangos de EE que oscilan entre 45,0-5,0% y 60,9-10,0% para los métodos A y B, respectivamente. Distintos autores (Pistel & Kissel, 2000) han indicado que cuando se emplea el método de doble emulsión A/O/A, un aumento de la fracción de volumen de la fase interna acuosa de la emulsión primaria conduce a la obtención de microesferas más porosas y con valores de EE bajos. En nuestro caso, cuando se utilizan 100 µL de fase interna

acuosa se obtiene una EE del 60,9%, mientras que cuando se utilizan 200 µL se obtiene una EE de sólo un 5,6%.

El agente emulgente juega un papel clave en la formación de microesferas esféricas. En nuestro estudio, si se mantienen constantes la velocidad de agitación y la proporción PLGA/fármaco, para el método A, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en EE al aumentar la concentración de PVA en la fase externa acuosa (0,5% a 3,0%), con valores medios próximos al 40%, por lo que se selecciona la menor concentración de agente emulsionante para la elaboración de las microesferas de PMX. Con el método B, los valores más elevados de EE (60,9%) se obtuvieron con una concentración de PVA del 0,25%.

Se ha demostrado que la adición de NaCl a la fase externa acuosa puede aumentar la encapsulación de fármacos hidrosolubles y reducir la liberación inicial (Takada et al., 1997; Pistel & Kissel, 2000). La EE para las microesferas preparadas por el método A aumenta del 20,0% al 45,0% cuando la concentración de NaCl se incrementa del 0% al 5%. En el método B, la adición de NaCl mejora significativamente la EE (31,5% a 60,9%). La presencia de NaCl en la fase externa acuosa aumenta la presión osmótica de dicha fase, evitando la entrada de agua en la fase interna acuosa, lo que origina microesferas con una estructura menos porosa y que presentan altos valores de la EE (Herrmann & Bodmeier, 1998).

A modo de resumen en la Tabla 1 se recogen todas las variables analizadas en ambos métodos de microencapsulación (métodos A y B) así como las condiciones finales seleccionadas en relación a la EE de PMX en las microesferas.

Tabla 1: Resumen de todas las variables ensayadas en la microencapsulación de PMX.

Variables	Método A		Método B	
	Rango	EE (n = 3) Condición final seleccionada	Rango	EE (n = 3) Condición final seleccionada
PMX (mg)	10-40	↓ 10	20-40	↓ 20
PLGA (mg)	200-400	↑ 400	300-400	↑ 400
	400-600	↔	400-500	↔
CH ₂ Cl ₂ (mL)	1,0-2,0	↓ 1	1,0-2,0	↓ 1,0
PVA (%)	0,5-3,0	↔ 0,5	0,25-1	↔ 0,25
NaCl (%)	0-5,0	↑ 5,0	0-5,0	↑ 5,0
	5,0-10,0	↔	5,0-10,0	↔
Volumen fase interna acuosa (µL)	-	-	100-200	↓ 100

En la Tabla 2 se resumen los valores medios de rendimiento del proceso, % EE y tamaño de partícula obtenidos para las formulaciones finales preparadas por ambos métodos. La EE media (%) obtenida con el método A fue significativamente menor que la obtenida con el método B ($p < 0,05$). Además, la cantidad de PMX (mg) encapsulada por 100 mg de polímero fue mayor con el método B.

Tabla 2: Caracterización de microesferas cargadas con PMX.

Método	Tamaño de partícula (μm) (media \pm SD)	Rendimiento de producción (%) (media \pm SD)	Cantidad de PMX encapsulado/100 mg de polímero		EE (%) (media \pm SD)
			Carga teórica (mg)	Carga real (mg)	
A	22,5 \pm 7,8	79,5 \pm 5,8	2,5	1,1	45,0 \pm 5,2
B	20,3 \pm 11,5	79,4 \pm 3,2	5,0	3,0	60,9 \pm 8,9

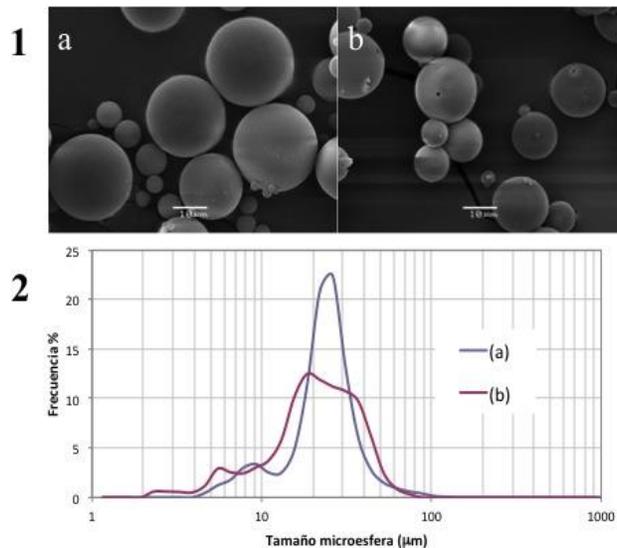
La observación microscópica mediante SEM de las microesferas cargadas con PMX y preparadas por el método A muestra la existencia de partículas esféricas con superficie lisa y ausencia de cristales del fármaco en su superficie (Fig. 1.1.a). La alta viscosidad de la fase polimérica evita la migración de los cristales internos a la superficie antes del endurecimiento de las microesferas. Cuando se analizan las microesferas preparadas por el método B, éstas presentan pequeñas invaginaciones (Fig. 1.1.b). Probablemente esto sea debido a la evaporación del agua contenida en la fase interna acuosa durante la fase de maduración (Herrmann & Bodmeier, 1998; Li et al., 2008).

El método de microencapsulación no tuvo una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la distribución del tamaño de las partículas obtenidas (Tabla 2). Los tamaños medios de las microesferas preparadas por los métodos A y B fueron 22,5 \pm 7,8 μm y 20,3 \pm 11,5 μm , respectivamente. Estos tamaños se pueden considerar adecuados (10-200 μm) para su administración parenteral. Por lo general, las microesferas inferiores a 10 μm tienen una capacidad limitada para la liberación controlada de principios activos, poseen una baja capacidad de transporte de fármacos y podrían ser fagocitadas por las células del sistema inmune. Por otra parte, microesferas con tamaños superiores a 200 μm son difíciles de inyectar y podrían inducir efectos deletéreos sobre los tejidos en la zona de implantación (Anderson & Shive, 1997).

Las medidas de difracción de rayos láser proporcionan perfiles de distribución del tamaño de partícula de las microesferas con varios picos (Fig. 1.2.a y 1.2.b), y con coeficientes de dispersión del tamaño de partícula (Span) de 1,08 y 1,53, para las microesferas cargadas con PMX preparadas por los métodos A y B, respectivamente. Estos

valores reflejan una ligera polidispersión de las poblaciones de microesferas en ambas formulaciones, originada probablemente por la agregación de las mismas.

Figura 1.



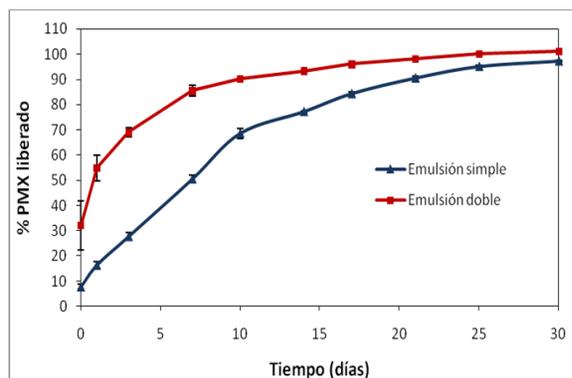
1: microfotografía SEM de microesferas cargadas con PMX obtenidas por el método A (a) y por el método B (b). 2: distribución de tamaño de partículas de microesferas cargadas con PMX obtenidas por el método A (a) y por el método B (b).

La cinética de liberación de los fármacos incorporados en un biomaterial polimérico se rige, en general, por dos mecanismos: uno de difusión, en el cual el principio activo difunde hacia el exterior a través del polímero y, otro de degradación, en el que la liberación del fármaco depende de la degradación del propio biopolímero. En el caso de un sistema matricial o monolítico, la obtención de una liberación de orden uno puede ser resultante del primer mecanismo citado, mientras que con el segundo mecanismo se obtendrá una cinética de liberación de orden cero (Wang et al., 2006).

En nuestro caso la liberación del principio activo desde las microesferas obtenidas por ambos métodos muestra un perfil bifásico (Fig. 2). La liberación inicial (burst) (1 h) fue inferior al 10% y cercana al 30% para las microesferas obtenidas por los métodos A y B, respectivamente, probablemente debido a la liberación del principio activo que se incorpora cerca de la superficie de las microesferas. Esta cesión fue seguida por una liberación del principio activo de aproximadamente un 30% (método A) y 75% (método B) en los primeros 5 días del ensayo, lo que indica que la encapsulación de PMX en microesferas de PLGA por

el método A resultada en un mejor control de la liberación del fármaco. Esta rápida liberación de PMX desde las microesferas preparadas por el método B puede explicarse por la presencia de pequeñas invaginaciones en su superficie, lo que conduce a un aumento de su porosidad, facilitando en consecuencia la rápida cesión del fármaco una vez puestas en contacto con un medio acuoso.

Figura 2. Perfil de liberación de PMX desde microesferas obtenidas por el método A (▲) y por el método B (■).

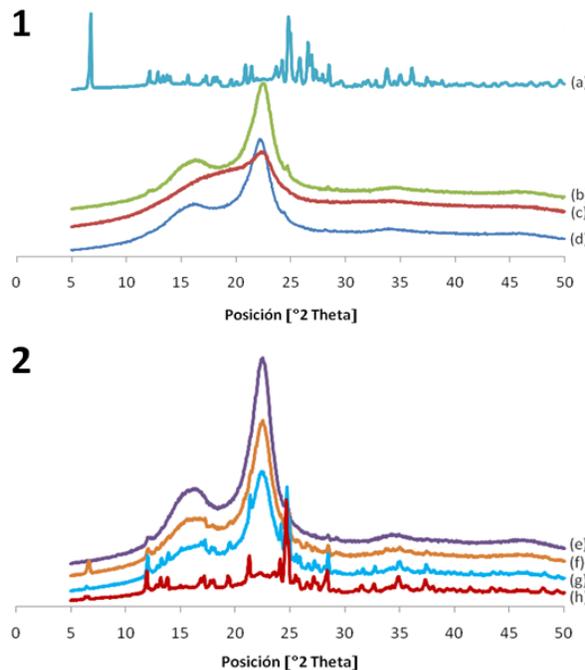


Para determinar el modelo que mejor representa la liberación de PMX a partir de las microesferas de PLGA preparadas por el método A, los datos experimentales fueron analizados mediante la ecuación exponencial propuesta por Ritger y Peppas (1987), que describe el comportamiento general de la liberación de principios activos desde partículas esféricas ($Mt/M^\infty = K \times t^n$, donde Mt/M^∞ es la fracción de dosis cedida a tiempo t , K es la constante de velocidad y, n es el exponente difusional). Para las microesferas preparadas por el método A el valor de n fue 1,1; indicativo de que la liberación del fármaco sigue una cinética de liberación de orden cero durante dos semanas, con un valor medio de constante de velocidad de liberación de orden cero de 23,3 $\mu\text{g}/\text{día}/30$ mg de microesferas ($r = 0,991$). Después de tres semanas, el porcentaje de PMX cedido es mayor de un 80%. A partir de estos resultados la formulación finalmente seleccionada fue la preparada por el método A.

En el análisis XRD, los picos de máxima intensidad de PMX se obtienen a 6,79°; 20,82°; 21,34°; 23,66°; 24,18°; 24,73°; 25,78°; 26,54°; 26,86°; 27,21°; 28,45°; 33,73°; 35,01° y 36,05°; con un perfil característico del estado cristalino (Fig. 3.1.a). Los perfiles de XRPD obtenidos para las microesferas no cargadas son demostrativos del estado amorfo del PLGA (Fig. 3.1.c y 3.1.d) y, además, el proceso de encapsulación no modifica sus características. Los perfiles correspondientes a las microesferas cargadas con PMX (Fig. 3.1.b) no muestran los máximos de PMX al estado cristalino. Sin embargo, al evaluar las mezclas

físicas de PMX y PLGA (Fig. 3.2.e, 3.2.f, 3.2.g y 3.2.h), es posible observar la presencia de señal, cuya intensidad aumenta en proporción a la concentración de fármaco presente en cada una de las mezclas. Es por tanto, razonable concluir que la ausencia de señal en las microesferas cargadas con PMX se deba a la baja concentración de fármaco.

Figura 3.

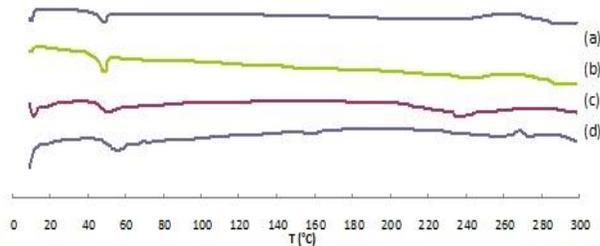


1: difractograma de PMX (a); microesferas cargadas con PMX (b); microesferas no cargadas (c); PLGA (d). 2: difractograma de mezcla física de PLGA/PMX en proporción 95:5 (e), 90:10 (f), 75:25 (g) y 50:50 (h).

Con el objeto de evaluar las posibles interacciones entre principio activo y polímero, se realiza un análisis por DSC (Fig. 4). El termograma correspondiente a PMX (Fig. 4.c) muestra dos pequeños picos endotérmicos 50°C, 240°C atribuibles a transiciones endotérmicas. En este rango de temperaturas no fue posible observar la fusión del fármaco. Los termogramas de las microesferas no cargadas (Fig. 4.b) ($T_g = 46,5^\circ\text{C}$) y PLGA (Fig. 4.a) ($T_g = 44,1^\circ\text{C}$) presentan temperaturas de transición vítrea similares. Los termogramas de las microesferas cargadas con PMX muestran un pequeño pico endotérmico asociado a la T_g (Fig. 4.d) del PLGA, que se ve modificado probablemente por cierto impedimento en la movilidad de las cadenas poliméricas tras la incorporación del fármaco

en suspensión. El termograma de las microesferas cargadas con PMX no muestra nuevos picos que determinen interacción de los componentes o que puedan deberse al proceso de microencapsulación.

Figura 4. Termograma DSC de PLGA (a); microesferas no cargadas (b); PMX (c); microesferas cargadas con PMX (d).



CONCLUSIÓN

La técnica de emulsión/evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A ha mostrado resultados adecuados para la microencapsulación de PMX, obteniéndose una eficacia de encapsulación razonable así como un buen control en la liberación del principio activo. La formulación de microesferas obtenida por el método A, constituye una alternativa interesante como sistema de liberación prolongada para la administración parenteral de PMX en el tratamiento de la EP.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Fondecyt Iniciación N° 11130387, Proyecto Interno Universidad de Concepción N° 211.074.045-1.0. Agradecemos también al Dr. Pedro Toledo, Laboratorio de Superficies ASIF, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción, por facilitarnos sus instalaciones para las medidas de tamaño de partícula.

BIBLIOGRAFÍA:

- Abramova N., Cassarino D., Khan S., Painter T., Bennett J. (2002) Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. *J. Neurosci. Res.* 67, 494-500.
- Alves G., Forsaa E., Pedersen K., Gjerstad M., Larsen J. (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 255 (suppl.), 18-32.
- Anderson J., Shive M. (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 28, 5-24
- Bhaskaran S., Suresh S. (2004) Biodegradable microspheres of ketorolac tromethamine for parenteral administration. *J. Microencapsul.* 21, 743-750.
- Bonuccelli U. (2003) Comparing dopamine agonists in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 16 (suppl. 1), 3-9.

- Cao X., Guan Q., Xu Y., Wang L., Sun S. (2006) Mechanism of over activation in direct pathway mediated by dopamine D(1) receptor in rats with levodopa-induced dyskinesia. *Neurosci. Bull.* 22, 159-164.
- Engber T., Susel Z., Juncos J., Chase T. (1989) Continuous and intermittent levodopa differentially affect rotation induced by D-1 and D-2 dopamine agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 168, 291-298.
- Fargel M., Grobe B., Oesterle E., Hastedt C., Rupp M. (2007) Treatment of Parkinson's Disease: A Survey of Patients and Neurologists. *Clin. Drug Investig.* 27, 207-218.
- Hall E., Andrus P., Oostveen J., Althaus J., Von Voigtlander P. (1996) Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Bain Res.* 742, 80-88.
- Herrmann J., Bodmeier R. (1998) Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 75-82.
- Holloway R., Shoulson I., Fahn S., Kieburz K., Lang A., Marek K., McDermott M., Seibyl J., Weiner W., Musch B., Kamp C., Welsh M., Shinaman A., Pahwa R., Barclay L., Hubble J., LeWitt P., Miyasaki J., Suchowersky O., Stacy M., Russell D., Ford B., Hammerstad J., Riley D., Standaert D., Wooten F., Factor S., Jankovic J., Atassi F., Kurlan R., Panisset M., Rajput A., Rodnitzky R., Shults C., Petsinger G., Waters C., Pfeiffer R., Biglan K., Borchert L., Montgomery A., Sutherland L., Weeks C., DeAngelis M., Sime E., Wood S., Pantella C., Harrigan M., Fussell B., Dillon S., Alexander-Brown B., Rainey P., Tennis M., Rost-Ruffner E., Brown D., Evans S., Berry D., Hall J., Shirley T., Dobson J., Fontaine D., Pfeiffer B., Brocht A., Bennett S., Daigneault S., Hodgeman K., O'Connell C., Ross T., Richard K., Watts A. (2004) Parkinson Study Group. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Arch. Neurol.* 61, 1044-1153.
- Iravani M., Haddon C., Cooper J., Jenner P., Schapira A. (2006) Pramipexole protects against MPTP toxicity in non-human primates. *J. Neurochem.* 96, 1315-1321.
- Izumi Y., Sawada H., Yamamoto N., Kume T., Katsuki H., Shimohama S., Akaike A. (2007) Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 557, 132-140.
- Le W., Jankovic J., Xie W., Appel S. (2000) Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J. Neural. Transm.* 107, 1165-1173.
- Leo E., Pecquet S., Rojas J., Couvreur P., Fattal E. (1998) Changing the pH of the external aqueous phase may modulate protein entrapment and delivery from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a w/o/w solvent evaporation method. *J. Microencapsul.* 15, 421-430.
- Li M., Rouaud O., Poncelet D. (2008) Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363, 26-39.
- Mierau J., Schneider F., Ensinger H., Chio C., Lajiness M., Huff M. (1995) Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 290, 29-36.
- Mierau J., Schingnitz G. (1992) Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 215, 161-170.
- Möller J., Oertel W., Köster J., Pezzoli G., Provinciali L. (2005) Long-term efficacy and safety of pramipexole in advanced Parkinson's disease: results from a European multicenter trial. *Mov. Disord.* 20, 602-610.
- Moshfeghi A., Peyman G. (2005) Micro- and nanoparticulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2047-2052.

- Mouradian M., Heuser I., Baronti F., Chase T. (1990) Modification of central dopaminergic mechanisms by continuous levodopa therapy for advanced Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 27, 18-23.
- Mundargi R., Babu V., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T. (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Release* 125, 193-209.
- Naha P., Kanchan V., Panda A. (2009) Evaluation of parenteral depot insulin formulation using PLGA and PLA microparticles. *J. Biomater. Appl.* 24, 309-325.
- Nutt J., Wooten G. (2005) Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 1021-1027.
- Obeso J., Rodriguez-Oroz M., Goetz C., Marin C., Kordower J., Rodriguez M., Hirsch E., Farrer M., Schapira A., Halliday G. (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.* 16, 653-661.
- Odin P., Wolters E., Antonini A. (2008) Continuous dopaminergic stimulation achieved by duodenal levodopa infusion. *Neurol. Sci.* 29 (suppl. 5), S387-S388.
- Olanow C., Obeso J., Stocchi F. (2006) Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol.* 5, 677-687.
- Park K., Jung G., Kim M., Park M., Shin Y., Hwang J., Yuk S. (2012) Triptorelin acetate-loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres for controlled drug delivery. *Macromol. Res.* 20, 847-851.
- Pistel K., Kissel T. (2000) Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using w/o/w double emulsion technique. *J. Microencapsul.* 17, 467-483.
- Rajput A., Birdi S. (1997) Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 3, 175-186.
- Reichmann H., Brecht M., Koster J., Kraus P., Lemke M. (2003) Pramipexole in routine clinical practice: a prospective observational trial in Parkinson's disease. *CNS Drugs* 17, 965-973.
- Ritger P., Peppas N. (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* 5, 23-36.
- Shannon K., Bennett J., Friedman J. (1997) Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. The Pramipexole Study Group. *Neurology* 49, 724-728.
- Takada S., Kurokawa T., Miyazaki K., Iwasa S., Ogawa Y. (1997) Sustained release of a water-soluble GP IIb/IIIa antagonist from copoly (DL-lactide/glycolic) acid microspheres. *Int. J. Pharm.* 146, 147-157.
- Thomson F., Muir A., Stirton J., Macphee G., Hudson S. (2001) Parkinson's disease. *Pharm. J.* 267, 600-612.
- Xiaomei B., Su L., Jyothy J., Cheng-Hui H., Xin W., Dong L., Huan X. (2013) Development of PLGA-based itraconazole injectable nanospheres for sustained release. *Int. J. Nanomed.* 8, 4521-4531.
- Xiao X., Chu L., Chen W., Zhu J. (2005) Monodispersed thermoresponsive hydrogel microspheres with a volume phase transition driven by hydrogen bonding. *Polymer* 46, 3199-3209.
- Wang X., Venkatraman S., Boey F., Loo J., Tan L. (2006) Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix. *Biomaterials* 27, 5588-5595.

ABSTRACT

Pramipexole (PMX) is a non-ergot dopamine agonist used to treat Parkinson's disease (PD). The development of an extended release formulation of PMX could be an effective therapeutic strategy to prevent or delay dyskinesias in PD. It would also be fundamental improvement in the treatment of these patients to improve their quality of life and reduce the number of administrations. The aim of this work was to develop and characterize a new formulation for the treatment of PD, consisting in PMX-loaded biodegradable microspheres. The microspheres were prepared using the copolymer of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50, Resomer® RG502) by the technique of emulsion / solvent evaporation from an O / W (A method A) and from a W / O / W (method B) emulsion. The microspheres were characterized by scanning electron microscopy, laser diffraction, differential scanning calorimetry and X-ray. Further, the encapsulation efficiency (EE) was determined and in vitro release studies were performed. The developed microspheres have characteristics of composition and size make it feasible parenteral administration. The EE was significantly higher for microspheres prepared by method B (60.9 ± 8.9%) than for those prepared by method A (45.0 ± 5.2%). Best PMX release profile is achieved with the formulation obtained by Method A, with a constant release of the drug for two weeks (K₀ = 23.3 µg/día/30mg). The microsphere formulation obtained by method A, is an attractive alternative as sustained release system for parenteral administration for PMX in the treatment of PD.

Keywords: Pramipexole, microspheres, PLGA, Parkinson's disease

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 25-32

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 10-05-2014

ORIGINAL ARTICLE

SPRAY-DRYING FROM FUNDAMENTALS TO PULMONARY ADMINISTRATION OF THERAPEUTIC MOLECULES

(Secado por atomización, desde los fundamentos a la administración pulmonar de moléculas terapéuticas)

Nicolas TSAPIS

Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France.

ABSTRACT

Spray-drying is a very common process in the pharmaceutical industry to formulate drugs into a powder. We have modeled the spray-drying process by setting up a simple experiment that allows us to watch spherical droplets as they dry, using a fast camera. This model was used to understand the drying of droplets containing suspensions of colloids. We have shown that the intercolloid forces play an important role in the morphology of the final particles, as well as solvent viscosity. In parallel to this study, we have optimized the formulation of several active principles into porous particles for inhalation. The first drug is diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), a plutonium chelating agent. Its formulation led to an optimized deposition in the lungs of a 60% of the initial dose. Animal studies have shown that the aerosol is more efficient on soluble forms of plutonium than intravenous administration to prevent plutonium retention in the body. The aerosol form of DTPA therefore appears promising for emergency treatment in case of nuclear accident. The second drug we have formulated is sodium alendronate (SA), to increase its bioavailability as compared with oral administration. Its formulation led to an optimized deposition in the lungs of about 60% as well. The administration of the optimized powder to dogs led to an increased bioavailability of 6 % (1.5% for oral bioavailability) with no signs of toxicity. Finally, we present recent results on pyrazinamide an antitubercular drug.

Keywords: Spray-drying, lung delivery, leidenfrost, therapeutic applications.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 33-40

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 05-10-2014

INTRODUCTION

Spray-drying is a common process in the pharmaceutical industry to transform solutions or suspensions into powders. Depending of drug, excipients and drying conditions, particles forming the powder exhibit a variety of morphologies, ranging from spherical dense particles to hollow spherical shells or hollow collapsed shapes. The morphology of particles is of the utmost importance for their further use as drug carriers for different routes of administration and it may have an impact on drug-release or flow properties of the powders. In recent years, the pulmonary route has gained attention as a potential route of administration for the treatment of local and systemic diseases (Edwards *et al.* 1997, Tsapis *et al.* 2003, von Wichert & Seifart 2005). Lung is an attractive target for drug delivery due to its large absorptive surface area, thin pulmonary epithelium and rich blood supply (von Wichert & Seifart 2005). A large number of drugs which are poorly absorbed from enteral route are well absorbed from the lung (He *et al.* 2007). In addition, inhaled drugs bypass the GI tract avoiding hepatic first-pass metabolism and dietary

complications. To efficiently deliver drugs in the lungs, there are basically three strategies. The first strategy consists in nebulizing a liquid solution of drug and excipients, however nebulization remains cumbersome as nebulizers are big and require long nebulization times to yield sufficient drug deposition in the lungs.

The second strategy is the use of metered dose inhalers (MDIs) where the drug is adsorbed on carriers particles such as lactose suspended in liquefied hydrofluoroalkanes. MDIs are usually used for delivering anti-asthma drugs (Colombo *et al.* 2013) as they are easier to use than nebulizers. The last strategy consists in using dry powder inhalers where the drug is encapsulated into particles forming a powder that is delivered through a breath-activated inhaler. This last strategy revealed attractive since it can deliver larger masses of drug to the lungs compared with MDIs. Powders for DPIs can be obtained by different techniques such as micronisation, supercritical fluids, lyophilization or spray drying and associated technique. In this review, we will focus on spray-drying.

Correspondence to: Dr. Nicolas Tsapis (Ph.D.), Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5, rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France
Tel: 33 1 46 83 58 13, Fax: 33 1 46 83 59 46, email: nicolas.tsapis@u-psud.fr

The important parameter to deliver drug to the lungs is the aerodynamic diameter of the nebulized droplets or of particles exiting respectively the nebulizer and the MDI/DPI. The aerodynamic diameter is defined as the produce of the geometric diameter of the particle/droplet- its actual diameter- by the square root of the particle/droplet density (Edwards et al. 1997, Tsapis et al. 2002):

$$d_{aer} = d_g \sqrt{\rho}$$

Depending on their aerodynamic diameter, once inhaled particles/droplets will deposit in different regions of the lungs as detailed in Table 1. According to pharmacopoeias, one can define the fine particle fraction (FPF) which corresponds to percentage of the administered dose of the drug actually reaching the lungs, as the dose with aerodynamic diameter below 5µm divided by the initial dose (Cruz et al. 2011).

Table 1: Site of deposition of particles/droplets as a function of their aerodynamic diameter.

Site of deposition	d_{aer}
Mouth-Throat-Trachea	10-30 µm
Bronchi	3 -10 µm
Bronchioles	
Alveoli	< 3 µm

Depending of the disease one wants to treat, formulation will be optimized to yield deposition in the bronchi/bronchioles region ($3\mu\text{m} \leq d_{aer} \leq 5\mu\text{m}$) for asthma treatment for example, or in the alveolar region ($d_{aer} \leq 3\mu\text{m}$) for systemic passage of the drug for example (Fig.1).

DPIs usually contain small dense particles (Fig. 2) but those are difficult to efficiently disperse and research has focused on porous particles. Large porous particles (LPPs), characterized by geometric sizes greater than 5 µm and mass densities lower than 0.4 g/cm³ (Fig. 2), have been recently introduced for both local and systemic applications after lung delivery (Edwards 2002, Edwards et al. 1997). A major advantage of LPPs relative to conventional inhaled therapeutic aerosol particles is their aerosolization efficiency (Dunbar et al. 1998, Edwards & Dunbar 2002). This allows the supply of large drug masses using a simple inhalation device (Edwards 2002). Advances

in DPI technology were pushed by the idea of delivering insulin by inhalation to the lungs. In 2006, Exubera (Pfizer/Nektar) an inhaled insulin formulation was approved by the FDA but was soon withdrawn due to increased risks of lung cancers. Exubera withdrawal caused a lot of damage to public perception of DPIs. Despite this withdrawal, research is ongoing on DPIs for delivery of anti-asthma drugs, antibiotics or poorly-absorbed molecules (Geller et al. 2011, Selroos 2014, Chan et al. 2012, Gervelas et al. 2007).

Figure 1: Schematic representation of the airways.

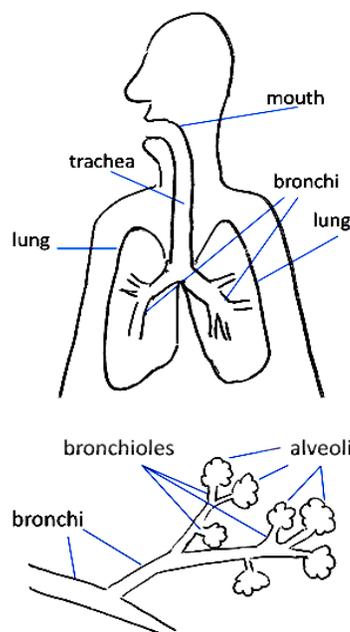
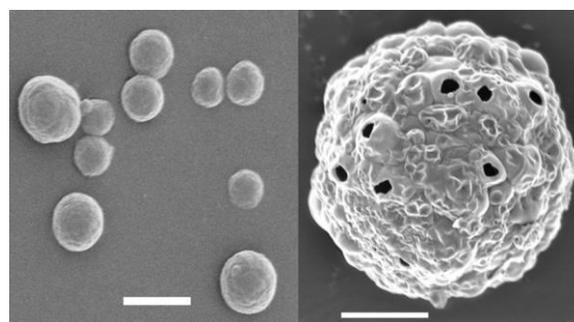


Figure 2: SEM images of typical small dense particles (left) and large porous particles (right) obtained by spray drying. Scale bars represent 2 microns on both images.



Rules governing particle morphology obtained by spray drying are difficult to predict given the large numbers of

parameters involved during the spray-drying process. A lot of theoretical models have been proposed and different experimental methods have been developed to study the dynamics of individual drying droplets in conditions close to those found in a spray-dryer (Yarin *et al.* 2002, Tsapis *et al.* 2005). The most simple one is based on the Leidenfrost effect: a liquid droplet deposited on a hot surface floats on a thin layer of its own vapor. If the droplet radius is smaller than the capillary length, surface tension dominates over gravity, droplets are spherical and evaporation takes place on the whole surface of the droplet, similar to what happens for an isolated droplet during spray drying (Biance *et al.* 2003). Of course, droplets in a spray-dryer are much smaller, they move and temperature evolves throughout the system. However, despite these fundamental differences, experiments with millimetric Leidenfrost droplets should catch the main mechanisms involved during drying. We are in particular interested in the large Peclet number regime. The Peclet number corresponds to the ratio of the mixing time of the solutes in the droplet over the drying time of the droplet. If one dries the droplet slowly as compared to solutes diffusion time, it corresponds to small Peclet number regime. On the other hand, if one dries the droplet quickly compared to diffusion, it corresponds to the large Peclet number regime. Tsapis *et al.* and Vehring have shown that Peclet number modulation has a strong influence on spray-dried particle morphologies (Tsapis *et al.* 2002, Vehring 2008).

In particular, we have studied the influence of model colloids in suspension in water or water/ethanol mixtures on the drying process of droplets and the morphologies

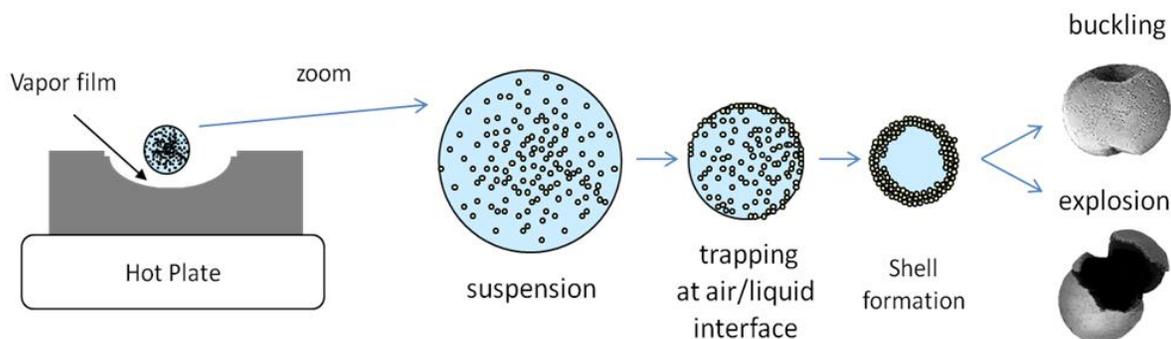
they exhibit. We will present these fundamental experiments and the main results. We will then focus on how these findings may help formulating actual drugs for lung delivery.

MATERIALS AND METHODS

Leidenfrost drying droplets experiments were carried out as detailed in Tsapis *et al.* (Tsapis *et al.* 2005) and Marty and Tsapis (Marty & Tsapis 2008). Briefly, a suspension of 170 nm or 2 μm diameter carboxylate-modified polystyrene colloids were suspended either in water, in MgCl_2 solution or in water/ethanol mixtures at a given volume fraction. Droplets of these suspensions (2 μL to 50 μL) were then deposited using a microsyringe on a stainless steel concave surface (Fig. 3) maintained at high temperature ($>200^\circ\text{C}$) using a heating plate. The drying process was observed using high-speed video. We identify the onset of buckling as the instant when the horizontal and vertical radii of the droplet become measurably different. The droplet's radius at the onset of buckling is noted R_B .

Drug formulation into respirable large porous particles was performed using either the B-191 or the B290 Büchi spray-driers as reported in Gervelas *et al.* (Gervelas *et al.* 2007), Cruz *et al.* (Cruz *et al.* 2011) or Pham *et al.* (Pham *et al.* 2013). Excipients such as dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), hyaluronic acid (HA), ammonium bicarbonate (AB) and leucine (Leu) were used.

Figure 3: Scheme of the experimental Leidenfrost set-up (left). Mechanism of Leidenfrost droplet drying (right).

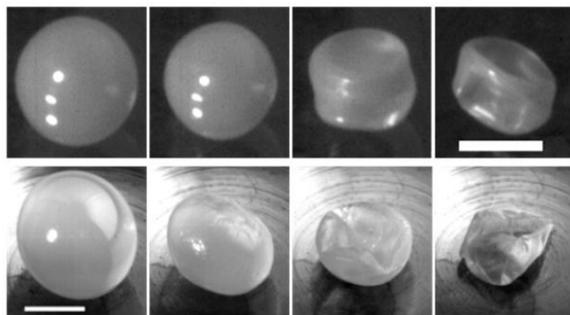


RESULTS AND DISCUSSION

Drying droplets

When droplets of water suspensions of polystyrene colloids dry, we observe first a phase of isotropic shrinkage followed by buckling (Fig. 4). As droplets dry, a viscoelastic shell of densely packed particles forms at its surface. Initially, the shell yields and thickens as the droplet shrinks. Eventually, the capillary forces that drive deformation of the shell overcome the electrostatic forces stabilizing the particles. At this point, the shell undergoes a sol-gel transition, becomes elastic, and buckles. We have shown that the buckling radius is proportional to the initial radius of the droplet and to the (colloid volume fraction)^{1/3}. For a fixed volume fraction, we also show that droplets containing larger colloids buckle later (e.g. R_B is smaller). For a fixed colloid diameter, the thickness-to-droplet radius ratio (T/R) at buckling calculated using mass conservation seems to be constant with variation of the volume fraction.

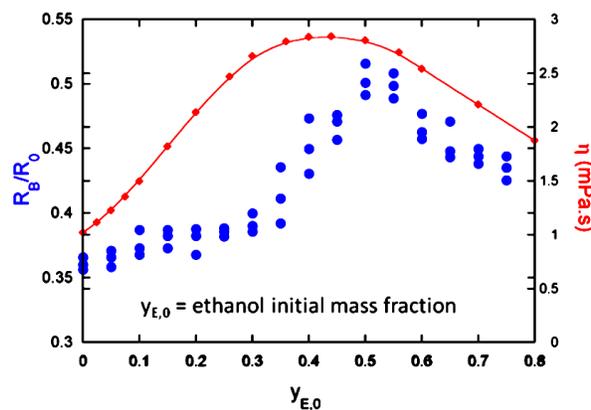
Figure 4: Typical buckling process of a colloidal droplet (170nm colloids at 2mg/mL) in pure water (top) or in 1mM MgCl₂ (bottom). Scale bar = 0.5mm.



Our analysis suggests that the forces between particles in a drying droplet play an important role in determining the onset of buckling. We hypothesize that buckling occurs when the capillary forces driving the deformation and flow of a shell overcome the electrostatic forces stabilizing the particles against aggregation. Therefore, at a critical value of the capillary forces, the particles undergo a sol-gel transition, transforming the shell from a viscous fluid to an elastic solid, and triggering the onset of buckling. We have tested this picture by modifying the interactions of particles in the shell. As shown in Fig. 4, small quantities of divalent salt have a dramatic effect on the morphology of a drying colloidal droplet. Generally, the shells have a more crumpled appearance. This occurs because the shells are thinner, having buckled earlier.

We have also studied the effect of the ethanol mass fraction on the buckling threshold of drying Leidenfrost droplets of ethanol/water containing colloids. For a given particle size, the buckling radius can vary significantly when the mass fraction of ethanol varies (Fig. 5). Subsequently the thickness to radius ratio at buckling T/R varies. The cosolvent mass fraction therefore appears to be an appropriate parameter to tune both the buckling radius and the buckling shell thickness. This variation indeed comes from the variation of the viscosity of the solvent in which colloids are suspended. Viscosity indeed influences the difference of pressure across the colloid shell and subsequently the capillary forces between colloids. We have also observed that above an initial ethanol mass fraction of about 0.6, after buckling, droplet explode therefore creating satellite droplets. The origin of the explosions remains to be fully studied. Although involved phenomena are complicated, notably because of the evolution of the ethanol mass fraction during evaporation, a simplified model of the drying process, associated with a rough evaluation of the physical properties of the system at different ethanol mass fractions, can qualitatively explain experimental observations. These simple experiments could constitute tools to evaluate formulations intended to be spray dried, using only samples of a few microliters.

Figure 5: Variation of the buckling radius over the initial radius, and solvent viscosity as a function of the initial ethanol mass fraction.



Formulation and evaluation of therapeutic powders for inhalation

In addition to modeling droplet drying, we have formulated a few drugs into microparticles by spray-drying for lung delivery. The goal was to obtain powders suitable for lung delivery.

We have first formulated DTPA, an actinide chelating agent. DTPA has demonstrated its ability to complex plutonium (Pu) and to facilitate its urinary excretion after internal contamination. This process, known as decorporation is crucial to diminish the burden of Pu in the body. The ability to deliver a chelating agent directly to the alveolar region may increase its local concentration as compared to systemic delivery and therefore increase the extent of decorporation. In addition, inhalation offers the potential for needle-free, systemic delivery of small molecules and would be convenient in case of nuclear accident as a first pass emergency treatment. To benefit from the improvement of inhalation technology, we have formulated DTPA into porous particles by spray-drying the molecule along with Leucine, DPPC and ammonium bicarbonate.

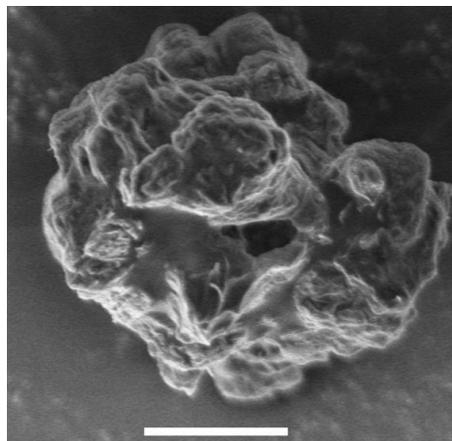
When formulating dry powders for inhalation, the strategy is first to try and spray dry a solution of the drug only. Most of the time, the resulting powder is not adequate for lung delivery due bad aerosolization properties. Excipients are therefore added to improve powder properties. In the case of DTPA, the powder made of pure DTPA was composed of small particles of 2 microns that were very sticky. DPPC was added as a permeation enhancer. It is considered safe as it is the major component of lung surfactant. Leucine is an amphiphilic amino-acid that has been shown to go to the droplet interface as it dries and favors surface roughness, therefore reduce particle aggregation. Ammonium bicarbonate sublimates over 36°C into ammonia, water and carbon dioxide therefore favoring particle porosity. DTPA, leucine and ammonium bicarbonate were solubilized in water and DPPC in ethanol before solutions were mixed (70:30 ethanol:water v:v) to yield a final solid concentration of 2g/L omitting ammonium bicarbonate that would sublime (75% DTPA, 10% DPPC and 15% leucine by weight). Spray drying conditions were optimized to yield particles possessing a volume mean geometric diameter around 4.5µm, a crumpled paper morphology and a powder tap density of 0.04g/cm³. (Fig. 6).

The in vitro aerodynamic evaluation using a Multistage Liquid Impinger (MSLI) shows that about 56% of the powder should deposits in the lungs, with about 27% in the alveolar region, an improvement as compared with the marketed micronized powder available with the Spinhaler® (Tymen *et al.* 2000).

The powder was administered to rats contaminated either with Pu-nitrate a soluble form of Pu or with PuO₂ a poorly soluble form of Pu. Delayed treatment 24 hours post contamination revealed unefficient for both forms of Pu. When animals were contaminated with Pu-nitrate, lung administration performed 1 hour post contamination was twice as efficient as the intravenous administration of

DTPA for reducing Pu lung burden. In addition, Pu accumulation in liver and bones was reduced as efficiently as the intravenous treatment.

Figure 6: SEM image of a typical particle of the optimized DTPA powder.



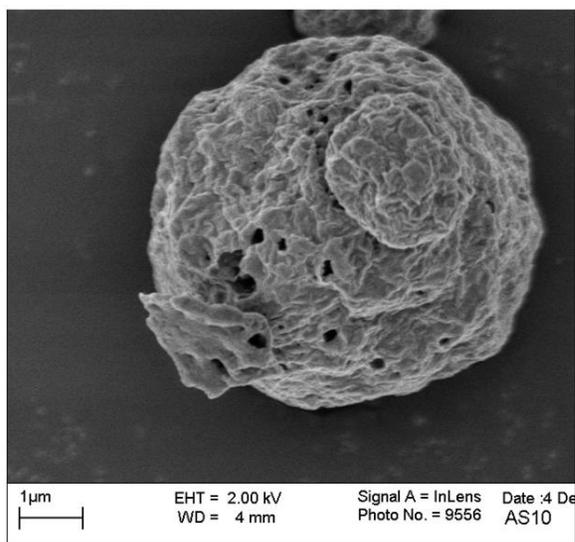
These results prove that DTPA chelates Pu in the lungs and that DTPA also crosses the lung barrier and reaches the systemic compartment where it prevents Pu deposition in liver and bones. When rats are contaminated with PuO₂ and treated 1 hour post contamination, the aerosol of DTPA is as efficient as the intravenous administration of DTPA (Gervelas *et al.* 2007, Serandour *et al.* 2007, Gremy *et al.* 2012, Gremy *et al.* 2010). This new form of inhalable DTPA therefore represents an interesting emergency treatment worth pursuing. Studies about acute and chronic toxicity of the powder should be carried out in the future.

Another drug worth of interest for lung delivery is sodium alendronate (SA), used to treat osteoporosis. SA exhibits a poor bioavailability by the oral route and is responsible of GI tract irritations. Given inhaled drugs bypass the GI tract avoiding hepatic first-pass metabolism and dietary complications (Labiris & Dolovich 2003), the development of a formulation of sodium alendronate intended for inhalation would be another interesting strategy to circumvent the disadvantages presented by other routes. Reducing the incidence of GI irritation and improving the absorption may increase the patient convenience and compliance to sodium alendronate therapy.

Spray-dried powders for lung delivery of SA were prepared from hydroalcoholic solutions. In this case due to the solubility limit of SA, a 40:60 ethanol:water v:v solution was used. Particles produced using only SA were small and aggregated, however they already presented interesting aerosolization properties with an FPF of about 45% and an

alveolar fraction of 30%. To further improve aerosolization properties, leucine and ammonium bicarbonate were added leading to large porous particles (5 to 12 microns) with rough surfaces (Fig. 7). Formulations display geometric particle size below 12 μm and spherical shape associated to a hollow structure. The tap density ranges from 0.016 to 0.062 g/cm^3 , decreasing as leucine concentration increases. For all formulations, the calculated aerodynamic diameters are lower than 5 μm .

Figure 7: SEM image of a typical SA microparticle obtained by spray-drying.

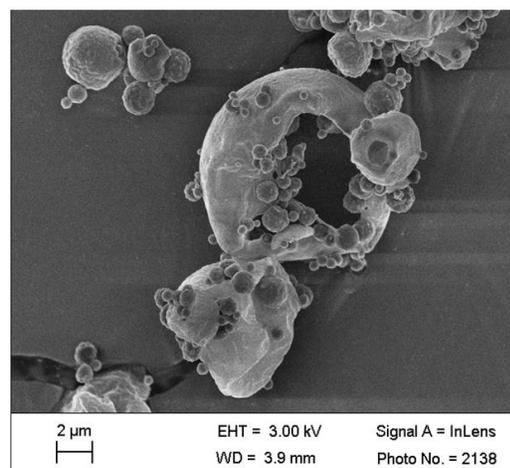


The *in vitro* aerodynamic evaluation shows that all powders present a high emitted fraction of 100%, a fine particle fraction ranging from 34.4% to 62.0% and an alveolar fraction ranging from 23.7% to 42.6%. An optimized sample was evaluated regarding SA acute pulmonary toxicity and lung bioavailability. The bronchoalveolar lavage study shows that the intratracheal administration of SA dry powder and sodium alendronate aqueous solution do not induce significant increases of lung toxicity indicators as compared with the positive control. Moreover, the intratracheal administration of SA dry powder results in a $6.23 \pm 0.83\%$ bioavailability, a 3.5-fold increase as compared to oral bioavailability (Cruz et al. 2011). Finally, these results suggest that SA pulmonary delivery could be a new and promising administration route. Indeed, studies about chronic toxicity of the powder should be carried out in the future.

We have also optimized the formulation of pyrazinamide (PZA), an antitubercular drug, as large porous particles intended for deep lung delivery. By simply spray-drying

PZA, we have obtained crystalline particles of the δ polymorph of PZA that were unstable and not adapted for deep lung delivery. Several excipients were added to the formulation to obtain stable large porous particles with a median size above 5 microns and a low tap density. Although a combination of leucine and ammonium bicarbonate (AB) allowed to reduce tap density and to increase particle size, these excipients were not sufficient to prevent crystallization and promote stability. The addition of hyaluronic acid (HA) in combination with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) allowed to obtain stable partially crystalline spherical particles adapted for deep lung delivery. The optimized formulation obtained by spray-drying 0.9 g/L PZA, 0.6 g/L leucine, 0.2 g/L HA and 0.3 g/L DPPC and 2g/L AB in a mixture of ethanol-water (70/30 v/v) possesses a median size of $5.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ and a tap density around $0.09 \pm 0.01 \text{g}/\text{cm}^3$. The powder is stable for more than 4 weeks of storage and the aerodynamic evaluation showed that 40% of the powder should deposit in the lungs (Pham et al. 2013). A complete pharmacokinetics/biodistribution study needs to be performed in the future.

Figure 8: SEM image of the optimized PZA formulation



CONCLUSION

We have shown that Leidenfrost droplet experiments are an interesting tool to capture the physics of droplet drying. These simple experiments could constitute tools to screen formulations intended to be spray dried, using only samples of a few microliters. In addition, several drugs were successfully formulated by spray-drying for lung delivery either to improve their bioavailability or to increase their lung concentration for local treatments. Many other drugs could be of interest to deliver directly in the lungs, among them antibiotics to prevent COPD or

cystic fibrosis related infections, or corticosteroids to treat asthma.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank all the students and post-doctoral fellows that have contributed to this work: L. Cruz, C. Gervelas, G. Marty and D.D. Pham. Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

REFERENCES

- Biance, A. L., Clanet, C. and Quere, D. (2003) Leidenfrost drops. *Phys Fluids*, **15**, 1632-1637.
- Chan, J. G., Chan, H. K., Prestidge, C. A., Denman, J. A., Young, P. M. and Traini, D. (2012) A novel dry powder inhalable formulation incorporating three first-line anti-tubercular antibiotics. *Eur J Pharm Biopharm*.
- Colombo, P., Traini, D. and Buttini, F. (2013) Inhalation drug delivery Techniques and Products. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Cruz, L., Fattal, E., Tasso, L., Freitas, G. C., Carregaro, A. B., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. and Tsapis, N. (2011) Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. *J Control Release*, **152**, 370-375.
- Dunbar, C. A., Hickey, A. J. and Holzner, P. (1998) Dispersion and Characterization of Pharmaceutical Dry Powder Aerosols. *Kona*, **16**, 7-45.
- Edwards, D. A. (2002) Delivery of biological agents by aerosols. *AIChE Journal*, **48**, 2-6.
- Edwards, D. A. and Dunbar, C. (2002) Bioengineering of Therapeutic Aerosols. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **4**, 93-107.
- Edwards, D. A., Hanes, J., Caponetti, G. et al. (1997) Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, **276**, 1868-1871.
- Geller, D. E., Weers, J. and Heurding, S. (2011) Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere technology. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, **24**, 175-182.
- Gervelas, C., Serandour, A. L., Geiger, S. et al. (2007) Direct lung delivery of a dry powder formulation of DTPA with improved aerosolization properties: Effect on lung and systemic decorporation of plutonium. *J Control Release*, **118**, 78-86.
- Gremy, O., Tsapis, N., Bruel, S., Renault, D. and Van der Meeren, A. (2012) Decorporation Approach Following Rat Lung Contamination with a Moderately Soluble Compound of Plutonium Using Local and Systemic Ca-DTPA Combined Chelation. *Radiat Res*, **178**, 217-223.
- Gremy, O., Tsapis, N., Chau, Q. A., Renault, D., Abram, M. C. and Van der Meeren, A. (2010) Preferential Decorporation of Americium by Pulmonary Administration of DTPA Dry Powder after Inhalation of Aged PuO₂ Containing Americium in Rats. *Radiat Res*, **174**, 637-644.
- He, L., Gao, Y., Lin, Y. and Katsumi, H. (2007) Improvement of pulmonary absorption of insulin and other water-soluble compounds by polyamines in rats. *J Control Release*, **122**, 94-101.
- Labiris, N. R. and Dolovich, M. B. (2003) Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol*, **56**, 600-612.
- Marty, G. and Tsapis, N. (2008) Monitoring the buckling threshold of drying colloidal droplets using water-ethanol mixtures. *Eur Phys J E*, **27**, 213-219.
- Pham, D. D., Fattal, E., Ghermani, N., Guiblin, N. and Tsapis, N. (2013) Formulation of pyrazinamide-loaded large porous particles for the pulmonary route: Avoiding crystal growth using excipients. *Int J Pharmaceut*, **454**, 668-677.
- Selroos, O. (2014) Dry-powder inhalers in acute asthma. *Ther Deliv*, **5**, 69-81.
- Serandour, A. L., Tsapis, N., Gervelas, C. et al. (2007) Decorporation of plutonium by pulmonary administration of Ca-DTPA dry powder: A study in rat after lung contamination with different plutonium forms. *Radiat Prot Dosim*, **127**, 472-476.
- Tsapis, N., Bennett, D., Jackson, B., Weitz, D. A. and Edwards, D. A. (2002) Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *P Natl Acad Sci USA*, **99**, 12001-12005.
- Tsapis, N., Bennett, D., O'Driscoll, K. et al. (2003) Direct lung delivery of para-aminosalicylic acid by aerosol particles. *Tuberculosis (Edinb)*, **83**, 379-385.
- Tsapis, N., Dufresne, E. R., Sinha, S. S., Riera, C. S., Hutchinson, J. W., Mahadevan, L. and Weitz, D. A. (2005) Onset of buckling in drying droplets of colloidal suspensions. *Phys Rev Lett*, **94**.
- Tymen, H., Schoultz, D., Caire-Maurisier, A.-M., Chervrier, F. and Curet, P. M. (2000) Traitement d'urgence des contaminations internes par les transuraniens. Une nouvelle forme galénique du Na₃CaDTPA micronisé. *Radioprotection*, **35**, 473-485.
- Vehring, R. (2008) Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharmaceutical Research*, **25**, 999-1022.
- von Wichert, P. and Seifart, C. (2005) The lung, an organ for absorption? *Respiration*, **72**, 552-558.
- Yarin, A. L., Brenn, G., Kastner, O. and Tropea, C. (2002) Drying of acoustically levitated droplets of liquid-solid suspensions: Evaporation and crust formation. *Phys Fluids*, **14**, 2289-2298.

RESUMEN

El secado por atomización es un proceso muy común en la industria farmacéutica para incorporar fármacos dentro de polvos. Hemos modelado el proceso de secado por atomización mediante la creación de un experimento simple que nos permite ver las gotitas esféricas cuando se secan, usando una cámara rápida. Este modelo fue utilizado para comprender el secado de las gotitas que contienen suspensiones de coloides. Hemos demostrado que las fuerzas intercoloidales juegan un papel importante en la morfología de las partículas finales, así como viscosidad del disolvente. Paralelamente a este estudio, hemos optimizado la formulación de varios principios activos en partículas porosas para la inhalación. El primer fármaco es el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), un agente quelante de plutonio. Su formulación lleva a una deposición optimizada en los pulmones de un 60 % de la dosis inicial. Los estudios en animales han demostrado que el aerosol es más eficiente en formas solubles de plutonio que la administración intravenosa para prevenir la retención de plutonio en el cuerpo. Por lo tanto, la forma de aerosol de DTPA parece ser prometedora para el tratamiento de emergencia en caso de accidente nuclear. La segunda droga que hemos formulado es alendronato sódico (SA), para aumentar su biodisponibilidad en comparación con la administración oral. Su formulación lleva también a una deposición optimizada en los pulmones de aproximadamente el 60 %. La administración de la formulación optimizada en perros dió lugar a un aumento de la biodisponibilidad de 6% (1,5% para la biodisponibilidad oral) sin signos de toxicidad. Finalmente, se presentan los resultados recientes sobre la pirazinamida, una droga antituberculosa.

Palabras Claves: El secado por atomización, liberación pulmonar, Leidenfrost, aplicaciones terapéuticas.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 33-40

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 05-10-2014

ARTÍCULO ORIGINAL

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES DE CAPSAICINA Y EVALUACIÓN DE
CESIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS
(Development of biodegradable capsaicin nanoparticles and evaluation of active release from
semisolid formulations)

Paula Mantellero G.^{1*}, Carolina Gómez-Gaete¹, Javiana Luengo C.¹, Ricardo Godoy R.² y Rayén Pinto S.¹

¹Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Laboratorio de Análisis Farmacéutico, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

RESUMEN

Se optimizó la encapsulación de capsaicina en el seno de nanopartículas poliméricas biodegradables y se evaluó su cesión a partir de éstas incorporadas en una forma farmacéutica semisólida, utilizando celdas de difusión de Franz. Para cumplir con este objetivo, las nanopartículas fueron elaboradas por el método emulsión- evaporación de solvente. Se investigó la influencia de varios parámetros que afectan la encapsulación del principio activo, como son el tipo de solvente orgánico empleado, el tiempo de sonicación aplicado, la naturaleza del polímero, la masa inicial de capsaicina y el método de elaboración de las nanopartículas. Posteriormente, con la formulación seleccionada se evaluó la cesión del fármaco *in vitro* y ésta se comparó con una formulación comercial. La carga y eficiencia de encapsulación más alta del fármaco (400 µg y 70,2% respectivamente) se obtuvo con 100 mg de polímero PLA, en una mezcla de diclorometano-acetona (1:1 v/v), con un tiempo de sonicación de 5 minutos y 4 mg de capsaicina como masa inicial. Las partículas obtenidas fueron monodispersas, tuvieron un diámetro medio de 249 ± 42 nm, con un índice de polidispersidad de 0,06. El potencial zeta fue de -7,45 mV. Finalmente, los estudios de liberación *in vitro* a partir de diferentes formulaciones semisólidas de capsaicina, arrojaron un valor de flujo y porcentaje de liberación de capsaicina de $0,2646 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ y 57 % para las nanopartículas cargadas en crema base de la formulación comercial; $0,0634 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ y 25 % para capsaicina al estado libre en la formulación comercial; $0,0411 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ y 10 % para las nanopartículas blancas en la formulación comercial, respectivamente.

Palabras Claves: Capsaicina, Nanopartículas, Liberación *in vitro*, Celdas de difusión de Franz.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 41-49

Recivido 01-04-2014; Revisado 01-05-2014; Aceptado 10-05-2014

1) INTRODUCCIÓN

La nanotecnología farmacéutica se centra en la elaboración de vectores biocompatibles de agentes terapéuticos cuyo tamaño bordea el orden de los nanómetros, estos vectores son llamados comúnmente nanopartículas (NP) (Hernández Herrero et al. 2010).

Su aplicación en la industria farmacéutica es variada por otorgar ventajas específicas al organismo como: mejorar la seguridad, biodisponibilidad, estabilidad y vida media de los fármacos, actuar en niveles sub-celulares, proteger al principio activo (p.a), aumentar la absorción de éstos y crear nuevos sistemas de liberación controlada, que aumentan la eficacia de los medicamentos y reducen sus efectos adversos (Torchilin 2006).

Las NP pueden ser elaboradas por polímeros sintéticos PLA (polímero del ácido láctico) y PLGA (copolímero del ácido láctico y glicólico), ampliamente utilizados en la industria biomédica por ser biocompatibles y biodegradables,

aprobados para el uso humano por la FDA (Gad 2008, Kumari et al. 2010, Manchanda et al. 2010, Vasir & Labhasetwar 2007).

PLA, polímero termoplástico sintético hidrofóbico se degrada inicialmente por hidrólisis, lo cual conlleva a la liberación de monómeros de ácido láctico. Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica (Hernández Herrero et al. 2010, Flórez Beledo 1997), resultando óptimos desde el punto de vista toxicológico (Venter et al. 2001, Walters 2002). PLA es uno de los materiales poliméricos más utilizados en la industria biomédica y en el desarrollo de nanopartículas para lograr una liberación controlada del p.a (Kumari et al. 2010). PLGA, por su parte, se hidroliza en el cuerpo para producir monómeros de ácido láctico y ácido glicólico.

Correspondencia a: Dr. Paula Mantellero G., Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Barrio Universitario S/N, Casilla 237, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-2661334, Fax: 56-41-2207086, Correo electrónico: paulamantellero@udec.cl

El ácido glicólico tiene como productos de degradación dióxido de carbono y agua, que son totalmente reabsorbidos por el organismo, formando parte del metabolismo de los carbohidratos (Valderrama 1998). La capsaicina se utiliza principalmente por su efecto analgésico en el tratamiento del dolor neuropático. El dolor neuropático es uno de los síndromes dolorosos más complejos y de difícil tratamiento, resultantes del daño neurológico (periférico, central, o ambos), en una parte del sistema de transmisión nerviosa del dolor y, se asocia a la neuralgia postherpética, neuropatía diabética, dolor neuropático asociado al SIDA, neuralgia del trigémino, síndrome doloroso postmastectomía y dolor complejo regional (Serra Catafau 2007).

El mecanismo de acción de la capsaicina conlleva a una depleción de sustancia P en el sistema nervioso central y periférico. Por lo que, la exposición repetida de capsaicina produce desensibilización reversible de las terminaciones nerviosas sensitivas y pérdida de respuesta al estímulo sensorial (Flórez Beledo 1997, Vidal *et al.* 2004). Por otro lado, la capsaicina tiene acción antiinflamatoria, usándose ampliamente en enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide en pacientes que presentan un tratamiento refractario (Oyagbemi *et al.* 2010, Khan *et al.* 2007).

Se han utilizado diversos fármacos para el dolor neuropático, pero en ningún caso se obtiene un alivio que supere el 60% (alivio moderado) y los efectos secundarios a menudo impiden su uso por períodos extensos. La capsaicina tópica se prefiere como primera opción para el tratamiento del dolor neuropático si el área afectada es pequeña (Serra Catafau 2007). A pesar de los innumerables beneficios de la capsaicina, un porcentaje de pacientes presentan efectos adversos tras la administración por vía tópica, dentro de los cuales destacan: hiperalgesia al calor y a la presión, vasodilatación y sensación de quemazón (Vidal *et al.* 2004). Estos efectos indeseables se deben probablemente a que el principio activo se encuentra totalmente disponible para su rápida absorción.

Los experimentos *in vitro* son ampliamente utilizados para estudiar la cinética de liberación de moléculas a partir de formulaciones semisólidas y se han conducido tradicionalmente al empleo de las denominadas celdas de liberación. Dentro de éstas, la celda de difusión de Franz es la más apropiada para la determinación de la cinética de liberación de p.a dentro de sistemas para la vía tópica y transdérmica. Estos procedimientos registran la liberación de fármacos y miden sólo aquellas interacciones p.a/vehículo que afectan a las características de liberación (Venter *et al.* 2001, Shah *et al.* 1989, Walters 2002).

Las celdas de difusión comprenden un medio donante (la formulación) que libera la sustancia penetrante a través de

una membrana a un medio receptor sometido a agitación. Pudiendo obtener de esta manera, una estimación del comportamiento que podría presentar el p.a nanoencapsulado una vez aplicada la formulación en la piel (Venter *et al.* 2001, Shah *et al.* 1989, Walters 2002).

Teniendo en consideración la información anteriormente expuesta, surge la necesidad de desarrollar una formulación semisólida a base de nanopartículas de capsaicina que sea capaz de modular la liberación del principio activo y evaluar este comportamiento a través de celdas de difusión de Franz.

2) MATERIALES Y MÉTODOS

2.1) Materiales:

Capsaicina, donación Laboratorio Pasteur S.A., Concepción, Chile. PLA Resomer® R 202 S, Boehringer Ingelheim (Alemania), PLGA Resomer® RG 752 S Boehringer Ingelheim (Alemania), Alcohol polivinílico hidrolizado 87-90 %, Sigma-Aldrich, Alemania. Acetona, diclorometano, pro análisis., J.T Baker, USA. Acetato de etilo, metanol, pro análisis, Merck, Alemania. Acetonitrilo, grado cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), Merck, Alemania. Formulación comercial: crema de capsaicina al 0,025% disponible en el mercadoy crema base, ambas donaciones de Laboratorio Pasteur S.A., Concepción, Chile. Agua filtrada por sistema de purificación de agua Simplicity® Millipore (USA).

2.2) Preparación de NP:

Se realizó la elaboración de nanopartículas poliméricas de capsaicina por medio del método emulsión evaporación de solvente. Para ello, se disolvió una cantidad apropiada de polímero PLGA o PLA, y capsaicina (en rango de 1-15 mg) en solvente orgánico (proporción polímero:solvente 1:5). La solución orgánica fue pre-emulsificada con una solución acuosa de emulgente alcohol polivinílico (PVA) al 0,25% p/v usando vórtex (Genie 2, Scientific Industries, Inc, USA) a 900 rpm por un minuto, se utilizó una proporción fase acuosa/fase orgánica 4:1. Esta emulsión primaria se introdujo en un baño de hielo y fue sonicada con una sonda ultrasonido (Vibra Cell, Model VCX 130, Equilab, USA) de 130 Watt (de 2 a 5 minutos) con un 80% de amplitud, obteniendo una emulsión secundaria fina. Se removió la fase orgánica de la emulsión por evaporación bajo campana, con una agitación constante (Agitador magnético Multistirrer 6, Velp Científica) de 600 rpm por un periodo de tiempo establecido (3 horas).

La suspensión de nanopartículas se completó a peso con agua nano pura. Los cristales de capsaicina no nanoencapsulada fueron visualizados por microscopía óptica. Se eliminaron los cristales de la suspensión de NP por filtración de la suspensión, con un filtro tamaño de

poro 0,22 μm , tamaño de poro suficiente para remover todos los cristales sin interferir con la distribución de tamaño de las NP.

2.3) Carga de capsaicina en las NP:

Posterior eliminación de los cristales por filtración, se centrifugó 4 mL de la suspensión de NP (19,000 rpm por 30 min a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ Kubota 7930, rotor RA 400). Se extrajo inmediatamente el sobrenadante para eliminar la capsaicina soluble. Se agregó al sedimento 1 mL de clorpropamida como estándar interno y 5 mL de acetonitrilo. Se agitó la suspensión anterior con vórtex durante 1 minuto. Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos para eliminar el emulgente PVA. Se filtró el sobrenadante por filtro 0,22 μm . se recibió el filtrado en un tubo Eppendorf. Se cuantificó la capsaicina extraída desde las NP por (HPLC) en fase reversa. Se contó con un cromatógrafo equipado con una bomba cuaternaria LaChrom L-2130 Merck Hitachi, una válvula de inyección Rheodyne con loop de 20 μL , y una columna apolar LichroCart 250-4mm, LiChrospher RP-18, tamaño de partícula 5 μm , Merck CO. La detección se realizó mediante un detector UV de longitud de onda programable Merck Hitachi La Chrom L-2400 Merck CO. Se realizó el análisis a 281 nm como longitud de onda de trabajo. Se elaboró una fase móvil compuesta con una mezcla de solventes, ACN / $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{PO}_3$ diluido 1:1000 (60:40 v/v) con flujo de 1 mL/min. El desarrollo del método mostró un rango de concentración lineal entre 0,48 y 150,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = 0,011x - 0,003$; con $r^2 = 0,999$).

La cantidad de capsaicina encapsulada se determinó según las siguientes expresiones matemáticas (Nimesh et al. 2006):

$$\% \text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{mg capsaicina atrapada} * 100}{\text{mg capsaicina empleada}}$$

$$\text{Carga} = \frac{\text{mg capsaicina atrapada} * 100}{\text{mg polímero empleado}}$$

2.4) Distribución de tamaño y potencial zeta:

La distribución del tamaño de las nanopartículas se determinó con el equipo Zetasizer NanoZS Malvern, cuyo principio de funcionamiento se basa en la dispersión de la luz. Se realizaron las mediciones en triplicado a 25°C , y se diluyó la suspensión de nanopartículas (1/100 v/v) en agua nanopura.

Con el objetivo de conocer la carga eléctrica de las nanopartículas, se midió el potencial Zeta de éstas, basándose en el fenómeno de la movilidad electroforética. Los análisis fueron efectuados empleando el mismo

equipo, siguiendo una dilución 1/50 v/v en agua nanopura a 25°C . El intervalo de polidispersidad fue comprendido entre 0 y 1.

2.5) Microscopia Electrónica de Barrido (SEM):

Se realizó MEB con el microscopio Jeol, modelo JSM-6380 LV, el cual utiliza un voltaje de aceleración de 20 kV. Se depositó la muestra sobre una lámina de vidrio y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se cubrió con una capa de oro de 500 Å de espesor a través de un metalizador Edwards S150. Previamente las partículas fueron centrifugadas (alrededor de 7,000 rpm por 20 min) para eliminar el exceso de surfactante que disminuye la calidad de las imágenes.

2.6) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM):

La morfología de la superficie a escala nanométrica se determinó por Microscopio de fuerza atómica, (AFM Bioscope modelo BS3-Z2). Las muestras se depositaron sobre un soporte inerte, y fueron secadas con aire comprimido. La resolución fue 512 x 512 pixeles. Con el objetivo de evitar la generación de arificios en la muestra, la fuerza del *tip* fue minimizada.

2.7) Difracción de Rayos X:

El estudio se realizó con un Difractómetro de Rayos X Bruker D4, Endeavor®, el cual utiliza como fuente de radiación un ánodo de Cobre ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Se colocaron las muestras en el equipo para iniciar las lecturas respectivas en un rango de 2θ ($5 - 40^\circ$), con un tiempo de lectura de 0,2 segundos, utilizando un *Slit* variable de 6,0 mm.

2.8) Cinética de Liberación *in vitro*:

El estudio de liberación *in vitro* de capsaicina a partir de distintas formulaciones semisólidas se realizó con celdas de difusión de Franz (Perme Gear con baño de agua, 6G-02-00-09-05, SES GmbH Analytical System, Bechenheim, Alemania) bajo condiciones *sink*, donde la concentración de capsasicina se mantuvo 10 veces por debajo de la concentración de saturación de ésta en buffer HEPES + Tween® 80 al 1% (64, 02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Khan et al. 2007). La concentración de saturación de 64 $\mu\text{g}/\text{L}$ se estableció según lo reportado en bibliografía (Turgut et al. 2004).

Se utilizó una membrana de diálisis de celulosa, MWCO 12-14 kDa, con área para difusión asociada a una de 0,64 cm^2 . La membrana se colocó entre el compartimento donante y el receptor. Como donante se utilizaron las siguientes formulaciones: formulación comercial (crema de capsaicina al 0,025% disponible en el mercado), NP de capsaicina incorporadas por dilución geométrica en la crema base de la formulación comercial (formulación comercial sin p.a),

por último, NP blancas incluidas por dilución geométrica en la formulación comercial y, como receptor 5 mL de buffer HEPES + Tween® 80 al 1%. Se selló el compartimento donador y se mantuvo las celdas en baño de agua a 32 ± 1 ° C. El medio receptor se agitó constantemente usando barras magnéticas a 300 rpm. Se tomó alícuotas de 0,5 mL de la cámara receptora a intervalos de tiempo predeterminados (1, 2, 3, 4, 6, 8, 22, 30, 45, 52, 69, 76, 93, 117 h), restituyendo inmediatamente con solución donante. Las muestras extraídas fueron sometidas a evaporación y posterior reconstitución con 1 mL de ACN + S.I. Se determinó la cantidad de capsaicina cedida por el compartimento receptor por HPLC.

2.9) Análisis Estadístico:

En análisis de varianza de una vía con posterior test de Tukey, con un $\alpha=0,05$, se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad Prism version 5.01, GraphPad Software.

3) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrollaron NP de capsaicina por el método emulsión evaporación de solvente a partir de una emulsión simple o/w. Las propiedades deseables de nanopartículas fueron: alta eficiencia de encapsulación, apropiada distribución de tamaño y un adecuado perfil de liberación.

3.1) Efecto del solvente orgánico en la encapsulación de capsaicina:

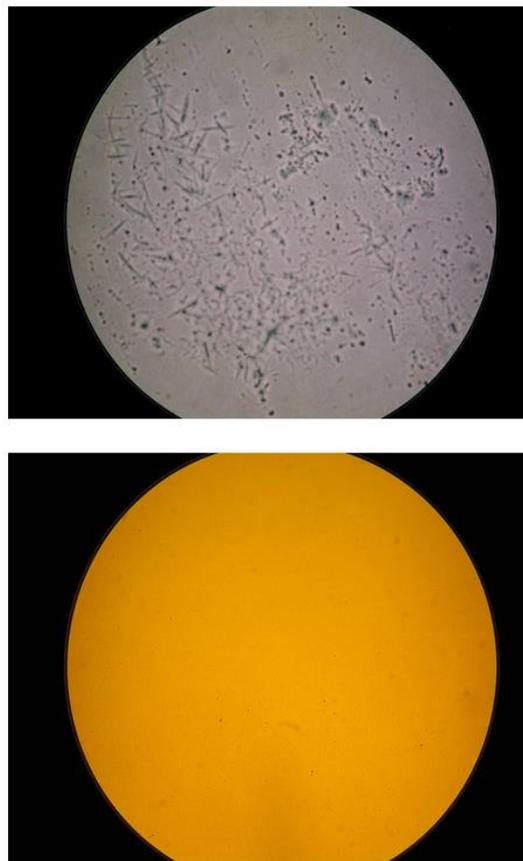
Se evaluó el efecto de diferentes solventes orgánicos para disolver tanto al polímero como el p.a. Para este propósito se utilizó diclorometano y acetato de etilo, y como co-solventes acetona y metanol, solventes ampliamente utilizados como fase orgánica para la encapsulación de activos hidrofóbicos en NP con PLA/PLGA (Wischke & Schwendeman 2008). Se mantuvo constante la masa de capsaicina (4 mg) y del polímero (100 mg), mientras la concentración del emulgente fue 0,25 %. Las proporciones fueron elegidas experimentalmente según la solubilidad de ambos componentes. Se observaron las suspensiones al microscopio óptico y se distinguieron cristales en todas las muestras. Eso significa que parte del p.a no estaba encapsulado. Fue menor el tamaño y número de cristales cuando se empleó la mezcla acetona:diclorometano. Los solventes orgánicos, debido a su miscibilidad con el agua, difunden en la fase acuosa, provocando un aumento temporal en la solubilidad del activo. Sin embargo, cuando el solvente orgánico es completamente evaporado, la solubilidad decrece y parte de la droga puede cristalizar en la fase continua (Layre et al. 2006). La cantidad de cristales se evaluó cualitativamente por microscopía óptica,

mientras que la capsaicina nanoencapsulada se cuantificó por HPLC según el método descrito previamente. Se obtuvo NP monodispersas, con un bajo índice de polidispersidad de 0,06.

3.2) Efecto de la naturaleza del polímero en las NP:

Las suspensiones elaboradas con PLGA presentaron un gran número de cristales (figura N°1 arriba), mientras que una ausencia de ellos fue observada en las suspensiones con PLA (figura N°1 abajo). PLGA y PLA difieren en que el PLA está exento de ácido glicólico (fracción polar) en su estructura, otorgándole un carácter más hidrofóbico. La alta hidrofobicidad del PLA y la elevada apolaridad de la capsaicina sugieren una mayor interacción fármaco-polímero, causando una mayor incorporación del fármaco en las nanopartículas (Budhian et al. 2007).

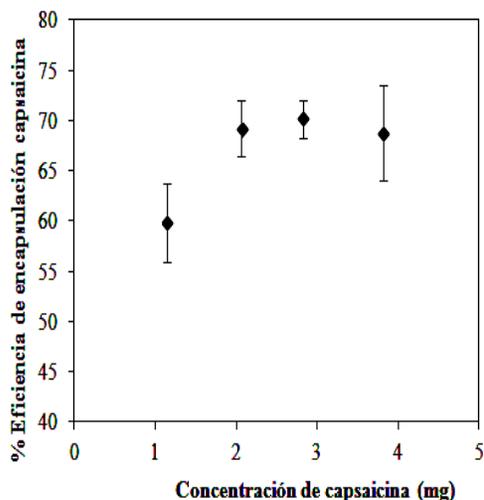
Figura N° 1: Imagen obtenida mediante microscopía óptica de cristales de capsaicina. NP elaboradas con 100 mg de Polímero y 4 mg de capsaicina. Arriba: empleando polímero PLGA. Abajo: empleando polímero PLA.



3.3) Efecto de la masa inicial de capsaicina:

Se elaboraron suspensiones de NPs de capsaicina. Se varió la cantidad de p.a en un rango de 1-4 mg, utilizando acetona/diclorometano en proporción 1:1, un tiempo de sonicación de 5 min y 100 mg de PLA. Se inyectaron las muestras en el sistema cromatográfico. El análisis de varianza muestra una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre las muestras estudiadas. De ellas, sólo la comparación de las masas iniciales 1,14 y 2,86 mg muestran una diferencia significativa ($P < 0,05$). Se observó un aumento en la eficiencia de encapsulación al aumentar la cantidad de capsaicina adicionada, llegando a un máximo de 70,2%, con una masa inicial de 3 mg de p.a (Figura N° 2).

Figura N° 2: Eficiencia de encapsulación de capsaicina en función de la masa inicial (Datos presentados con \pm DS).



Al analizar la carga, el análisis de varianza arrojó una diferencia estadísticamente muy significativa ($P < 0,01$) entre las muestras estudiadas, siendo todas diferentes entre sí. Se observa una relación directamente proporcional en el intervalo de concentración estudiado, llegando a un máximo de carga de 400 $\mu\text{g}/100$ mg de polímero, con una masa inicial adicionada de 4 mg de capsaicina (figura N° 3). Lo planteado anteriormente sugiere una masa inicial óptima de capsaicina de 4 mg.

3.4) Microscopia Electrónica de Barrido:

Se empleó esta técnica con el fin de investigar tamaño y superficie de las partículas. A pesar de la dificultad para visualizar las nanopartículas, debido a que la potencia amplificadora otorgada por el haz de electrones produce daño en la muestra, se observó (en la figura N° 4) una

nanopartícula, con un tamaño cercano a los 300 nm. No fue posible observar características de superficie.

Figura N° 3: Gráfico carga capsaicina en función de la masa inicial (Datos presentados con \pm DS).

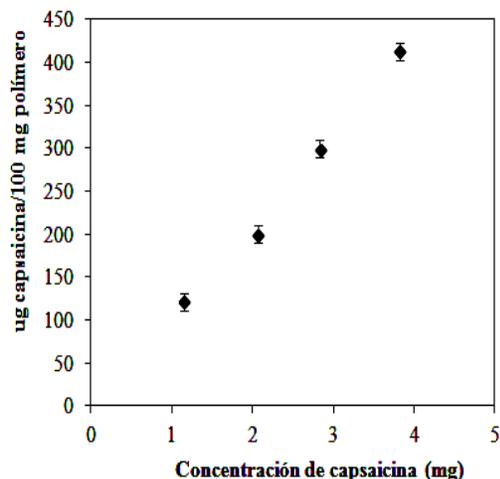
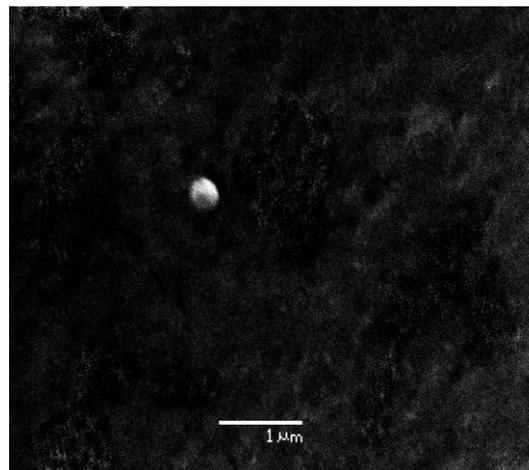


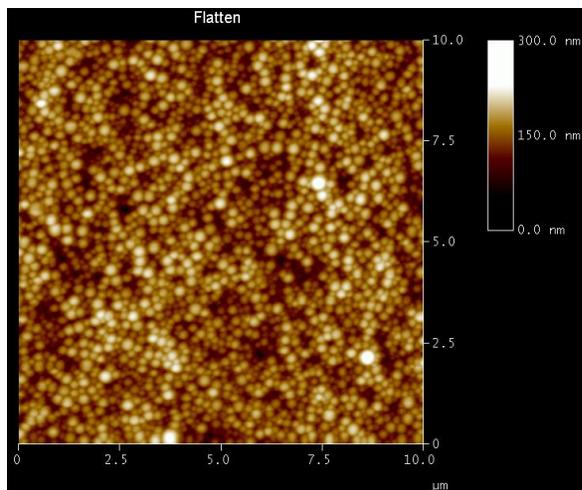
Figura N°4: Imagen NP de capsaicina por MEB



3.5) Microscopía de Fuerza Atómica:

El análisis por AFM arrojó que las nanopartículas elaboradas eran esféricas, y la población monodispersa (figura N°5). En las partículas se observó una superficie lisa y no se evidenciaron estructuras cristalinas, debido a la ausencia de principio activo fuera de las partículas. Lo anterior sugiere una dispersión molecular en la matriz nanoparticular. Se observó un tamaño entre los 150 y 300 nm, tamaño que concuerda con el arrojado por SEM.

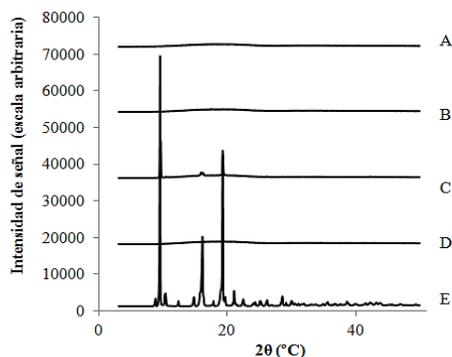
Figura N°5: NP de capsaicina por AFM.



3.6) Difracción de Rayos X:

Se evaluó la interacción p.a/polímero, para demostrar si capsaicina se encuentra al estado cristalino en las nanopartículas o bien, existe un grado de interacción. Para ello, se efectuó una comparación entre el difractograma de las NP cargadas, blancas y de los componentes de las partículas. La figura N°6 muestra los patrones de difracción de las muestras al estado sólido. Los picos en los patrones de difracción de capsaicina indicaron la naturaleza cristalina del fármaco, mientras que el polímero y las NP blancas fueron amorfos, por la ausencia de picos de difracción. Los picos característicos de la capsaicina desaparecieron al estar encapsulada en las nanopartículas lo que sugiere la dispersión al estado molecular del p.a dentro de las mismas.

Figura 6: Patrones de difracción de rayos X de NP blancas (A), polímero puro (B), Mezcla física capsaicina/polímero (C), NP cargadas (D) y capsaicina pura (E).



3.7) Caracterización de la formulación óptima de NP:

Dados los resultados se obtuvo una suspensión óptima de NP en cuanto a carga, con una de masa inicial de 4 mg de capsaicina, polímero PLA, acetona:acetato de etilo como solvente orgánico y 5 minutos como tiempo de sonicación. El aumento del tiempo de sonicación produce una mayor alteración de la emulsión y en consecuencia una tendencia a la disminución del tamaño de partícula (Leong *et al.* 2009). El diámetro medio de las nanopartículas fue de 249 ± 42 nm. El potencial Z de las nanopartículas fue $-7,45$ mV. El signo negativo concuerda con lo encontrado en literatura para nanopartículas elaboradas con PLA, atribuyéndose a la presencia de un grupo carboxilo terminal del polímero y al agente emulgente (Musumeci *et al.* 2006, Mainardes *et al.* 2010, Yin Win & Feng 2005).

3.8) Cinética de liberación *in vitro*:

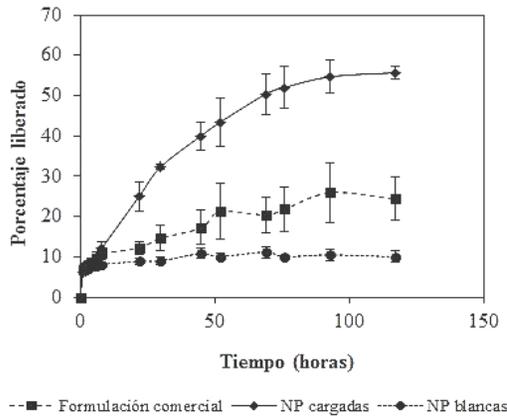
Se utilizó como medio receptor al buffer HEPES al ser considerado un buffer biológico, ampliamente utilizado en la mantención de niveles de pH en cultivos celulares y por ser adecuado para amortiguar soluciones en el rango de pH fisiológico de 7,2 a 7,6 (Agüero Luztonó *et al.* 2000, Chiappetta *et al.* 2006, Venkateswarlu & Manjunath 2004). Uno de los tensioactivos frecuentemente utilizados en estudios de solubilidad y liberación de fármacos es el Tween 80, por poseer propiedades solubilizantes en concentraciones desde 1-10%, otorgando buenos resultados en la solubilización de capsaicina (Kopeck *et al.* 2008, Leveque *et al.* 2004, Venkateswarlu & Manjunath 2004). Considerando lo anteriormente expuesto, se seleccionó al buffer HEPES + Tween® 80 al 1% como medio receptor, arrojando una concentración de saturación de $64,02 \mu\text{g/mL}$.

La figura N° 7 muestra el porcentaje liberado del principio activo a lo largo del tiempo. Fue posible observar que después de 117 h de experimento, el porcentaje liberado de capsaicina en las distintas formulaciones fue de aproximadamente un 57% para las NPs cargadas en crema base de la formulación comercial, un 25% para la formulación comercial, y un 10% para las NPs blancas suspendidas en la formulación comercial. El análisis de varianza muestra una diferencia estadísticamente muy significativa entre las formulaciones estudiadas ($P < 0,01$). La prueba de Tukey señala que de estas, sólo la comparación entre la formulación de NP blancas en crema base vs formulación comercial no muestra una diferencia significativa.

Con los datos mostrados en el gráfico anterior, fue posible graficar la cantidad acumulada de capsaicina (en μg) por área de membrana en función del tiempo. Se observa en la figura N°8 la cinética de cesión de capsaicina en las distintas formulaciones. Se utilizó un análisis de regresión lineal en la parte recta de la curva (en el intervalo de tiempo de 22-76 hrs) para obtener información sobre el

flujo del p.a, esto se obtiene a través del valor de la pendiente (Shah et al. 1989).

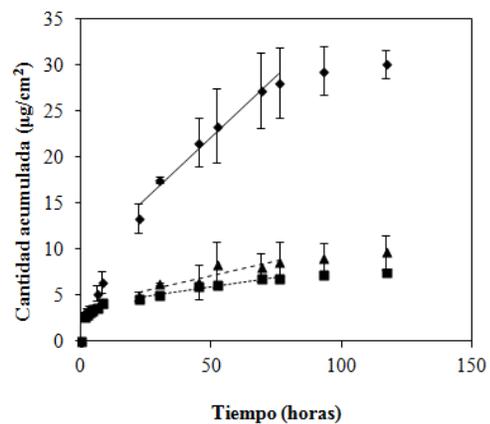
Figura N° 7: Perfil de liberación de capsaicina en distintas formulaciones semisólidas: formulación comercial, NP cargadas en crema base de la formulación comercial, NP blancas en la formulación comercial.



El flujo de capsaicina en los diferentes preparados farmacéuticos fue de 0,2646; 0,0634 y 0,0411 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ para las NPs cargadas en crema base, la formulación comercial, y NPs blancas en la formulación comercial, respectivamente. El análisis de varianza muestra una diferencia estadísticamente muy significativa entre las formulaciones estudiadas con un $P < 0,01$. La prueba de Tukey señala que de estas, sólo la comparación entre la formulación de NP blancas en crema base vs formulación comercial no muestra una diferencia significativa.

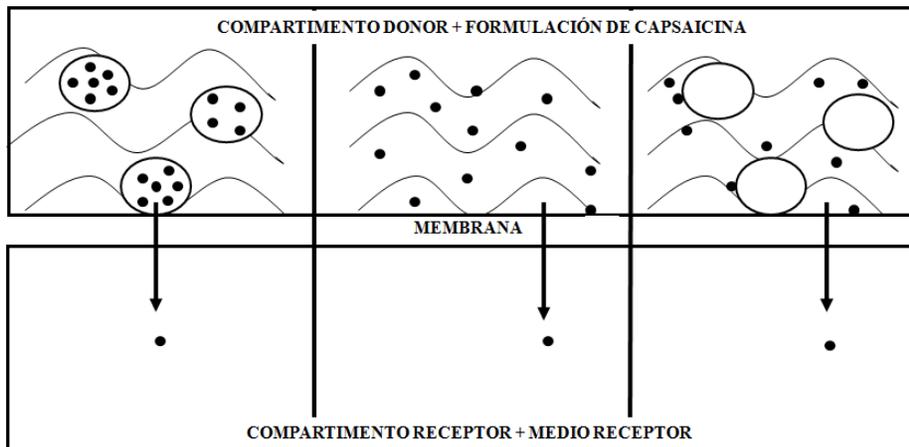
El p.a tiene que ser capaz de difundir pasivamente hacia el medio receptor, donde la sustancia se mueve de una región de un sistema a otro, siguiendo movimientos moleculares aleatorios (Aulton 2004). La figura N° 9 ilustra la cesión de capsaicina desde las distintas formulaciones empleadas.

Figura N° 8: Cinética de cesión de capsaicina en distintas formulaciones semisólidas: formulación comercial, NP cargadas en crema base de la formulación comercial, NP blancas en la formulación comercial.



◆ NP cargadas en crema base	$y = 0,2646x + 8,9018$ $R^2 = 0,9737$
■ NP blancas en formulación comercial	$y = 0,0411x + 3,8266$ $R^2 = 0,97$
▲ Formulación comercial	$y = 0,0634x + 3,9808$ $R^2 = 0,8488$

Figura N° 9: Esquema difusión de capsaicina a partir de diferentes formulaciones: NP cargadas en crema base de la formulación comercial (A), formulación comercial (B), NP blancas en la formulación comercial (C).



Si bien es cierto, se esperaba obtener un retardo de la liberación de capsaicina cuando el p.a se encontraba incorporado en un sistema nanoparticulado, se observó que esta formulación libera más rápido y una mayor cantidad de p.a en comparación con las otras dos formulaciones estudiadas. Se realizó un estudio de cesión del p.a con NP blancas, para ver si las NP por si solas modulan la liberación de capsaicina desde el preparado semisólido, pero no se presentaron diferencias en la liberación.

Las causas pueden atribuirse a que:

Al incorporar las NP cargadas a la crema base, se observó una disminución considerable de la viscosidad en la formulación final, presentando el p.a, una menor resistencia para difundir a través de la formulación, mayor facilidad para llegar a la membrana y, por ende, al medio receptor. La difusión del p.a desde la formulación puede ser el paso determinante de la velocidad de cesión, donde la viscosidad desempeña un papel importante en el control de la liberación de la droga hacia el medio receptor (Huang et al. 2008). La formulación comercial consta de una viscosidad superior que las formulaciones con NP incorporadas. Esta mayor viscosidad se refleja en una reducción de la movilidad molecular, pudiendo retardar la liberación de capsaicina, respecto al preparado que contiene NP cargadas.

4) CONCLUSIÓN

Se elaboraron nanopartículas terapéuticas biodegradables de capsaicina, se optimizaron los parámetros de proceso y de formulación, dentro de los cuales destacan: tipo de solvente orgánico, tiempo de sonicación, naturaleza del polímero, masa inicial de capsaicina. Donde se obtuvo, la máxima eficiencia de encapsulación y carga, como también un tamaño adecuado de nanopartículas.

Se emplearon estudios *in vitro* mediante celdas de difusión de Franz para estudiar la cinética de liberación de capsaicina a partir de distintas formulaciones semisólidas: NPs cargadas en la crema base de la formulación comercial, formulación comercial, y NPs blancas en la formulación comercial. Los resultados muestran una mayor liberación de p.a en la formulación que lo contiene nanoencapsulado, en comparación con las otras formulaciones semisólidas estudiadas. Las características observadas en este nuevo sistema, hacen necesaria la realización de estudios adicionales capaces de caracterizar el comportamiento de las NP de capsaicina en otras formulaciones, ya sean líquidas o semisólidas.

AGRADECIMIENTOS:

Laboratorio Pasteur S.A.

BIBLIOGRAFÍA:

- Agüero Luztonó, L., Zaldivar Silva, D. and Escobar Ivirico, J. L. (2000) Liberación de cefalexina a partir de hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido metacrílico). *Biomecánica*, 8, 58-62.
- Aulton, M. E. (2004) *Farmacia: La ciencia del diseño de las formulaciones farmacéuticas*. Churchill Livingstone.
- Budhian, A., Siegel, S. J. and Winey, K. I. (2007) Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 336, 367-375.
- Chiappetta, D. A., Apicella, C., Gentile, T., Dokmetjian, J. and Bregni, C. (2006) Vehiculización de proteínas en microesferas biodegradables. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25, 485-490.
- Flórez Beledo, J. (1997) *Farmacología humana*. Editorial Masson.
- Gad, S. C. (2008) *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. In: *Pharmaceutical Development Series*. Wiley-Interscience.
- Hernández Herrero, G., Moreno Gonzalez, A., Zaragoza Garcia, F. and Porras Chavarino, A. (2010) *Tratado de Medicina Farmacéutica* Editorial Médica Panamericana S.A.
- Huang, Y. B., Lin, Y. H., Lu, T. M., Wang, R. J., Tsai, Y. H. and Wu, P. C. (2008) Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 349, 206-211.
- Khan, A. A., Iadarola, M., Yang, H.-Y. T. and Dionne, R. A. (2007) Expression of COX-1 and COX-2 in a Clinical Model of Acute Inflammation. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 8, 349-354.
- Kopec, S. E., Irwin, R. S., DeBellis, R. J., Bohlke, M. B. and Maher, T. J. (2008) The effects of Tween-80 on the integrity of solutions of capsaicin: useful information for performing tussigenic challenges. *Cough*, 4, 3.
- Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C. (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Layre, A., Couvreur, P., Chacun, H., Richard, J., Passirani, C., Requier, D., Benoit, J. P. and Gref, R. (2006) Novel composite core-shell nanoparticles as busulfan carriers. *Journal of Controlled Release*, 111, 271-280.
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E. and Ashokkumar, M. (2009) Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 721-727.
- Leveque, N., Makki, S., Hadgraft, J. and Humbert, P. (2004) Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 269, 323-328.
- Mainardes, R. M., Khalil, N. M. and Gremião, M. P. D. (2010) Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 266-271.
- Manchanda, R., Fernandez-Fernandez, A., Nagesetti, A. and McGoron, A. J. (2010) Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 260-267.

- Musumeci, T., Ventura, C. A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R. and Puglisi, G. (2006) PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 172-179.
- Nimesh, S., Manchanda, R., Kumar, R., Saxena, A., Chaudhary, P., Yadav, V., Mozumdar, S. and Chandra, R. (2006) Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 323, 146-152.
- Oyagbemi, A., Saba, A. and Azeez, O. (2010) Capsaicin: A novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action, Vol. 1.
- Serra Catafau, J. (2007) *Tratado de dolor neuropático*. Ed Médica Panamericana
- Shah, V. P., Elkins, J., Lam, S.-Y. and Skelly, J. P. (1989) Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. *International Journal of Pharmaceutics*, 53, 53-59.
- Torchilin, V. P. (2006) *Nanoparticulates as Drug Carriers* World Scientific Publishing Company.
- Turgut, C., Newby, B.-m. and Cutright, T. (2004) Determination of optimal water solubility of capsaicin for its usage as a non-toxic antifoulant. *Environ Sci & Pollut Res*, 11, 7-10.
- Valderrama, J. (1998) Síntesis y caracterización de membranas porosas de poli(ácido láctico). Un polímero bioabsorbible. *CIT Información Tecnológica*, 9, 116.
- Vasir, J. K. and Labhasetwar, V. (2007) Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 718-728.
- Venkateswarlu, V. and Manjunath, K. (2004) Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 95, 627-638.
- Venter, J. P., Müller, D. G., du Plessis, J. and Goosen, C. (2001) A comparative study of an in situ adapted diffusion cell and an in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 169-177.
- Vidal, M. A., Calderón, E., Román, D., Pérez-Bustamante, F. and Torres, L. M. (2004) Capsaicina tópica en el tratamiento del dolor neuropático. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 11, 306-318.
- Walters, K. A. (2002) *Dermatological and Transdermal Formulations*. In: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. CRC Press.
- Wischke, C. and Schwendeman, S. P. (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 298-327.
- Yin Win, K. and Feng, S.-S. (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26, 2713-2722.

ABSTRACT

Encapsulation of capsaicin was optimized within biodegradable polymeric nanoparticles and their release was evaluated from a semisolid dosage form containing the particles, using Franz diffusion cells. To meet this objective, the nanoparticles were prepared by the emulsion-solvent evaporation method. The influence of various parameters affecting the encapsulation of the active ingredient was investigated, such as the type of organic solvent used, the sonication time applied, the nature of the polymer, the initial mass of capsaicin and the nanoparticles production method. Later, using the selected formulation, the drug release was evaluated in vitro and was compared against the release from a commercial formulation. The highest loading and encapsulation efficiency of the drug (400 µg% and 70.2%, respectively) were obtained using 100 mg of PLA polymer, in a mixture of dichloromethane-acetone (1:1 v/v), with a sonication time of 5 minutes and 4 mg of capsaicin as initial mass. The obtained particles were monodisperse, it had a mean diameter of 249 ± 42 nm, with a polydispersity index of 0.06. The zeta potential was -7.45 mV. Finally, the in vitro release studies from different semisolid formulations of capsaicin showed a capsaicin flux and a release percentage of: $0.2646 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ and 57% for the loaded nanoparticles incorporated in a commercial base cream formulation; $0.0634 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ and 25% for free capsaicin (commercial formulation); $0.0411 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ and 10% for unloaded nanoparticles incorporated in the commercial formulation, respectively.

Keywords: Capsaicin, Nanoparticles, in vitro release, Franz diffusion cells.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 41-49

Received 01-04-2014; Revised 01-05-2014; Accepted 10-05-2014

ARTÍCULO ORIGINAL

EL DICLOROACETATO: MEDICAMENTO HUÉRFANO CON UN POSIBLE USO EN ONCOLOGÍA
(Dichloroacetate: Orphan drug with a possible use in oncology)

Niyireth Novoa Santander¹, David Esteban Rebellón Sánchez¹ y Bibiana Matilde Bernal Gómez²

¹ Estudiantes de medicina del Semillero de Investigación GIBP. ² MD. PH.D. Grupo de investigación Biomédica y de Patología, Escuela de Medicina Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

RESUMEN

El dicloroacetato sódico (DCA) es un medicamento huérfano usado en países industrializados para ensayos experimentales y en el tratamiento de la acidosis láctica desde 1962. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) con lo que favorece la reactivación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), disminuyendo los niveles de lactato al interferir en el metabolismo anaerobio. La comprensión actual de la transformación de las células del cáncer ha permitido aclarar el papel del DCA en la inhibición del crecimiento tumoral, lo cual ha sido observado empíricamente, pero persiste la controversia para usarlo en tratamientos oncológicos, pues algunos estudios lo confunden con un metabolito similar que es carcinogénico.

Palabras Claves: Dicloroacetato (DCA), Acidosis láctica, Cáncer, PDK, fenotipo glucolítico, Efecto Warburg, medicamento huérfano.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 50-56

Recivido 18-03-2014; Revisado 22-04-2014; Aceptado 11-05-2014

1) INTRODUCCIÓN

El dicloroacetato sódico (DCA) es un medicamento utilizado desde 1962 en países industrializados para el tratamiento de patologías raras que cursan con un aumento en las concentraciones de lactato y en diseños experimentales con animales, aunque debido a la baja prevalencia de dichas enfermedades y al ser de síntesis genérica, es producido y comercializado mínimamente y por lo tanto, considerado como medicamento huérfano (Whitehouse *et al*, 1973 y Fox *et al*, 2001).

Aunque persiste una controversia sobre su uso, algunas publicaciones muy recientes resaltan su potencial como quimioterapia antineoplásica con base en resultados experimentales favorables obtenidos en cultivos celulares (Indran *et al*, 2011).

Esta revisión sistemática ha estado motivada por la ausencia de información en español en las bases bibliográficas de consulta y se utilizará la abreviatura DCA para hacer referencia al Dicloroacetato sódico (IUPAC). En ningún momento pretende ser una guía de manejo clínico u oncológico, ni está relacionado con intereses lucrativos.

Para la selección de los artículos de revisión se tuvo en cuenta las recomendaciones y criterios de la plataforma Cochrane sobre metaanálisis, y para abordar con una perspectiva más amplia el contenido, se incluyeron también algunos artículos de revisión.

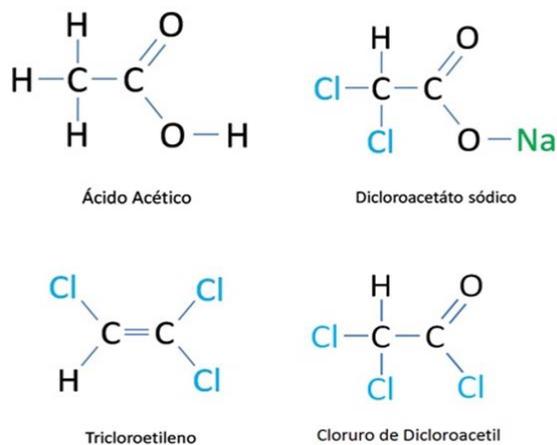
2) PROPIEDADES QUÍMICAS:

El DCA es un análogo del ácido acético al cuál se le han sustituido dos átomos de hidrógeno del grupo metilo por dos átomos de cloro (Singh, 2008) (figura 1). En algunos estudios se le identifica como un contaminante ambiental promotor de la carcinogénesis, en otros se presenta su posible acción contra el cáncer, la acidosis láctica y algunas enfermedades raras (Michelakis *et al*, 2008). Se obtiene a partir del ácido dicloroacético con lo que en teoría podría tener acciones similares a este compuesto aunque se ha mostrado una ausencia total de efectos mutagénicos genotóxicos en cultivos celulares (Fox *et al*, 1996), en contraposición a la evidencia existente sobre el ácido dicloroacético, el cual es un producto de la cloración de las aguas que muestra una asociación con cáncer en estudios realizados con ratones (Thai *et al*, 2003).

Correspondencia a: Dra. Bibiana Matilde Bernal Gómez, Profesora Asistente-Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Correo Electrónico: bibiana.bernal@uptc.edu.co; emperipolesis@gmail.com

Algunos estudios afirman que el DCA es un derivado del Tricloroetileno (TCE) y que tiene propiedades carcinogénicas (Schmidt *et al*, 2011), sin embargo, ensayos sobre la degradación del TCE por fotocatalisis describen que el metabolito generado es el cloruro de dicloroacetil (DCAC) (Hsing-Hung, 2007) o el ácido dicloroacético, químicos diferentes que tienen un reactivo más en su estructura química (figura 1).

Figura N° 1: Diferencias en la estructura química del Ácido acético, el DCA (Dicloroacetato sódico), TCE (Tricloroetileno) y DCAC (Cloruro de Dicloroacetil).



La controversia al confundirlo con los metabolitos del TCE se debe a que este es un contaminante de las aguas subterráneas que actúa como disolvente orgánico e industrial; la degradación del mismo a través de un proceso fotocatalítico natural deriva en la síntesis de ácido tricloroacético (TCA), DCAC, ácido dicloroacético (mal llamado dicloroacetato en algunos estudios) y otros metabolitos; los cuales están asociados a hepatomegalia de causa desconocida (Chiu, 2011) y cáncer hepático en modelos experimentales con ratones (Bull *et al*, 2012).

El DCAC y el ácido dicloroacético afectan el metabolismo del glutatión, un antioxidante que ayuda a proteger a las células de especies reactivas de oxígeno y aumenta el número de especies reactivas de oxígeno perjudiciales para el ADN. Su uso muestra una alteración de los niveles séricos de insulina y el metabolismo del glucógeno, y su acumulación intracelular (Lingohr, 2002) produce inhibición de la apoptosis normal de los hepatocitos del ratón por alteraciones en el codón 61 de H-ras visibles con el uso de anticuerpos tipo C-Jun.

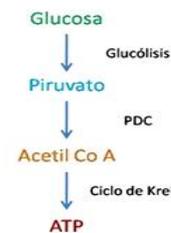
Así mismo, el aumento de los niveles séricos de TCE en el ser humano se ha visto asociado con toxicidad para el riñón, el hígado, los sistemas nervioso, inmunológico, reproductivo, respiratorio y asociado a carcinoma de

células renales, adenocarcinoma esofágico y linfoma no Hodking.

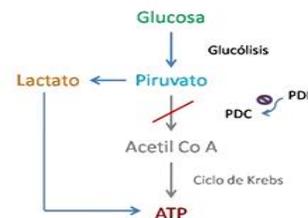
En cambio se ha observado que el DCA sódico es un compuesto capaz de inhibir la acción de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), enzima cuya función es mantener inactiva a la piruvato deshidrogenasa (PDH), primera enzima catalítica del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) (figura 2). Al activar al PDC interviene en el tratamiento de enfermedades en las que hay una afección de la regulación de la PDK, ya que el PDC está íntimamente relacionado con la fosforilación oxidativa, proceso fundamental para la obtención de ATP (Berendzen, 2006).

Figura N° 2: El metabolismo celular normal provee ATP a partir de piruvato y glucosa mediante la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). En el "fenotipo glucolítico" la acción del PDC se encuentra inhibida por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) lo cual induce la producción de ATP a partir de lactato y altera el metabolismo celular normal. El dicloroacetato sódico (DCA) actúa inhibiendo la acción de la PDK restaurando el metabolismo celular normal.

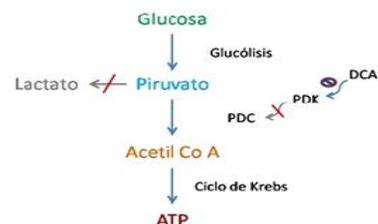
METABOLISMO CELULAR NORMAL



METABOLISMO CELULAR ALTERADO



MECANISMO DE ACCIÓN DEL DCA



En condiciones de ausencia o desregulación del PDC se pueden formar microambientes con condiciones que facilitan el desarrollo de estados patológicos como acidosis láctica, cáncer, hipertrofia ventricular, entre otros.

El DCA actúa en la PDK provocando una pérdida de su función sobre la PDH y por lo tanto reactivando el PDC. Hasta la fecha se han identificado cuatro isoformas de PDKs en mamíferos (PDK-1, PDK-2, PDK-3, PDK-4); la evidencia científica sugiere diferentes grados de sensibilidad de las diferentes isoformas por el DCA, observándose una sensibilidad aumentada de la PDK-2 (isoenzima que se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos), una menor sensibilidad de la PDK-4, muy poca sensibilidad de la PDK-3 y siendo prácticamente inespecífico por la PDK-1 (Mann *et al*, 2000).

El mecanismo de acción del DCA se puede resumir en la activación del PDC favoreciendo la transformación de piruvato en Acetil CoA y promoviendo así el ciclo de Krebs, lo que conlleva un aumento en el consumo total del oxígeno en la mitocondria y una disminución en las concentraciones de lactato (Li, 2009).

3) MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda en noviembre y diciembre de 2013, en pubmed, science direct, y medline con las palabras clave en inglés DCA y cáncer, encontrándose 407 publicaciones, se redefinió la búsqueda con la palabra dichloroacetate y cancer encontrándose 131 estudios, se seleccionaron y eliminaron de la búsqueda las comunicaciones cortas y las cartas al editor para tener un total de 108 estudios, que se distribuyeron en tres grupos: ensayos clínicos, diseños experimentales y de revisión. Se revisó la información concerniente a las propiedades químicas del dicloroacetato, la controversia sobre su uso en cáncer, su mecanismo de acción, el posible potencial terapéutico y sus efectos adversos, de 75 estudios y se organizó una tabla con los ocho estudios experimentales con intervalo de confianza mayor al 95% y p menores a 0.05.

4) RESULTADOS

Sobre su farmacología se encontró que puede ser administrado tanto por vías parenteral y oral, siendo utilizada predominantemente la vía oral. Se absorbe de manera rápida y un 20% del fármaco se une a las proteínas plasmáticas, con un aumento de la unión a estas si su administración es continua. El metabolismo del fármaco tiene dos rutas, una es la reducción a monocloroacetato (MCA) y la otra es la oxidación a glioxilato. La excreción es

renal, pudiéndose identificar en orina del 1 al 2% de la dosis inicial (Stacpoole, 1998)ⁱ.

Se utiliza en acidosis láctica congénita la cual produce un deterioro progresivo neuromuscular, acompañado de la acumulación de iones hidrógeno y de lactato en sangre, orina y/o líquido cefalorraquídeo, que producen la muerte temprana del lactante (Naito *et al*, 1998)ⁱⁱ. Es una enfermedad ocasionada por varios errores enzimáticos específicamente a nivel de la PDK o en la subunidad E1 α del PDC, en ambos casos el PDC es disfuncional y por lo tanto hay un incremento en la producción de lactato por lo que el uso de DCA hace reactivar el complejo e inducir el metabolismo celular normal del piruvato.

El estudio de Abdelmalak *et al*.ⁱⁱⁱ concluye que el uso del DCA en esta patología, es bien tolerado y muy efectivo para el control de los niveles de lactato en sangre, incluso en niños con déficit de PDC que consumen dietas libres en carbohidratos y los efectos adversos, por ejemplo de tipo neurológico, son muy raros. Stacpoole *et al*.^{iv} encontraron una fuerte asociación entre la administración del medicamento y la disminución en los niveles de lactato. A pesar de la evidencia sustentada y a pesar de considerarse un medicamento huérfano, tanto por su escasa producción farmacéutica como porque su uso es para enfermedades que tienen una prevalencia de menos de 5 casos en 10000 habitantes, lo que lo convierte en un fármaco prácticamente inexistente en el mercado, es necesario antes de cualquier uso, el consenso por expertos y personal de salud para su aplicación en acidosis láctica y en cáncer.

La administración prolongada del medicamento se encuentra asociada con un incremento en los niveles de delta-aminolevulinato (Delta ALA), una molécula que actúa bloqueando la formación periférica de mielina y que puede provocar la neuropatía, estudios in vitro sugieren que dicha desmielinización puede ser reversible (Felitsyn, 2007)^v. Sin embargo, en algunos casos puede que los efectos adversos ni siquiera aparezcan como consecuencia directa de la acción del medicamento sino que se desarrollan por acción de sus metabolitos, tal es el caso del MCA un metabolito que inhibe el ciclo de Krebs de los astrocitos y puede llevar a la apoptosis de los mismos (Schmidt, 2011)^{vi}.

En la tabla 1 se resumen los principales efectos benéficos del medicamento demostrados en estudios In vitro en células y en uno realizado con animales, sin embargo se debe aclarar que estos no son los únicos ensayos que se han realizado, otros estudios y reportes de caso fueron excluidos durante la elaboración de esta revisión por la ausencia de medidas de asociación que sustenten de manera confiable su efectividad.

Tabla N° 1: Efectos favorables del DCA sobre cultivos de células tumorales de diferentes enfermedades y en un estudio en animales.

PATOLOGÍA	EFFECTOS DEL DCA	Valor de P	REFERENCIA
Linfoma de células T	Inducción de la apoptosis Inhibición en la expresión de HIF1a. Cambios en la expresión de moléculas que participan en la regulación de la supervivencia de las células del cáncer: (PUMA, GLUT1, Bcl2, p53, CAD y la caspasa-3).	<0,05	(27)
Carcinoma cervical	Disminución del volumen y peso del tumor	≤ 0,05	(30)
Cáncer colorrectal	Disminución en la división celular (anti proliferativo)	≤ 0,009	(31)
Cáncer mamario (Células MAT)	Disminución en la división celular (anti proliferativo) Reducción de metástasis pulmonar Aumento en los niveles de ATP Disminución en la concentración de lactato	= 0,0009 = 0,0001 = 0,009 = 0,01	(32)
Artritis reumatoide (CIA en ratones hembras)	Inicio lento de la CIA. Severidad más leve. Frecuencia de aparición mucho más baja. Disminución de la destrucción del cartílago y articulaciones Mayor contenido mineral del hueso cortical Reducción de los niveles de anticuerpos anti-CII	< 0,0001 = 0,005 = 0,001 = 0,04	(33)
Esclerosis lateral amiotrófica ELA	Mejoría de la función mitocondrial en la médula espinal Recuperación de la unión neuromuscular Disminuyó la reactividad de los astrocitos con SOD1G93A y evitó la pérdida de las neuronas motoras	<0,05 <0,05 <0,05	(34)
Hipertensión pulmonar HTP	Descenso en la resistencia vascular pulmonar Disminución en el espesor de la arteria pulmonar Descenso de la Hipertrofia ventricular derecha	< 0,002 < 0,001 < 0,001	(35)
C6 Glioma	Disminución en la división celular (anti proliferativo) Inhibe la expresión de proteínas de choque térmico 70 (HSP70)	< 0,01 < 0,01	(36)

La comprensión del fenotipo glucolítico de las células del cáncer, procedente de la tesis de 1926 de Otto Warburg (Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper) y la comprensión del mecanismo de acción del DCA, dan un indicio acerca del potencial terapéutico de este medicamento en el tratamiento del cáncer.

5) DISCUSIÓN

El uso del DCA para el tratamiento del cáncer aún se encuentra en investigación, sin embargo en países industrializados este medicamento se utiliza desde hace varios años para el tratamiento de algunos desordenes cardiovasculares y metabólicos, especialmente en la acidosis láctica congénita o adquirida.

En su artículo de 1956 "On respiratory impairment in cancer cells" (Science; 124: 269-270), Warburg, comparó

los mecanismos de producción de energía de células de tumores sólidos con los de tejidos normales. Encontró que en los tejidos tumorales la energía procedente de la fosforilación oxidativa es menor al 50%, denominándose su hallazgo "el efecto de Warburg", un fenómeno en el cual se incrementa la tasa de captación de la glucosa y se reprime la fosforilación oxidativa en las células tumorales independientemente de las concentraciones de oxígeno intracelular. Se ha sugerido la formación de microambientes hipóxicos en las primeras fases de la evolución tumoral que llevan al desarrollo de un "fenotipo glucolítico", esta condición, hace referencia a una disfunción mitocondrial en la cual se inhibe la vía del piruvato por diferentes isoformas de la PDK. El mecanismo de acción de dicha enzima es fosforilar el aminoácido Ser293 de la subunidad E1 de la PDH, inhibiendo así su función catalítica y como consecuencia inactivando el PDC; en estas condiciones el piruvato es catabolizado a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Wu, 2013). Se puede inferir entonces que el fenotipo glucolítico conlleva a una

inhibición de la fosforilación oxidativa por acción de la PDK, y por lo tanto al desarrollo del efecto Warburg que facilita el crecimiento tumoral en presencia de ácido láctico. Igualmente, la PDK actúa como reguladora de dos moléculas íntimamente relacionadas con los procesos de oncogénesis: la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) y el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) (Finlay *et al*, 2012).

La desregulación en la expresión de estas moléculas puede provocar que se aumente la síntesis de receptores de glucosa tipo GLUT en las células tumorales, favoreciendo la captación de glucosa y la glucólisis (Denko, 2008). Como consecuencia de la acción del HIF-1 α se producirá la activación de oncogenes como AKT, Myc o Bcl-2 así como con el incremento de la expresión de factores de transcripción necesarios para la oncogénesis, más frecuentemente el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el desarrollo de microambientes proinflamatorios, condiciones relacionadas con la progresión tumoral (Hiller, 2013).

El aumento en la expresión del HIF-1 α favorece el incremento de algunos tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS) que actúan como tóxicos celulares al provocar lesiones en el ADN mitocondrial y nuclear deteriorando aún más la función de la cadena respiratoria mitocondrial y mitigando las funciones protectoras de genes como el p53 o el gen de la ASK1 (quinasa de señalización de la apoptosis).

El incremento en el consumo de oxígeno por parte de las células tumorales va a promover un agotamiento del mismo en el tejido neoplásico, esta situación desencadenará una hipoxia severa que no puede ser compensada como consecuencia de la acción inhibitoria del DCA sobre la PDK, haciendo que el tejido neoplásico muera por isquemia (Yijun, 2009).

Los principales efectos moleculares del DCA serían una disminución del HIF-1 α y de Bcl-2 en las células neoplásicas, seguida del aumento en la expresión de PUMA (p-53 upregulated modulator of apoptosis), p-53, caspasas (especialmente caspasa 3) y consecuentemente un incremento en las concentraciones tisulares de CAD (DNAsa activada por caspasas) y como consecuencia de la disminución e incremento en la expresión del HIF-1 α y del p-53, una modulación negativa para la transcripción de receptores de glucosa tipo GLUT (Especialmente GLUT1), haciendo que la captación de glucosa en las células tumorales disminuya (Kumar, 2012).

Otro de los efectos moleculares del DCA en las células tumorales es el incremento en la generación de ROS respetando las células sanas (Anderson, 2009). Las ROS de

señalización permitirán la entrada del NADH generado en el ciclo de Krebs al complejo I de la cadena respiratoria, reactivando la PDH y favoreciendo la "remodelación" del metabolismo mitocondrial. Toda esta "cascada" facilita la apertura del poro de transición mitocondrial el cual permitirá la liberación al espacio citoplasmático de mediadores pro-apoptóticos tales como citocromo c (Cyt c) y el factor inductor de apoptosis (AIF) (Ayyanathan, 2012).

Existe poca evidencia sobre la toxicidad del DCA en humanos, sin embargo, los efectos adversos se limitan principalmente al hígado y al sistema nervioso. En algunos pacientes diabéticos o con acidosis láctica tratados con el medicamento se ha observado un efecto ansiolítico, sin embargo, esta situación es impredecible y rara. También se ha identificado un incremento de las transaminasas en pacientes pediátricos tratados con DCA por periodos prolongados. Se ha presentado polineuropatía por tratamientos largos con DCA, usualmente con dosis mayores de 6,25 mg/kg y en periodos mayores a tres meses (61,62), y encefalopatía, a dosis terapéuticas establecidas normalmente (25 mg/kg/día).

En cáncer de cérvix (Liu, 2012), colon (Madhok, 2010) y mama (Sun *et al* 2010), el DCA ha mostrado efectividad en fases experimentales, así como en algunos modelos experimentales de cáncer de células no pequeñas de pulmón, asociándolo a Cisplatino.

Puede además favorecer la redistribución en linfocitos alorreactivos, y existe una aparente asociación entre la administración del DCA con un aumento en la diferenciación de linfocitos T reguladores (Bian *et al*, 2009 y Eleftheriadis *et al*, 2013). Esta relación, observada también en algunos pacientes con Esclerosis lateral amiotrófica (Miquel *et al*, 2012) podría resultar en una disminución de la inmunovigilancia en los pacientes medicados con DCA y al mismo tiempo podría sugerir la utilización del medicamento como inmunosupresor en el campo de los trasplantes y patologías autoinmunes, así como herramienta coadyuvante en la quimioterapia antineoplásica (Rhodes, 2009. Duan *et al*, 2013. Eleftheriadis *et al*, 2013. Garon *et al*, 2014).

6) CONCLUSIONES

El potencial terapéutico del DCA con base en el efecto Warburg (Warburg, 1956), parece tener un futuro prometedor, sin embargo, se hace fundamental la realización de estudios originales que midan su eficacia, efectividad y eficiencia, acompañado del desarrollo de metaanálisis que comparen las propiedades terapéuticas del fármaco con las de otros tratamientos de elección en las diferentes patologías que cursan con una alteración en la función normal del complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial.

7) CONFLICTO DE INTERESES

No se presentó ningún conflicto de intereses. Los autores agradecen la aclaración de los compuestos químicos al Profesor Fabio Mayorga. B.M.B.G. agradece a Colciencias Uptc Laspau por el apoyo financiero. El DCA sódico se encuentra en la lista de medicamentos huérfanos en <http://www.ub.edu/legmh/listados/huerfanos.pdf>

BIBLIOGRAFÍA:

- Abdelmalak, M. Lew, A. Ramezani, R. et al. (2013) Long - term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Molecular genetics and metabolism*; 109:139-143.
- Anderson, K.M. Jajeh, J. Guinan, P. Rubenstein M. (2009) In vitro effects of dichloroacetate and CO₂ on hypoxic HeLa cells. *Anticancer Research*. Noviembre; 29 (11): 4579-4588
- Ayyanathan, K. Kesaraju, S. Dawson-Scully, K. Weissbach, H. (2012) Combination of Sulindac and Dichloroacetate Kills Cancer Cells via Oxidative Damage. *PLoS ONE*. Julio; 7 (7): 1-12
- Berendzen, K. Theriaque, D. Shuster, J. Stacpoole, P. (2006) Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Mitochondrion*. Junio; 6(3): 126-135
- Bian, L. Josefsson, E. Jonsson, I. et. al. (2009) Dichloroacetate alleviates development of collagen II-induced arthritis in female DBA/1 mice. *Arthritis Research & Therapy*. 11(5):1-10
- Bull, R. Orner, G. Cheng, R. et al. (2012) Contribution of Dichloroacetate and Trichloroacetate to Liver Tumor Induction in Mice by Trichloroethylene. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Julio; 182(1), 55-65
- Chiu W. (2011) Trichloroacetic acid: Updated estimates of its bioavailability and its contribution to trichloroethylene-induced mouse hepatomegaly. *Toxicology*. Julio; 285(3): 114-125
- Denko N. (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews in Cancer*. Septiembre; 8(9): 705-713.
- Duan, Y. Zhao, X. Ren, W. et al. (2013) Antitumor activity of Dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. *OncoTargets and Therapy*. Marzo; 6:189-198
- Eleftheriadis, T. Pissas, T. Karioti, A. et al. (2013) Dichloroacetate at therapeutic concentration alters glucose metabolism and induces regulatory T-cell differentiation in alloreactive human lymphocytes. *Journal of Clinical and Basic Physiologic Pharmacol*. abril; 13:1-6
- Felitsyn, N. Stacpoole, P. Notterpek, L. (2007) Dichloroacetate causes reversible demyelination in vitro: potential mechanism for its neuropathic effect. *Journal of Neurochemistry*. Enero; 100 (2):429-36
- Finlay, D. Rosenzweig, E. Sinclair, L. et al. (2012) PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *Journal European M*. Noviembre; 209 (13): 2441-2453.
- Fox, A. Turkel, C. Buffini, J. (2001) Nutritional lactate spikes: quantitative antagonism by dichloroacetate. *Nutrition Research*. Septiembre; 21 (9):1235-1249
- Fox, A. Yang, X. Murli. H. Lawor, T. Cifone, M. Reno, F. (1996) Absence of Mutagenic Effects of Sodium Dichloroacetate. *Fundamental & Applied Toxicology*., Julio; 32(1): 87-95
- Garon, EB. Christofk, HR. Hosmer, W. et al. (2014) Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *Journal Cancer Res Clin Oncol*. Marzo;140(3):443-52.
- Hiller, K. Metallo, C. (2013) Profiling metabolic networks to study cancer metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. Febrero; 24(1): 60-68
- Hsin-Hung, O. Shang-Lien, L. (2007) Photocatalysis of gaseous trichloroethylene (TCE) over TiO₂: The effect of oxygen and relative humidity on the generation of dichloroacetyl chloride (DCAC) and phosgene. *Journal of Hazardous Materials*. Julio;146(1-2):302-308
- Indran, I. Tufo, G. Pervaiz, S. Brenner, C. (2011) Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Junio; 1807(6):735-745
- Kumar, A. Kant, S. Mahendra, S. (2012) Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation. *Chemico-Biological Interactions*. Julio;199 (1): 29-37
- Li, J. Chuang, D.T. Kato, M. (2009) Pivotal role of the C-terminal DW-motif in mediating inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by dichloroacetate. *The Journal of Biological Chemistry*. Diciembre; 284(49):34458-34467
- Lingohr, M. Bull, R. Kato-Weinstein, J. Thrall, B. (2002) Dichloroacetate Stimulates Glycogen Accumulation in Primary Hepatocytes through an Insulin-Independent Mechanism. *Toxicological Sciences*. Agosto; 68(2): 508-515.
- Liu, D. Liu, S. Jing, X. Li, X. Li, W. Huang, Y. (2012) Necrosis of cervical carcinoma by dichloroacetate released from electrospun polylactide mats. *Biomaterials*. Junio; 33 (17): 4362- 4369
- Madhok, B. Yeluri, S. Perry, S. Hughes, T. Jayne, D. (2010) Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*; 102 (12): 1746-1752
- Mann, W. Dragland, C. Vinluan, C. et al. (2000) Diverse mechanisms of inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase by structurally distinct inhibitors. *BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Julio; 1480 (1-2): 283-292
- Michelakis, E.D. Webster, L. Mackey, J.R. (2008) Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer*. 99 (7):989-994.
- Miquel, E. Cassina, A. Martínez, L. Bolatto, C. Trias, E. Gandelman, M. et al. (2012) Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis: e34776. *PLoS One*. Abril; 7 (4)

- Naito, E. Ito, M. Yokota, I. et al. (1998) Thiamine-responsive lactic acidemia: role of pyruvate dehydrogenase complex. *European Journal of Pediatrics*; 157: 648-652
- Rhodes, C. Davidson, A. Gibbs, S. Wharton, J. Wilkins, M. (2009) Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & Therapeutics. Enero*; 121 (1): 69-88
- Schmidt, M. Rohwedder, A. Dringen, R. (2011) Effects of chlorinated acetates on the glutathione metabolism and on glycolysis of cultured astrocytes. *Neurotoxicity Research. Mayo*;19(4):628-637
- Schmidt, M. Rohwedder, A. Dringen, R. (2011) Effects of Chlorinated Acetates on the Glutathione Metabolism and on Glycolysis of Cultured Astrocytes. *Neurotoxicity Research Julio*; 19:628-637
- Singh, Y. Singh, R. (2008) Theoretical studies of different tautomers of anti-cancer drug: dichloroacetate. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. Octubre*; 21(4):390-395.
- Stacpoole, P. Henderson, G. Yan, Z. James, M. (1998) Clinical Pharmacology and Toxicology of Dichloroacetate. *Environmental Health Perspectives. Agosto*; 106 (4): 989-994
- Stacpoole, P. Kerr, D. Barnes, C. (2006) Controlled Clinical Trial of Dichloroacetate for Treatment of Congenital Lactic Acidosis in Children. *Pediatrics. Mayo*; 117: 1519-1531
- Sun, R. Fadia, M. Dahlstrom, J. et. al. (2010) Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research Treatments. 120 (1)*: 253-260
- Thai, S. Allen, J. De Angelo, A. et al. (2003) Altered gene expression in mouse livers after dichloroacetic acid exposure. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research. Marzo*; 543(2): 167-180
- Warburg, Otto. (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science 124*: 269-270.
- Whitehouse, S. Randle, P.J. (1973) Activation of Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Rat Heart by Dichloroacetate. *Biochemistry. J. 134*, 651-653
- Wu, C. Chao, Y. Shiah, S. Lin, W. (2013) Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. Mayo*; 1833(5): 1147-1156
- Yijun, C. Cairns, R. Papandreou, I. Koong, A. Denko, N. (2009) Oxygen Consumption Can Regulate the Growth of Tumors, a New Perspective on the Warburg Effect. *Plos ONE. Septiembre*; 4(9): 1-9.

ABSTRACT

Sodium dichloroacetate (DCA) is an orphan drug used since 1962 in industrialized countries for experimental assays and for the treatment of lactic acidosis. The mechanism of action is the enzymatic inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) favoring the reactivation of pyruvate dehydrogenase complex (PDC) and decreasing levels of lactate. The understanding of the cancer cells transforming has allowed elucidating the role of the DCA in the inhibition of tumor growth, however, currently a controversy exists on its role in cancer because several studies identify it as a carcinogenic drug.

Keywords: *Dichloroacetate (DCA), Lactic Acidosis, Cancer, PDK, glycolytic phenotype, Warburg Effect, orphan drug.*

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 50-56

Received 18-03-2014; Revised 22-04-2014; Accepted 11-05-2014

ARTÍCULO DE REVISIÓN

FARMACOLOGÍA CLÍNICA Y SEGURIDAD DE LOS MEDIOS DE CONTRASTE YODADOS
(Clinical Pharmacology and Safety of Iodinated Contrast Media)

Juan C. Prieto-Rayó¹ y Cristian Varela²

¹ Médico Cirujano Universidad de Chile. ² Profesor Asistente, Facultad de Medicina Universidad de los Andes, Departamento de Imagenología Clínica Dávila

RESUMEN

El creciente uso de medios de contraste yodados en procedimientos radiológicos diagnósticos y terapéuticos, los posiciona como agentes indispensables en la práctica actual de la medicina. Estos agentes han sufrido significativos avances en cuanto a su seguridad y tolerancia, mas el riesgo asociado a su empleo no ha podido ser eliminado del todo. Existen cuatro tipos de medio de contraste yodado: monómero iónico, monómero no iónico, dímero iónico y dímero no iónico, cada uno con diferentes características físico-químicas y perfiles de seguridad. Las principales reacciones adversas de estos agentes son las reacciones tipo alérgicas y la injuria renal aguda inducida por contraste. El objetivo del presente trabajo es conocer en detalle las características farmacológicas y los principales efectos adversos de los medios de contraste yodados. Además se presenta la evidencia existente sobre la fisiopatología, prevención y tratamiento de sus principales efectos adversos. Finalmente se concluye que estos agentes son seguros y que el mejor tratamiento de las reacciones adversas es la prevención. La identificación de los pacientes de riesgo es fundamental, ya que en ellos la toma de medidas preventivas ha demostrado reducir la incidencia de efectos adversos.

Palabras Claves: Medio de contraste yodado, farmacología clínica, reacciones adversas, reacciones tipo alérgicas, injuria renal aguda por contraste.

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 57-69

Recivido 06-06-2014; Revisado 23-06-2014; Aceptado 01-07-2014

1) INTRODUCCIÓN

Los medios de contraste yodados (MCY) de uso intravenoso, son administrados diariamente a miles de pacientes y constituyen un agente indispensable en la práctica actual de la medicina. Se estima que anualmente a nivel mundial se realizan más de 75 millones de exámenes contrastados con agentes yodados (Christiansen C, 2005). Su empleo no siempre es inocuo y se han reportado efectos adversos que varían desde una mínima perturbación fisiológica hasta situaciones que pueden comprometer la vida (Thomsen HS & Morcos SK, 2000).

El medio de contraste ideal debería ser totalmente inerte, carente de cualquier interacción con el organismo. Además debería ser eliminado de forma rápida y completa sin generar efectos adversos.

Los MCY son por lejos los más utilizados hoy en día. Estos agentes fueron introducidos en la práctica clínica en los años 1950s. Desde entonces han sufrido significativas mejoras en cuanto a su seguridad y tolerancia, pero el riesgo asociado a su empleo no ha podido ser eliminado del todo.

Debido a la gran cantidad de exámenes contrastados solicitados por prácticamente todas las especialidades médicas, el presente artículo de revisión tiene como objetivo conocer en detalle las características farmacológicas y los principales efectos adversos de los MCY.

2) FARMACOLOGÍA CLÍNICA

Todos los MCY tienen como sustrato básico un anillo de benceno al que se adhieren los átomos de yodo en las posiciones 2, 4 y 6 (Figura 1). La fijación de tres átomos de yodo al anillo de benceno forma un monómero, el cual logra la concentración mínima necesaria para lograr una adecuada atenuación radiológica. La unión de 2 anillos de benceno con sus respectivos yodos es lo que se conoce como dímero (Pasternak JJ & Williamson EE, 2012).

Los átomos de yodo son los responsables de la atenuación de los rayos x. El radio atómico de un átomo de yodo unido covalentemente es de aproximadamente 133 picómetros, lo que cae dentro del radio de longitud de onda de los

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Prieto-Rayó, Departamento de Imagenología Clínica Dávila, Avenida Recoleta 464, Santiago, Región Metropolitana, Chile. Teléfono: 56-2-27308210, Correo electrónico: jpgrietorayo@gmail.com

rayos x (10 a 10.000 picómetros), por esta razón los rayos x son atenuados por los átomos de yodo. El hecho de tener 3 átomos de yodo unidos al anillo de benceno ofrece dos grandes beneficios: (1) al ser 3 átomos grandes unidos con tal nivel de proximidad aumenta el tamaño molecular efectivo, atenuando así los rayos x en longitudes mayores y (2) el enlace covalente a un grupo orgánico estable, en este caso benceno, reduce el riesgo de efectos tóxicos del yoduro libre (Pasternak JJ & Williamson EE, 2012).

Mediante la modificación de los elementos estructurales unidos al benceno se ha logrado mejorar las características fisicoquímicas, en particular la osmolaridad, con lo que ha mejorado la tolerancia en el sistema vascular y nervioso. Estas modificaciones dieron como resultado 4 clases de MCY (Figura 2). Los MCY se clasifican según sus características físico químicas:

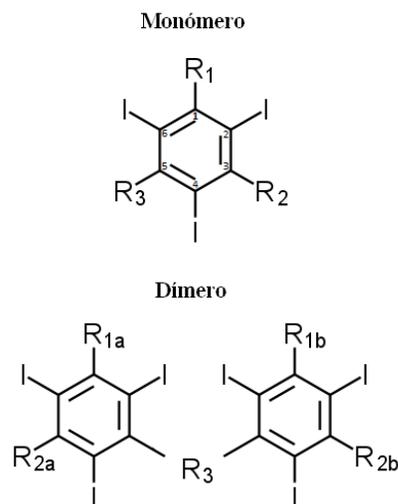
- a) **Osmolaridad:** número de partículas que generan en solución.
- **Alta osmolaridad:** 1200 a 2400 mOsm/kg H₂O.
 - **Baja osmolaridad:** 290 a 860 mOsm/kg H₂O, dentro de este grupo se encuentran los isosmolares, que poseen una osmolaridad igual al plasma (290 mOsm/kg H₂O).
- b) **Tendencia iónica:** dada por los radicales en posición 1, 3 y 5 del núcleo benzoico.
- **Iónicos:** Contienen COOH radical carboxilo.
 - **No Iónicos:** Contienen OH radical hidroxilo.
- c) **Estructura molecular:** determinada por el número de núcleos benzoicos.
- **Monoméricos:** un núcleo benzoico.
 - **Diméricos:** dos núcleos benzoicos.

Según sus características moleculares, los distintos MCY tienen diferentes perfiles de uso clínico y niveles de toxicidad. Es así como por ejemplo los MCY iónicos, en solución se disocian en dos partículas, lo que determina un fármaco de alta osmolaridad y eléctricamente cargado. Como consecuencia pueden interferir con los eventos electrofisiológicos del organismo como la transmisión del impulso en el sistema nervioso central y periférico y en el sistema cardiovascular (Thomsen HS & Morcos SK, 2000). Por otro lado los MCY no iónicos no se disocian, por lo que tienen una baja osmolaridad, permaneciendo como partículas eléctricamente neutras, traduciéndose en una menor unión a proteínas, menor inhibición enzimática y escaso efecto sobre membranas biológicas.

Tras su administración endovenosa, todos los MCY muestran un bajo índice de unión a proteínas. Tienen una distribución desde el compartimiento intravascular a los órganos con alto flujo sanguíneo como cerebro, hígado y riñones de forma rápida y con menor velocidad a los

tejidos y órganos con menor perfusión como hueso y grasa. Debido a su distribución en todo el organismo se consideran contrastes no órgano-específico. No se metabolizan ni entran al espacio intracelular y son eliminados por los riñones mediante filtración glomerular (Katzberg RW, 1997; Bourin M et al, 1997). La vida media de la mayoría de los MCY está en el rango de 90 a 120 minutos en sujetos con función renal normal y puede alargarse por semanas en caso de sujetos con insuficiencia renal (Bourin M et al, 1997).

Figura N° 1: Unidad molecular estructural básica de los medios de contraste yodados. El anillo de benceno es sustituido en las posiciones 2,4 y 6 con átomos de yodo. La sustitución en la posición R1 en el monómero y R1a en el dímero con un grupo que contenga el grupo carboxilo (-COO-) resulta en compuestos iónicos, mientras que si se sustituye con un grupo hidroxilo (OH) resulta en compuestos no iónicos. R2, R2a, R2b y R3 contienen moléculas que no contienen grupos carboxilo. Modificado de Pasternak JJ & Williamson EE, 2012.



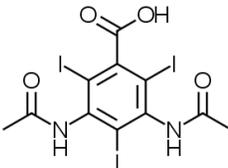
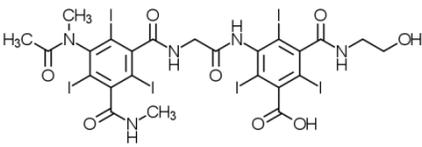
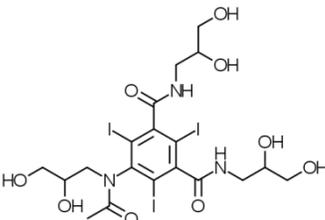
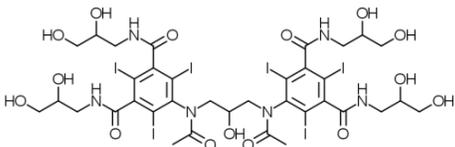
3) USO CLÍNICO Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Su uso clínico se basa fundamentalmente en mejorar la representación de estructuras anatómicas dentro del organismo, facilitando la detección y caracterización de lesiones, (ej: lesiones focales hepáticas, Figura 3). Existen 3 vías principales de administración: intravascular, enteral y directa. De estas la vía intravascular, que incluye la vía intraarterial e intravenosa, es por lejos la más utilizada. Las principales complicaciones de esta vía son las reacciones tipo alérgicas y la injuria renal aguda inducida por contraste, las cuales se analizarán posteriormente en este artículo. Como en toda inyección intravascular existe un

riesgo de extravasación que por lo general son de Sin embargo, se ha descrito que con volúmenes de extravasación mayores a 100 ml existe riesgo de necrosis tisular o síndrome compartimental (Bellin MF et al, 2002). La vía directa consta de dos formas de administración: (1) percutánea, como la artrografía y (2) vía catéter, sondas o tubos, como en el caso de la cistografía o colangiografía por sonda T. Tanto la vía enteral como directa ha

volúmenes pequeños que no traen mayor complicación. reportado complicaciones (Ridley LJ, 1998; Rosati G et al, 1992), pero son extremadamente raras, por esta razón centraremos nuestro análisis en las complicaciones de la administración intravascular de MCY. Una completa lista de indicaciones con su respectiva vía de administración se puede encontrar en la Tabla 1.

Figura Nº 2: Características de los 4 tipos de medios de contraste yodados. Modificado de Pasternak JJ & Williamson EE, 2012.

Ionización	Polímero	Estructura	Ejemplo	Osmolaridad
Iónico	Monómero		Diatrizoato (Hypaque)	1400-2400 mOsm/L
Iónico	Dímero		Ioxaglate (Hexabrix)	600 mOsm/L
No iónico	Monómero		Iohexol (Omnipaque)	290-860 mOsm/L
No iónico	Dímero		Iodixanol (Visipaque)	280 mOsm/L

4) EFECTOS ADVERSOS

La incidencia de efectos adversos varía según MCY administrado. En el caso de agentes iónicos de alta osmolaridad los reportes van entre 5% a 12% (Namasivayam S et al, 2006; Morcos SK & Thomsen HS, 2001; Bush WH & Swanson DP, 1991), mientras que con el uso de agentes no iónicos de baja osmolaridad rondan el 1% a 3% (Bettmann MA et al, 1990).

Por esta razón la utilización de MCY hiperosmolares e iónicos ha disminuido significativamente en los últimos años. En nuestro país ya no se comercializan estos productos, existiendo uso universal de contrastes hipoosmolares no iónicos. La mortalidad asociada a la administración de MCY endovenoso es excepcional, siendo estimada en 0,9 por cada 100.000 administraciones (Caro JJ et al, 1991). Es importante destacar que no existen

diferencias en la mortalidad entre el uso de medios de contraste iónicos y no iónicos. El riesgo es equivalente a morir en un accidente aéreo o por homicidio (Gerstman BB, 1991).

Las reacciones adversas a MCY se pueden clasificar de varias formas, por mecanismo de injuria (tipo alérgica, tóxica y extravasación), por temporalidad (inmediatas y tardías) o por su magnitud (leves, moderadas y severas). En el presente trabajo clasificaremos las reacciones adversas a MCY según temporalidad en inmediatas y tardías. La injuria renal aguda inducida por contraste, es una reacción adversa a medicamento de tipo tóxica y tardía, y será tratada aparte.

5) REACCIONES ADVERSAS INMEDIATAS (RAI)

Se definen como toda reacción adversa a MCY que ocurre dentro de la primera hora de administrado el agente. Sobre el 90% de estas ocurre en los primeros 20 minutos (American College of Radiology, 2013). A principios de los años 90 el Dr. Katayama condujo en Japón un estudio con más de 337.000 casos que comparó la tasa de efectos adversos de los MCY iónicos hiperosmolares, de uso estándar en esos tiempos, versus los no iónicos hipoosmolares recientemente introducidos a la práctica clínica. El estudio demostró un riesgo 5 veces mayor (0,22% vs 0,04%) de los productos iónicos e hiperosmolares abriendo camino al uso universal de los fármacos no iónicos e hipoosmolares (Katayama H et al, 1990).

La mortalidad determinada en forma exclusiva por RAI a estos agentes es excepcional. Aunque los valores reportados por la literatura varían desde 1:13.000 a 1:169.000, es probable que estos números estén sobredimensionados por las dificultades metodológicas de demostrar su verdadera incidencia (Katayama H et al, 1990; Hartman GW et al, 1982; Shehadi WH, 1985).

Las RAI tipo alérgicas y tóxicas se organizan en tres categorías según su gravedad: leve, moderada y severa. Las principales manifestaciones leves incluyen náusea, vómitos, rash cutáneo y cambios hemodinámicos autolimitados. Por otro lado las RAI severas generalmente se manifiestan como prurito y urticaria sumada a broncoespasmo, disnea, hipotensión, edema laríngeo y colapso cardiovascular (Tabla 2) (American College of Radiology, 2013).

A pesar que las reacciones adversas tipo alérgica a MCY tienen características clínicas similares a las por hipersensibilidad tipo 1 (mediada por IgE), la mayoría son probablemente reacciones anafilactoides. Esto se basa en que muchos pacientes que experimentan estos fenómenos no han sido expuestos previamente a MCY, que no existe un aumento consistente de anticuerpos IgE y que no siempre recurren estas reacciones en el mismo paciente (Almen T, 1994; Lieberman P et al, 2010; Simons FE et al, 2011; Vervloet D & Durham S, 1998). Algunos

mecanismos específicos postulados incluyen: (1) activación directa de mastocitos (Simon RA et al, 1979; Ring J et al, 1978), (2) activación de la coagulación, sistema cinina y/o complemento (Simon RA et al, 1979; Lang JH et al, 1976; Szebeni J, 2004; Szebeni J, 2005), (3) Inhibición de la agregación plaquetaria con aumento de la liberación de serotonina (Zir LM et al, 1974). Sin embargo, existen estudios que han demostrado anticuerpos IgE específicos para MCY y plantean la posibilidad que dicho mecanismo fue subestimado en estudios pasados (Laroche D et al, 1998; Trcka J et al, 2008). Es probable que ocurran tanto reacciones anafilácticas como anafilactoides, sin embargo, los signos, síntomas y tratamiento son similares.

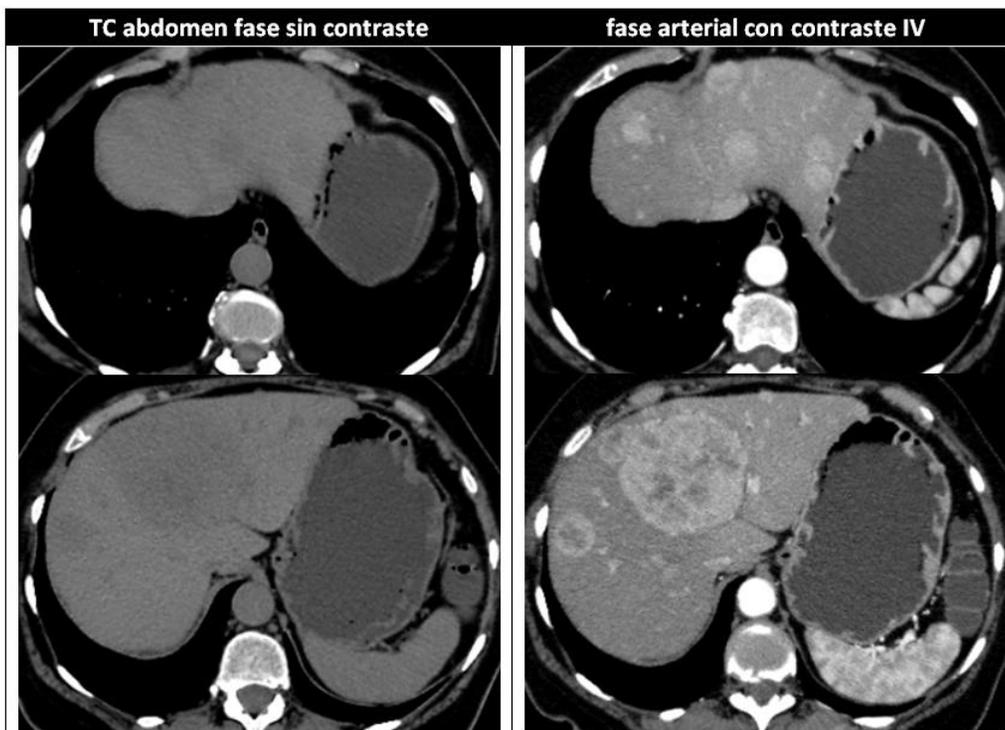
Tabla Nº 1: Uso clínico y vías de administración (American College of Radiology 2013).

INTRAVASCULAR
Intravenoso
Tomografía computarizada
Angiografía por sustracción digital
Urografía intravenosa
Flebografía
Vena cava inferior y sus afluentes
Vena cava superior y sus afluentes
Extremidades
Otros lugares venosos
Venografía epidural
Intra-arterial
Angiografía cardiaca
Angiografía coronaria y pulmonar
Angiografía aórtica
Arteriografía visceral y periférico
Angiografía vascular del SNC
Angiografía cerebral, vertebral y espinal.
INTRATECAL
Mielografía
Cisternografía
OTROS
Tubo gastrointestinal - Oral, rectal u ostomía
Fluoroscopia convencional
Tomografía computarizada
Usos terapéuticos
Uso cavidad corporal
Herniografía
Peritoneografía
Vaginografía
Histerosalpingografía
Artrografía
Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica
Colangiografía
Nefrostografía
Pielografía - anterógrada , retrógrada
Uretrografía - miccional , retrógrada
Cistografía
Sialografía
Ductografía (mama)
Misceláneas
Inyección tracto fístula
Delimitación de la cavidad (incluyendo derivaciones urinarias)
Estudios de localización de catéter

El manejo debe comenzar por identificar los pacientes en riesgo y prevenir la ocurrencia de estos eventos. Un historial de asma aumenta entre 6 a 10 veces el riesgo de generar una RAI, el antecedente de RAI a MCY previa aumenta 5 veces el riesgo, mientras que el antecedente de atopia lo aumenta 3 veces (Morcos SK et al, 2001; Lang DM, 1991). Pacientes alérgicos con historia de reacciones anafilácticas a otros agentes deben ser evaluados caso a caso. La alergia específica a mariscos, que alguna vez se asoció a mayor riesgo de presentar RAI a MCY, no tiene evidencia que la soporte (Beaty AD et al, 2008; Boehm I, 2008). Sin embargo, pacientes con alergia a mariscos puede tener una susceptibilidad atópica general

aumentada y deben ser cuestionados sobre la presencia de alergias adicionales, que puedan predisponer a reacciones anafilactoides. Se propuso que pacientes en tratamiento con fármacos como beta-bloqueadores y algunos AINES podrían tener mayor riesgo de presentar RAI, pero no existe consenso respecto a este tema y los datos son contradictorios (Morcos SK et al, 2001). Es importante destacar que test cutáneo intradérmico con MCY no es predictor de futuras reacciones anafilactoides y puede ser peligroso en sí, por lo que no se recomienda su utilización de forma rutinaria (Laroche D et al, 1998; Trcka J et al, 2008).

Figura N° 3: Cortes axiales TC de abdomen. Las imágenes de la izquierda corresponden a la fase sin contraste del estudio. Las imágenes de la derecha se obtuvieron en la fase arterial con contraste. Observe como se logra una mayor detección y caracterización de las lesiones hepáticas con el uso del MCY endovenoso.



5.1) Premedicación:

La premedicación está indicada en pacientes con riesgo de generar una RAI tipo alérgica. En la práctica se utilizan corticoides con o sin antihistamínicos previo a la administración del MCY. Se sugiere utilizar MCY no iónicos y de baja osmolaridad en los pacientes en riesgo. Para prevenir las recurrencias se sugiere que el paciente no debe recibir el mismo agente específico que causó la

reacción. Se ha demostrado que el mayor beneficio de premedicar es la reducción del riesgo de presentar RAI leves que no requieren o requieren mínima intervención médica (Lasser EC et al, 1994). A la fecha no existen trabajos que demuestren que la premedicación proteja contra RAI severas (Morcos SK, 2005; Brockow K et al, 2005; Tramer MR et al, 2006). Esto puede atribuirse a lo

infrecuente que son las RAI que amenazan la vida y la dificultad de realizar un estudio con el suficiente poder estadístico para demostrar el real beneficio de la premedicación.

Existen 2 protocolos de premedicación para exámenes electivos propuestos por el American College of Radiology (ACR), estos se exponen en la tabla 3. Estos protocolos fueron estudiados por Greenberger PA y colaboradores (1984), y se demostró que la administración de corticoides más antihistamínicos en pacientes con riesgo producían una disminución en la recurrencia a un 11% de un histórico 17-30%. Un estudio posterior del mismo autor demostró una mayor reducción cuando este protocolo se administraba en conjunto a un MCY no iónico de baja osmolaridad (recurrencia en MCY de alta osmolaridad 9,1% vs recurrencia en MCY de baja osmolaridad 0,5%) (Greenberger PA, 1991). Se recomienda la administración de corticoides vía oral sobre la vía intravenosa y Prednisona y Metilprednisolona son igual de efectivos. Otro esquema de premedicación es el propuesto por la ESUR (European Society of Urogenital Radiology) que consiste en administrar prednisolona 30 mg (o metilprednisolona 32 mg) vía oral 12 y 2 horas antes de la administración del medio de contraste. En Chile, por un tema de costo, se utiliza una versión modificada de este esquema reemplazando la prednisolona por prednisona 50 mg.

En pacientes que deban realizar de emergencia un examen contrastado con MCY, existen 3 opciones de premedicación propuestas por el ACR, las que se muestran en la tabla 3. Es importante destacar que no existen trabajos que demuestren su efectividad y solo constituyen una recomendación de expertos. Los protocolos se exponen en orden decreciente de preferencia. La opción 2 debe ser administrada en caso de pacientes alérgicos a la Metilprednisolona, aspirina o AINES, especialmente si es asmático. La tercera opción se indica cuando el examen contrastado debe realizarse en un lapso de tiempo menor a 4-6 horas. Esta opción no incluye la administración de corticoides ya que los corticoides IV no han mostrado efectividad cuando son administrados en menos de 4 a 6 horas previas a la inyección del contraste.

5.2) Tratamiento:

El tratamiento depende del grado de severidad. En las RAI leves, especialmente aquellas cutáneas exclusivas de carácter autolimitado, el tratamiento es sintomático. Si el paciente presenta eritema o prurito se puede administrar loratadina 4 mg vía oral o Clorfenamina 10 mg vía oral más prednisona 50 mg vía oral. En caso de náuseas o vómitos profusos o persistentes se puede indicar ondansetron 4mg IV. Si las manifestaciones cutáneas son generalizadas se debe administrar antihistamínicos y corticoides

endovenosos como clorfenamina 4 mg IV e hidrocortisona 100 - 300 mg IV (American College of Radiology, 2013).

Si existe hipotensión leve, en primera instancia medidas mecánicas como la elevación de extremidades inferiores puede ser de utilidad. La administración de fluidos endovenosos también puede ayudar a recuperar las cifras tensionales a valores normales (suero fisiológico o solución Ringer). Si la hipotensión se asocia a bradicardia (episodio vagal) debería administrarse 0,2 a 0,4 mg de atropina endovenosa y repetir en caso necesario. El paciente debe ser observado cuidadosamente para evaluar si existe progresión de los signos y síntomas.

En caso de RAI moderadas y severas tales como broncoespasmo, sibilancias, laringoespasmo, estridor laríngeo, hipotensión y pérdida de conciencia, se debe suspender de inmediato la administración del MCY e iniciar tratamiento. En la mayoría de las instituciones estas complicaciones deben ser manejadas por equipos de apoyo especializados (anestesiólogos, intensivistas, etc) que concurren a la Unidad de Imágenes para el manejo avanzado de la vía aérea o para el uso de drogas vasoactivas. Su manejo es idéntico al de anafilaxis e incluye epinefrina intramuscular 0,2 a 0,5 mg cada 5 a 15 minutos según necesidad, asegurar vía aérea, oxígeno y fluidos intravenosos. Una vez estabilizado el paciente, se debe administrar hidrocortisona 100 – 300 mg IV o equivalente. El paciente debe ser hospitalizado en una unidad de cuidados intensivos y quedar a cargo de un equipo con experiencia en el manejo de este tipo de complicaciones (American College of Radiology, 2013).

Es importante recalcar la importancia de tener el equipamiento necesario para tratar estas reacciones (manejo de vía aérea, oxígeno, epinefrina, fluidos IV, carro de paro), además del personal entrenado en el manejo inicial de estas reacciones en todo lugar donde se administre MCY.

6) REACCIONES ADVERSAS TARDÍAS

Las reacciones adversas tardías ocurren entre 1 hora hasta 1 semana posterior a la administración de MCY, siendo lo más frecuente entre las 3 horas y los 2 días (Meth MJ & Maibach HI, 2006; Christiansen C et al, 2000). La incidencia de las reacciones tipo alérgica varía desde 0,5 a 14% (Christiansen C et al, 2000; Loh S et al, 2010). La manifestación clínica más frecuente es la cutánea (prurito, exantema maculopapular o urticaria) aunque también pueden manifestarse como fiebre, náuseas, vómitos, diarrea o cefalea (Loh S et al, 2010). Por lo general tienden a ser más leves que las RAI, pero se han reportado casos graves de necrólisis epidérmica tóxica y Síndrome de Stevens-Johnson (Savill JS et al, 1988; Wood BP et al, 1988). Sutton AG y colaboradores (2001) comunicaron que las reacciones adversas tardías cutáneas tuvieron una incidencia 3 veces mayor cuando se administró un MCY dímero no iónico (iodixanol), en comparación a la

observada con la administración de un monómero no iónico (iopamidol) o un dímero iónico (ioxaglate).

Se ha sugerido que las reacciones adversas tardías son producidas mediante el mecanismo de hipersensibilidad tipo IV mediada por linfocitos T, y que son más frecuentes en pacientes en tratamiento con Interleucina 2, debido a que es un potente estimulador de este subgrupo de linfocitos (Shulman KL et al, 1993). Al igual que en las RAI, la meta es detectar a las personas en riesgo y minimizar la posibilidad de que ocurra un evento adverso. Los pacientes en riesgo de generar reacciones adversas tardías son

aquellos con: (1) historia de reacciones adversas tardías a MCY, (2) que están en tratamiento con Interleucina 2 y (3) pacientes que se les va a administrar un MCY dímero no iónico. En este caso la prueba cutánea puede tener un rol para descartar alergia al MCY ya que su valor predictivo negativo es de 97% (Caimmi S et al, 2010). El tratamiento de estas reacciones es sintomático, con corticoides y antihistamínicos para las reacciones cutáneas, antipiréticos para manejar la fiebre y antieméticos en caso de náuseas. En casos severos o prolongados se debe considerar la evaluación por un inmunólogo y/o dermatólogo.

Tabla Nº 2: Clasificación de reacciones adversas agudas (American College of Radiology 2013).

REACCIONES ADVERSAS A MCY LEVES	
Los signos y síntomas son autolimitados y sin evidencia de progresión	
Tipo alérgica	Tóxica
Urticaria autolimitada / prurito	Nauseas autolimitadas / vómitos
Edema cutáneo autolimitado	Enrojecimiento transitorio / calor / escalofríos
"picazón" autolimitada / garganta "áspera"	Dolor de cabeza / mareos / ansiedad / alteración del gusto
Congestión nasal	hipertensión leve
Estornudos / conjuntivitis / rinorrea	Reacción vasovagal que se resuelve de forma espontánea
REACCIONES ADVERSAS A MCY MODERADAS	
Los signos y síntomas son más pronunciados y suelen requerir tratamiento médico. Algunas de estas reacciones tienen el potencial de llegar a ser graves si no se tratan.	
Tipo alérgica	Tóxica
urticaria difusa / prurito	náuseas prolongadas / vómitos
Eritema difuso, signos vitales estables	Urgencia hipertensiva
Edema facial sin disnea	Dolor en el pecho Aislado
Tensión en la garganta o ronquera sin disnea	Reacción vasovagal que requiere y es sensible a tratamiento
Sibilancias / broncoespasmo, sin o leve hipoxia	
REACCIONES ADVERSAS A MCY SEVERAS	
Los signos y síntomas pueden resultar en morbilidad permanente o muerte si no se tratan adecuadamente.	
Tipo alérgica	Tóxica
Edema difuso o edema facial con disnea	Reacción vasovagal resistente al tratamiento
Eritema difuso con hipotensión	Arritmia
Edema laríngeo con estridor y / o hipoxia	Convulsiones, ataques epilépticos
Sibilancias / broncoespasmo, hipoxia significativa	Emergencia hipertensiva
Shock anafiláctico (hipotensión + taquicardia)	

7) INJURIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CONTRASTE IODADO (IRA-MCY)

La IRA-MCY se presenta como un repentino deterioro de la función renal tras la administración de MCY intravascular, en ausencia de otra causa que explique el daño renal. Aunque no existe un criterio estandarizado para el diagnóstico, los más utilizados son: (1) aumento mayor al 25% de la creatinina plasmática basal (2) y/o aumento absoluto de un 0,5 mg/dl de la creatinina basal. Ambos criterios deben presentarse dentro de los 3 días posteriores a la administración de MCY y en ausencia de otros nefrotóxicos. En general el pico de creatinina ocurre entre los 3 a 5 días de la aplicación del fármaco, volviendo al valor basal alrededor de las 2 semanas (Rihal CS et al, 2002). Si bien la mayoría de los casos no conlleva complicaciones, existe un subgrupo de pacientes en los cuales la IRA-MCY puede prolongar el tiempo de hospitalización, aumentar el requerimiento de diálisis y aumentar la mortalidad general (From AM et al, 2008; Levy EM et al, 1996).

La incidencia de esta complicación varía significativamente en diversas publicaciones, que se explica por diferencias en criterios de definición de la falla renal, tipo y dosis de medio de contraste empleado, además de la coexistencia de otras causas potenciales de falla renal aguda que no son debidamente excluidas (American College of Radiology, 2013). Sumado a esto, es un hecho que pacientes hospitalizados, sin recibir MCY intravenosos, pueden presentar deterioro de la función renal. Por ejemplo, en un estudio que analizó 32.161 pacientes hospitalizados que no recibieron MCY intravenosos, más de la mitad tuvo un alza de la creatinina plasmática al menos de un 25% y sobre el 40% sufrió un aumento absoluto en 0,4 mg/dl. Se postula que si alguno de los pacientes que presentó alza de la creatinina plasmática hubiera recibido MCY intravenoso, el alza de ésta habría sido atribuida sin dudar al MCY (Newhouse JH et al, 2008). Es en este punto donde muchos estudios fallan, ya que no cuentan con un grupo control para comparar.

Pese a todos estos inconvenientes, en pacientes con función renal normal se estima una incidencia menor al 1-5%. Mientras que en pacientes con función renal disminuida, la incidencia puede llegar a valores mayores de un 50% (Thomsen HS & Morcos SK, 2003; Hall KA et al, 1992; Bruce RJ et al, 2009). Un estudio mostró que el riesgo de generar IRA-MCY era de 2%, 10,4% y 62% en pacientes con una creatinina basal de 1,2 mg/dl o menos, 1,3 a 1,9 mg/dl y 2,0 mg/dl o más respectivamente (Hall KA et al, 1992). Bruce y colaboradores (2009) realizaron uno de los pocos estudios que cuentan con un grupo control. Compararon en 11.588 pacientes (13.274 exámenes) la frecuencia y magnitud de la elevación de creatinina plasmática en exámenes de TC con MCY (n=5.790) vs un

grupo control sin MCY (n=7.474), demostrando que en valores de creatinina basal menores a 1,8 mg/dl, no existen diferencias significativas en el aumento de la creatinina plasmática, mientras que pacientes con valores de creatinina basal sobre 1,8 mg/dl tienen significativamente mayor riesgo de presentar IRA-MCY posterior a la administración de un MCY de baja osmolaridad no iónico (iohexol) en comparación con el grupo control que no recibió MCY.

Tabla Nº 3: Esquemas de premedicación propuestos por el ACR (American College of Radiology 2013).

PROTOCOLO EXÁMENES ELECTIVOS.
Opción 1: Prednisona 50 mg vía oral, administrado 13, 7 y 1 hora previa a la inyección del MCY. + Difenhidramina 50 mg intravenoso, intramuscular u oral 1 hora previa a la administración del MCY.
Opción 2: Metilprednisolona 32 mg vía oral, administrados 12 y 2 horas previas a la inyección de MCY. + Puede ser agregado un antihistamínico (como el de la 1 opción).
PROTOCOLO EXÁMENES DE URGENCIA. ORDEN DECREciente DE RECOMENDACIÓN
Opción 1: Succinato de sodio de Metilprednisolona 40 mg o Succinato de Hidrocortisona 200 mg intravenoso cada 4 horas hasta la realización del examen contrastado + Difenhidramina 50 mg intravenoso 1 hora previa a la administración del MCY.
Opción 2: En caso de pacientes alérgicos a la Metilprednisolona, aspirina o AINES, especialmente si es asmático. Fosfato sódico de Dexametasona 7,5 mg o Betametasona 6 mg intravenoso cada 4 horas hasta la realización del examen contrastado. + Difenhidramina 50mg intravenoso 1 hora previa a la administración del MCY.
Opción 3: En caso de exámenes de urgencia que dispongan de menos de 4-6 horas de preparación Omitir Corticoides y administrar Difenhidramina 50 mg intravenoso 1 hora previa a la administración del MCY.

En el trabajo se postula que la IRA-MCY está sobreestimada y muchas de las alzas en la creatinina plasmática de estos pacientes pueden deberse a enfermedades de base u otros tratamientos recibidos (Bruce RJ et al, 2009).

7.1) Fisiopatología de la IRA-MCY:

La fisiopatología de este proceso no está del todo clara. La combinación de cambios en la hemodinámica renal, toxicidad directa y efectos deletéreos de la osmolaridad del MCY, producirían injuria renal posterior a la exposición al MCY. La vasoconstricción renal es un hallazgo constante en la IRA-MCY, mediadores como endotelina y adenosina, y posiblemente el contacto directo del endotelio con el MCY jugarían un papel importante en este proceso (Cantley LG et al, 1993; Katholi RE et al, 1995; Russo D et al, 1995; Pflueger A et al, 2000). Es importante destacar que la mayoría de estos hallazgos derivan de modelos animales, por lo que la real contribución de estos mediadores en la IRA-MCY del ser humano no está establecida. Las moléculas de MCY son filtradas por el glomérulo, pasan sin ser reabsorbidas por los túbulos renales, lo que genera un aumento en el flujo tubular. Esto produce feedback túbuloglomerular negativo (y vasoconstricción directa renal) resultando en una disminución de la filtración glomerular (Pasternak JJ & Williamson EE, 2012). Por otra parte, se ha descrito que los MCY son tóxicos para las células del epitelio tubular renal, generando radicales libres y activando apoptosis de las células en la rama gruesa ascendente del Asa de Henle (Dickinson MC & Kam PC, 2008).

7.2) Prevención y tratamiento de la IRA-MCY:

El tratamiento debe comenzar por identificar los pacientes en riesgo de presentar IRA-MCY. Existe consenso que el mayor factor de riesgo es la disfunción renal preexistente. Otros factores de riesgo propuestos son diabetes mellitus con daño renal, deshidratación, edad avanzada, falla cardíaca con disminución de la perfusión renal, medio de contraste iónicos de alta osmolaridad, altas dosis de medio de contraste, mieloma múltiple, hipertensión arterial, hiperuricemia y dosis múltiples de MCY en menos de 24 horas (Abujudeh HH et al, 2009; Byrd L & Sherman RL, 1979; Pahade JK et al, 2011; Parfrey PS et al, 1989; Schwab SJ et al, 1989; Trivedi H & Foley WD, 2010), sin embargo estos factores no han sido confirmados de forma rigurosa como factores de riesgo independientes. La vía de administración podría jugar un papel como factor de riesgo. Se ha reportado una incidencia mayor de IRA-MCY en pacientes sometidos a angiografía cardíaca en comparación a pacientes que recibieron MCY de forma intravenosa (Katzberg RW & Newhouse JH, 2010).

No existe consenso universal sobre el tamizaje de la IRA-MCY. El comité de expertos del ACR recomienda solicitar

niveles basales de creatinina sérica en los siguientes casos: edad mayor a 60 años, historia de enfermedad renal (incluyendo diálisis, trasplante renal, monorreno, cáncer renal y cirugía renal), historia de hipertensión arterial y/o Diabetes Mellitus, uso de Metformina (se incluye no por ser un factor de riesgo en sí, sino porque pacientes que desarrollan IRA-MCY mientras están en tratamiento con Metformina son susceptibles a presentar acidosis láctica). Dicho comité postula que no se requiere la medición basal de creatinina plasmática en pacientes que serán sometidos a exámenes programados con MCY intravenoso, siempre y cuando no presenten los factores de riesgo mencionados. No existe tratamiento específico una vez producida la IRA-MCY y su manejo es similar al de la necrosis tubular aguda de cualquier causa, con énfasis en la mantención del balance hidroelectrolítico. Por esta razón el mejor tratamiento de la IRA-MCY es la prevención. En primera instancia se recomienda evitar exámenes contrastados en pacientes de riesgo, buscando alternativas sin medios de contraste como CT, ultrasonido o RM sin contraste (American College of Radiology, 2013). En escenarios donde el beneficio del uso de MCY es superior al riesgo, se aconseja el uso de medios hipo o isoosmolares y en la menor dosis posible. Estos agentes se han asociado a una reducción de la incidencia de IRA-MCY en pacientes de alto riesgo, especialmente diabéticos, pero tienen poca o nula ventaja en pacientes con función renal normal (grupo de bajo riesgo) (Barrett BJ & Carlisle EJ, 1993). Con respecto a la dosis de medio de contraste, Freeman RV y colaboradores (2002) postulan que en pacientes sometidos a angiografía coronaria, el volumen administrado de MCY no debe exceder el valor calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Dosis máxima: } \frac{5 \text{ mL} \times \text{peso (kg)}}{\text{Creatinina Plasmática}}$$

Cuando las dosis exceden este valor, se mostró un incremento en el requerimiento de diálisis y mortalidad intrahospitalaria (Freeman RV et al, 2002).

La hidratación, particularmente la prevención de deshidratación, juega un papel fundamental en la disminución del riesgo de presentar IRA-MCY (Morcos SK et al, 1999). Esto es probablemente debido a la capacidad de diluir las sustancias tóxicas a nivel renal, acortar el tiempo de contacto de estas con el tejido renal y garantizar un adecuado flujo sanguíneo renal. A pesar de la gran cantidad de estudios que avalan su utilización, no existe consenso sobre el mejor régimen a utilizar (Barrett BJ & Parfrey PS, 2006). La protección lograda con la administración de solución isotónica (suero fisiológico NaCl 0,9%) mostró ser superior a la lograda con solución hipotónica (NaCl 0,45%), especialmente en mujeres,

pacientes con diabetes mellitus y quienes recibieron más de 250 ml de contraste (Mueller C et al, 2002). En pacientes de riesgo, el régimen sugerido consiste en iniciar la hidratación con solución fisiológica NaCl 0,9% a 100 ml/hora por lo menos 4 horas previas a la administración de medio de contraste y continuar por 24 horas posteriores al examen (Morcos SK et al, 1999). Se requiere especial cuidado con pacientes con falla cardíaca congestiva.

El uso de bicarbonato de sodio intravenoso fue puesto en duda por From y colaboradores (2008), quienes en su estudio de cohorte retrospectivo de 7977 pacientes, concluyen que el bicarbonato de sodio intravenoso puede aumentar la incidencia de IRA-MCY. Esto se contrapone con los estudios de Merten y colaboradores (2004) quienes concluyen en su trabajo que la hidratación con bicarbonato de sodio previa a la administración de MCY es más efectiva que la hidratación con solución fisiológica como profilaxis de la IRA-MCY. Debido a esto la evidencia no puede considerarse definitiva y se requieren estudios que determinen el real rol protector del bicarbonato de sodio en la IRA-MCY.

La eficacia de la N-acetilcisteína en la reducción de la IRA-MCY es controversial. Múltiples estudios y meta-análisis no han logrado concluir si este agente reduce o no el riesgo de IRA-MCY (Stenstrom DA et al, 2008; Vaitkus PT & Brar C, 2007; Kshirsagar AV et al, 2004). Debido a esto no ha sido posible generar una recomendación con respecto su uso. Un estudio (Hoffmann U et al, 2004) demostró que los niveles de creatinina plasmática disminuyen en sujetos normales tras la administración de n-acetilcisteína, pero no ocurre lo mismo con los niveles plasmáticos de cisteína C (existe evidencia que reporta a esta molécula como mejor marcador de función renal). Este hallazgo pone en duda si realmente la baja de creatinina plasmática se debe a la prevención de daño renal o a una disminución mediada por otro mecanismo. Pese a esto, si se toma en cuenta su potencial beneficio como agente vasodilatador y "barredor" de radicales libres (Drager LF et al, 2004), y su baja toxicidad, es posible considerar su administración. En ningún caso debe considerarse como sustituto de la hidratación endovenosa profiláctica. El esquema más utilizado consiste en administrar 600-1200 mg vía oral cada 12 horas comenzando 24 horas previo al examen contrastado y continuando hasta completar 4 dosis. El uso de furosemida (diurético de asa) y manitol (diurético osmótico) fue estudiado por Solomon y colaboradores (1994). Dicho autor concluye que la hidratación salina provee mejor protección contra la IRA-MCY que la proveída por la hidratación salina más manitol o furosemida. Por esta razón no se recomienda su uso para reducir el riesgo de IRA-MCY.

Pese a que en teoría el uso de dopamina en dosis bajas podría tener un rol beneficioso en reducir la incidencia de IRA-MCY (aumenta el flujo renal y reduce la reabsorción de sodio), la literatura actual muestra resultados contradictorios y su uso podría ser incluso dañino en pacientes con diabetes mellitus (Goldenberg I & Matetzky S, 2005; Weisberg LS et al, 1993). Algo parecido ocurre con antagonistas del receptor de adenosina o antagonista de canales de calcio, los cuales no han mostrado resultados consistentes en reducir el riesgo de IRA-MCY (Goldenberg I & Matetzky S, 2005). En definitiva no se recomienda el uso de fármacos en la prevención de daño renal por MCY.

8) CONCLUSIONES

Los MCY son agentes ampliamente utilizados y han demostrado ser seguros. A excepción de las reacciones adversas tardías a MCY, los efectos adversos se presentan más frecuentemente al utilizar MCY de alta osmolaridad iónicos. En Chile tanto en el sistema público como privado de salud se utilizan MCY de baja osmolaridad no iónicos en prácticamente todos los exámenes de TC contrastados. El mejor tratamiento de las reacciones adversas a MCY es la prevención. La identificación de los pacientes de riesgo es fundamental, ya que en ellos la toma de medidas preventivas ha demostrado reducir la incidencia de efectos adversos. Por lo tanto es esencial educar al personal de salud involucrado en el procedimiento. Es necesario evaluar caso a caso la relación riesgo-beneficio en los pacientes con mayor probabilidad de presentar reacciones adversas.

BIBLIOGRAFÍA:

- Abujudeh HH, Gee MS, Kaewlai R. (2009) In emergency situations, should serum creatinine be checked in all patients before performing second contrast CT examinations within 24 hours? *J Am Coll Radiol.* 6:268-273.
- Almen T. (1994) The etiology of contrast medium reactions. *Invest Radiol.* 29(suppl 1):S37-S45.
- American College of Radiology (2013) Manual on Contrast Media. Version 9. <http://www.acr.org/quality-safety/resources/contrast-manual>
- Barrett BJ, Carlisle EJ. (1993) Metaanalysis of the relative nephrotoxicity of high- and low-osmolality iodinated contrast media. *Radiology.* 188:171-178.
- Barrett BJ, Parfrey PS. (2006) Clinical practice. Preventing nephropathy induced by contrast medium. *N Engl J Med.* 354: 379-86.
- Beatty AD, Lieberman PL, Slavin RG. (2008) Seafood allergy and radiocontrast media: are physicians propagating a myth? *Am J Med.* 121:158 e151-154.
- Bellin MF, Jakobsen JA, Tomassin I, et al. (2002) Contrast medium extravasation injury: guidelines for prevention and management. *Eur Radiol* 12:2807-2812.
- Bettmann MA, Holzer JF, Trombly ST. (1990) Risk management issues related to the use of contrast agents. *Radiology.* 175:629-631.

- Boehm I. (2008) Seafood allergy and radiocontrast media: are physicians propagating a myth? *Am J Med.* 121:e19.
- Bourin, M., Jolliet, P., Ballereau, F. (1997) An overview of the clinical pharmacokinetics of X-ray contrast media. *Clin. Pharmacokinet.* 32, 180–193.
- Brockow K, Christiansen C, Kanny G, et al. (2005) Management of hypersensitivity reactions to iodinated contrast media. *Allergy.* 60:150-158.
- Bruce RJ, Djamali A, Shinki K, Michel SJ, Fine JP, Pozniak MA. (2009) Background fluctuation of kidney function versus contrast-induced nephrotoxicity. *AJR Am J Roentgenol.* 192:711-718.
- Bush WH, Swanson DP. (1991) Acute reactions to intravascular contrast media: types, risk factors, recognition, and specific treatment. *AJR.* 157:1153–1161.
- Byrd L, Sherman RL. (1979) Radiocontrast-induced acute renal failure: a clinical and pathophysiologic review. *Medicine (Baltimore).* 58:270-279.
- Caimmi S, Benyahia B, Suau D, Bousquet-Rouanet L, Caimmi D, Bousquet PJ, Demoly P. (2010) Clinical value of negative skin tests to iodinated contrast media. *Clin Exp Allergy.* 40(5):805-810
- Cantley LG, Spokes K, Clark B, McMahon EG, Carter J, Epstein FH. (1993) Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney Int.* 44:1217.
- Caro JJ, Trindade E, McGregor M. (1991) The risks of death and of severe nonfatal reactions with high- vs low-osmolality contrast media: a meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 156(4):825–832
- Christiansen C, Pichler WJ, Skotland T. (2000) Delayed allergy-like reactions to X-ray contrast media: mechanistic considerations. *Eur Radiol.* 10:1965-1975.
- Christiansen C. (2005) X-ray contrast media: an overview. *Toxicology.* 209(2):185-187.
- Dickinson MC, Kam PC. (2008) Intravascular iodinated contrast media and the anaesthetist. *Anaesthesia.* 63(6):626-634.
- Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, Laurindo FR, Machado Cesar LA, Seguro AC. (2004) Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant.* 19(7):1803-1807.
- Freeman RV, O'Donnell M, Share D, et al. (2002) Nephropathy requiring dialysis after percutaneous coronary intervention and the critical role of an adjusted contrast dose. *Am J Cardiol.* 90(10):1068-1073.
- From AM, Bartholmai BJ, Williams AW, Cha SS, McDonald FS. (2008) Mortality associated with nephropathy after radiographic contrast exposure. *Mayo Clin Proc.* 83(10):1095-1100.
- From AM, Bartholmai BJ, Williams AW, Cha SS, Pflueger A, McDonald FS. (2008) Sodium bicarbonate is associated with an increased incidence of contrast nephropathy: a retrospective cohort study of 7977 patients at Mayo Clinic. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3(1):10-18.
- Gerstman_BB. (1991) Epidemiologic critique of the report on adverse reactions to ionic and nonionic media by the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology;* 178:787-790
- Goldenberg I, Matetzky S. (2005) Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ.* 172(11):1461-1471.
- Greenberger PA, Patterson R. (1991) The prevention of immediate generalized reactions to radiocontrast media in high-risk patients. *J Allergy Clin Immunol* 87:867–872
- Greenberger PA, Patterson R, Radin RC. (1984) Two pretreatment regimens for high-risk patients receiving radiographic contrast media. *J Allergy Clin Immunol.* 74:540–543
- Hall KA, Wong RW, Hunter GC, Camazine BM, Rappaport WA, Smyth SH, Bull DA, McIntyre KE, Bernhard VM, Misirowski RL. (1992) Contrast-induced nephrotoxicity: the effects of vasodilator therapy. *J Surg Res.* 53(4):317-320
- Hartman GW, Hattery RR, Witten DM, Williamson B Jr. (1982) Mortality during excretory urography: Mayo Clinic experience. *AJR Am J Roentgenol.* 139(5):919-922.
- Hoffmann U, Fischereder M, Krüger B, Drobnik W, Krämer BK. (2004) The value of N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast agent-induced nephropathy seems questionable. *J Am Soc Nephrol.* 15: 407-410.
- Katayama H, Yamaguchi K, Kozuka T, Takashima T, Seez P, Matsuura K. (1990) Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media: a report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology.* 175(3):621-628.
- Katholi RE, Taylor GJ, McCann WP, et al. (1995) Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline. *Radiology;* 195:17.
- Katzberg RW, Newhouse JH. (2010) Intravenous contrast medium-induced nephrotoxicity: is the medical risk really as great as we have come to believe? *Radiology.* 256:21-28.
- Katzberg RW. (1997) Urography into the 21st century: new contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. *Radiology.* 204(2):297-312.
- Kshirsagar AV, Poole C, Mottl A, Shoham D, Franceschini N, Tudor G, Agrawal M, Denu-Ciocca C, Magnus Ohman E, Finn WF. (2004) N-acetylcysteine for the prevention of radiocontrast induced nephropathy: a metaanalysis of prospective controlled trials. *J Am Soc Nephrol.* 15(3):761-769.
- Lang DM, Alpern MB, Visintainer PF, Smith ST. (1991) Increased risk for anaphylactoid reaction from contrast media in patients on beta-adrenergic blockers or with asthma. *Ann Intern Med.* 115(4):270-276.
- Lang JH, Lasser EC, Kolb WP. (1976) Activation of serum complement by contrast media. *Invest Radiol.* 11:303.
- Laroche D, Aimone-Gastin I, Dubois F, Huet H, Gérard P, Vergnaud MC, Mouton-Faivre C, Guéant JL, Laxenaire MC, Bricard H. (1998) Mechanisms of severe, immediate reactions to iodinated contrast material. *Radiology.* 209:183.
- Lasser EC, Berry CC, Mishkin MM, Williamson B, Zheutlin N, Silverman JM. (1994) Pretreatment with corticosteroids to prevent adverse reactions to nonionic contrast media. *AJR Am J Roentgenol.* 162:523-526.
- Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI. (1996) The effect of acute renal failure on mortality: a cohort analysis. *JAMA.* 275(19):1489-1494.
- Lieberman P, Nicklas RA, Oppenheimer J, et al. (2010) The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update. *J Allergy Clin Immunol.* 126(3):477-480.
- Loh S, Bagheri S, Katzberg RW, Fung MA, Li CS. (2010) Delayed adverse reaction to contrast-enhanced CT: a prospective single-center study comparison to control group without enhancement. *Radiology.* 255:764-771.
- Merten GJ, Burgess WP, Gray LV, Holleman JH, Roush TS, Kowalchuk GJ, Bersin RM, Van Moore A, Simonton CA 3rd, Rittase RA, Norton HJ, Kennedy TP. (2004) Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial. *JAMA.* 291(19):2328-2334.
- Meth MJ, Maibach HI. (2006) Current understanding of contrast media reactions and implications for clinical management. *Drug Saf.* 29:133-141
- Morcos SK, Thomsen HS, Webb JA, (2001) Contrast Media Safety Committee of the European Society of Urogenital Radiology. Prevention of

- generalized reactions to contrast media: a consensus report and guidelines. *Eur Radiol.* 11:1720.
- Morcos SK, Thomsen HS, Webb JA; (1999) Contrast Media Safety Committee, European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Contrast-media-induced nephrotoxicity: a consensus report. *Eur Radiol.* 9(8):1602-1613.
- Morcos SK, Thomsen HS. (2001) Adverse reactions to iodinated contrast media. *Eur Radiol.* 11:1267-1275.
- Morcos SK. (2005) Review article: Acute serious and fatal reactions to contrast media: our current understanding. *Br J Radiol* 78:686-693.
- Mueller C, Buerkle G, Buettner HJ, Petersen J, Perruchoud AP, Eriksson U, Marsch S, Roskamm H. (2002) Prevention of contrast media-associated nephropathy: randomized comparison of 2 hydration regimens in 1620 patients undergoing coronary angioplasty. *Arch Intern Med.* 162(3):329-336.
- Namasivayam S, Kalra MK, Torres WE, Small WC. (2006) Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: an update. *Curr Probl Diagn Radiol.* 35:164-169.
- Newhouse JH, Kho D, Rao QA, Starren J. (2008) Frequency of serum creatinine changes in the absence of iodinated contrast material: implications for studies of contrast nephrotoxicity. *AJR Am J Roentgenol.* 191:376-382.
- Pahade JK, LeBedis CA, Raptopoulos VD, Avigan DE, Yam CS, Kruskal JB, Pedrosa I. (2011) Incidence of contrast-induced nephropathy in patients with multiple myeloma undergoing contrast-enhanced CT. *AJR Am J Roentgenol.* 196:1094-1101.
- Parfrey PS, Griffiths SM, Barrett BJ, Paul MD, Genge M, Withers J, Farid N, McManamon PJ. (1989) Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. A prospective controlled study. *N Engl J Med.* 320:143-149.
- Pasternak JJ, Williamson EE. (2012) Clinical pharmacology, uses, and adverse reactions of iodinated contrast agents: A primer for the non-radiologist. *Mayo Clin Proc.* 87:390-402.
- Pflueger A, Larson TS, Nath KA, King BF, Gross JM, Knox FG. (2000) Role of adenosine in contrast media-induced acute renal failure in diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc.* 75:1275.
- Ridley LJ. (1998) Allergic reactions to oral iodinated contrast agents: reactions to oral contrast. *Australas Radiol.* 42(2):114-117.
- Rihal CS, Textor SC, Grill DE, Berger PB, Ting HH, Best PJ, Singh M, Bell MR, Barsness GW, Mathew V, Garratt KN, Holmes DR. (2002) Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 105: 2259-64
- Ring J, Simon RA, Arroyave CM. (1978) Increased in vitro histamine release by radiographic contrast media in patients with history of incompatibility. *Clin Exp Immunol.* 34:302.
- Rosati G, Leto di Priolo S, Tirone P. (1992) Serious or fatal complications after inadvertent administration of ionic water-soluble contrast media in myelography. *Eur J Radiol.* 15(2):95-100.
- Russo D, Minutolo R, Cianciaruso B, Memoli B, Conte G, De Nicola L. (1995) Early effects of contrast media on renal hemodynamics and tubular function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 6:1451.
- Savill JS, Barrie R, Ghosh S, Muhlemann M, Dawson P, Pusey CD. (1988) Fatal Stevens-Johnson syndrome following urography with iopamidol in systemic lupus erythematosus. *Postgrad Med J.* 64(751):392-394.
- Schwab SJ, Hlatky MA, Pieper KS, Davidson CJ, Morris KG, Skelton TN, Bashore TM. (1989) Contrast nephrotoxicity: a randomized controlled trial of a nonionic and an ionic radiographic contrast agent. *N Engl J Med.* 320:149-153.
- Shehadi WH. (1985) Death following intravascular administration of contrast media. *Acta Radiol Diagn (Stockh).* 26(4):457-461.
- Shulman KL, Thompson JA, Benyunes MC, Winter TC, Fefer A. (1993) Adverse reactions to intravenous contrast media in patients treated with interleukin-2. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 13(3):208-212.
- Simon RA, Schatz M, Stevenson DD, Curry N, Yamamoto F, Plow E, Ring J, Arroyave C. (1979) Radiographic contrast media infusions. Measurement of histamine, complement, and fibrin split products and correlation with clinical parameters. *J Allergy Clin Immunol* 63:281.
- Simons FE, Arduzzo LR, Bilò MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY. (2011) World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):587-593.
- Solomon R, Werner C, Mann D, D'Elia J, Silva P. (1994) Effects of saline, mannitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med.* 331:1416-1420.
- Stenstrom DA, Muldoon LL, Armijo-Medina H, Watnick S, Doolittle ND, Kaufman JA, Peterson DR, Bubalo J, Neuwelt EA. (2008) N-acetylcysteine use to prevent contrast medium-induced nephropathy: premature phase III trials. *J Vasc Interv Radiol* 19:309-318.
- Sutton AG, Finn P, Grech ED, Hall JA, Stewart MJ, Davies A, de Belder MA. (2001) Early and late reactions after the use of iopamidol 340, ioxaglate 320, and iodixanol 320 in cardiac catheterization. *Am Heart J.* 141(4):677-683.
- Szebeni J. (2005) Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology* 216:106.
- Szebeni J. (2004) Hypersensitivity reactions to radiocontrast media: the role of complement activation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 4:25.
- Thomsen HS, Morcos SK. (2003) Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guidelines. *Br J Radiol.* 76(908):513-518.
- Thomsen HS, Morcos SK. (2000) Radiographic contrast media. *BJU Int.* 86(suppl 1):1-10.
- Tramer MR, von Elm E, Loubeyre P, Hauser C. (2006) Pharmacological prevention of serious anaphylactic reactions due to iodinated contrast media: systematic review. *Bmj.* 333:675.
- Trcka J, Schmidt C, Seitz CS, Bröcker EB, Gross GE, Trautmann A. (2008) Anaphylaxis to iodinated contrast material: nonallergic hypersensitivity or IgE-mediated allergy? *AJR Am J Roentgenol.* 190:666.
- Trivedi H, Foley WD. (2010) Contrast-induced nephropathy after a second contrast exposure. *Ren Fail.* 32:796-801.
- Vaitkus PT, Brar C. (2007) N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy: publication bias perpetuated by meta-analyses. *Am Heart J.* 153:275-280.
- Vervloet D, Durham S. (1998) Adverse reactions to drugs. *BMJ.* 316(7143):1511-1514.
- Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. (1993) Dopamine and renal blood flow in radiocontrast-induced nephropathy in humans. *Ren Fail.* 15(1):61-68.
- Wood BP, Lane AT, Rabinowitz R. (1988) Cutaneous reaction to contrast material. *Radiology.* 169(3):739-740.
- Zir LM, Carvalho AC, Hawthorne JW, Colman RW, Lees RS. (1974) Effect of contrast agents on platelet aggregation and 14C-serotonin release. *N Engl J Med.* 291:134.

ABSTRACT

After years of increasing usage of iodate contrast agents in everyday diagnostic and therapeutic radiology practice these agents have become key elements for nowadays imaging services workflow. Even though most iodinated contrast agents have improved their safety significantly still the risk for adverse reactions has not been eliminated completely. Four different molecular configurations of iodinate contrast agents have been designed: ionic/no ionic monomer or dimer, each category characterized by different chemical and physical behavior and therefore safety profile. The main known adverse reactions of iodate contrast agents are allergic-like reactions and contrast induced acute kidney injury. Our aim in this literature review is to better describe the known pharmacological features of main iodate contrast agents. We focus our description on the aspects of contrast agents physiopathology, prevention and treatment of main adverse effects. We finally conclude that iodinated contrast media are safe to use in daily practice nevertheless the crucial requirement for an adequate prevention of the known adverse reactions. Therefore, efforts need to be oriented to correctly identify high-risk patients for contrast-induced complications, as we know this is the demonstrated manner to decrease the incidence of adverse reactions to the minimum possible.

Keywords: *Iodinated contrast media, clinical pharmacology, adverse reactions, allergic-like reactions, contrast-induced acute kidney injury.*

Rev. Farmacol. Chile (2014) 7(2) 57-69

Received 06-06-2014; Revised 23-06-2014; Accepted 01-07-2014

INTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

i) Tipos de Manuscritos:

- (a) Investigaciones Originales (Full papers): Trabajos que reportan investigaciones originales realizadas con procedimientos experimentales adecuados y según las guías nacionales e internacionales para el uso de sujetos de experimentación serán revisados para eventual publicación en la revista (ver preparación del manuscrito).
- (b) Comunicaciones Cortas (Short Communications): Reportes científicos originales cuyo tamaño debe ser de 1000 a 4000 palabras como máximo de extensión, incluyendo la leyenda de la figura (no se incluyen las referencias). Estos trabajos solo pueden incluir 1 figura y 1 tabla de resultados. En situaciones especiales se consideraran 2 figuras o 2 tablas. No deben ser usadas más de 15 referencias en el manuscrito
- (c) Revisiones (Reviews): Revisiones sobre temas relevantes de la Farmacología serán solicitados por el Editor en jefe o el comité editorial, a través de invitación escrita. Estas revisiones no requerirán una exhaustiva revisión editorial y serán publicadas en volúmenes temáticos de la Revista de Farmacología de Chile.
- (d) Columnas de Opinión u otras Publicaciones: Columnas de opinión sobre temas de contingencia nacional que involucren políticas públicas de medicamentos, correcto uso de medicamentos por parte de la población o la aparición y/o retirada de medicamentos en el mercado nacional, serán solicitadas por el Editor en jefe o el comité editorial, a través de invitación escrita.

ii) Detalles para el envío de Manuscritos:

El envío de manuscritos a la Revista de Farmacología de Chile para revisión (*Full papers, Short Communications o Reviews*) o solicitudes de columnas de opinión deben ser enviados a los siguientes correos electrónicos (ramon.sotomayor@uv.cl cc: pablo.jara@uv.cl). Se solicita colocar en el asunto del correo electrónico la siguiente frase: [Manuscrito para Rev.Farmacol.Chile](#)

iii) Preparación del Manuscrito:

- * Se recomienda el uso del programa para procesar texto Word de Microsoft Office. Cuando guarde el manuscrito que ha elaborado se solicita que la opción de guardado sea: Guardar como: "Documento de Word 97-2003".
- * El manuscrito debe ser escrito en formato "Times New Roman" tamaño 12, doble espacio y a una columna. Las páginas del manuscrito deben ser enumeradas en el borde inferior derecho con números arábigos.
- * Cualquier figura inserta en el manuscrito debe ser en formato TIFF, JPEG o BMP de alta resolución (600 dpi) y en caso de usar tablas se debe usar la opción insertar tablas de Word. No se recomiendan tablas hechas con la opción de insertar líneas.
- * Fotografías y gráficos a color son aceptadas para la versión digital, sin embargo en la versión impresa de la revista se utilizará la impresión en escala de grises. Además se recomienda verificar la calidad de la figura reduciéndola al tamaño de 1 columna de ancho, es decir 8 cm.
- * La Revista de Farmacología de Chile acepta trabajos en español, sin embargo previa autorización del comité editorial se podrán revisar trabajos en inglés o portugués.

iv) Estructura del Artículo:

iv.1) Investigaciones Originales y Comunicaciones Cortas:

Cada una de las secciones del manuscrito debe ser enumerada con números arábigos y cada subdivisión con la nomenclatura (X.1). No se considera en la enumeración el resumen (abstract).

Primera página:

- Título: El título del trabajo debe ser conciso e informativo. No se recomiendan abreviaciones de palabras en el título. Se debe incluir el título del trabajo en inglés.
- Nombre de los autores y Filiación: Se solicita indicar el nombre de cada autor y su apellido. Se acepta incluir la inicial del segundo nombre, aunque no es obligatorio. Al término de cada apellido se solicita colocar un número arábigo en superíndice que relacionará al autor con su respectiva filiación.
- Autor Correspondiente: Se debe indicar claramente al autor correspondiente del trabajo, incluyendo: Nombre, Dirección Postal, Teléfono, Fax y Correo Electrónico.

Segunda página:

- Resumen (Abstract): La extensión máxima del resumen es de 300 palabras y debe describir claramente el propósito de la investigación, los principales resultados y principal conclusión del trabajo. El resumen debe ser escrito en español e inglés.
- Palabras Claves: Se deben incluir palabras claves que permitan identificar los aspectos más importantes del trabajo. No incluir más de 10 palabras claves. Las palabras claves deben ser escritas en español e inglés.

Tercera y más páginas:

- Introducción: La introducción al tema a discutir en el trabajo no debe tener una extensión superior a las 750 palabras.
- Materiales y Métodos: Se debe detallar claramente todos los materiales y metodologías utilizadas en el desarrollo del trabajo. Además se debe explicitar en consentimiento bioético de la institución donde fue realizada la investigación. Los trabajos realizados en humanos deben incluir el apego experimental a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, considerando consentimiento informado y aprobación de comité de ética.
- Resultados: Se debe incluir en detalle los principales resultados obtenidos, con sus respectivos análisis estadísticos. No se aceptarán trabajos para publicar que no tengan un adecuado tratamiento estadístico. La expresión gráfica de resultados puede ser realizada a través

de gráficos de 1 columna de ancho (8 cm) o agrupaciones de gráficos con un ancho máximo de dos columnas (16 cm). También se pueden incluir tablas que detallen resultados relevantes para el trabajo, incluyendo número de casos y valor de la significancia *p*.

- **Discusión de los Resultados:** La discusión de resultados debe ser objetiva y se debe evitar una excesiva discusión bibliográfica que reste valor a los resultados presentados en el manuscrito. Es recomendado una conclusión final que indique las proyecciones de la investigación.
- **Agradecimientos:** Se pueden incluir las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo del trabajo, indicando claramente a que autor corresponde la fuente de financiamiento. También se pueden incluir agradecimientos a personas que prestaron ayuda técnica o de revisión del manuscrito. En esta sección se debe declarar si existió conflicto de interés. En caso de no haber conflicto de interés se debe mencionar esta situación. Se recomienda consultar la siguiente dirección URL <http://zl.elsevier.es/es/revista/neurologia-295/conflicto-intereses-publicaciones-cientificas-90101004-editorial-2012> para aclarar en concepto y situaciones de conflicto de interés.
- **Referencias:** En el texto se deben citar las referencias con el apellido del primer autor, sus iniciales y el año de la publicación. En la sección de referencias se deben ordenar las mismas por orden alfabético. Se recomienda utilizar algún programa de manejo de referencias como EndNote con el formato de referencias de Journal of Neurochemistry.

Ejemplos:

Semenova M. M., Maki-Hokkonen A. M., Cao J., Komarovski V., Forsberg K. M., Koistinaho M., Coffey E. T. and Courtney M. J. (2007) Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat. Neurosci.* 10, 436-443.

La abreviación de los títulos de las revistas debe de acuerdo a el listado de revistas indexadas en *Index Medicus* (Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC 20402, USA, DHEW Publication No. 95-267). Ejemplo: *Acta Neurol. Scand. Acta Physiol. Scand. Anal. Biochem. Arch. Biochem. Biophys. Biochem. J. Biochem. Pharmacol. Biochim. Biophys. Acta Biol. Chem. Hoppe Seyler Br. J. Pharmacol. Eur. J. Pharmacol. Experientia J. Biol. Chem. J. Cell Biol. J. Mol. Biol. J. Pharmacol. Exp. Ther. J. Physiol. (Lond.) Mol. Pharmacol. Nature Proc. Natl Acad. Sci. USA Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Science*

iv.2) **Revisiones:**

Las revisiones de unidades temáticas serán solicitadas por el editor en jefe o por el co-editor, sin embargo para aquellas unidades temáticas específicas oficiara como co-editor algún miembro del comité editorial que sea especialista en el tema

Primera página:

- **Título:** El título del trabajo debe ser conciso e informativo. No se recomiendan abreviaciones de palabras en el título. Se debe incluir el título del trabajo en inglés.
- **Nombre de los autores y Filiación:** Se solicita indicar el nombre de cada autor y su apellido. Se acepta incluir la inicial del segundo nombre, aunque no es obligatorio. Al término de cada apellido se solicita colocar un número arábigo en superíndice que relacionará al autor con su respectiva filiación.
- **Autor Correspondiente:** Se debe indicar claramente al autor correspondiente del trabajo, incluyendo: Nombre, Dirección Postal, Teléfono, Fax y Correo Electrónico.

Segunda página:

- **Resumen (Abstract):** La extensión máxima del resumen es de 300 palabras y debe describir claramente el propósito de la investigación, los principales resultados y principal conclusión del trabajo.
- **Palabras Claves:** Se deben incluir palabras claves que permitan identificar los aspectos más importantes del trabajo. No incluir más de 10 palabras claves.

Tercera y más páginas:

- **Introducción:** La introducción al tema a discutir en el trabajo no debe tener una extensión superior a las 750 palabras.
- **Temas a Desarrollar:** Por cada tema que se pretenda desarrollar se debe entregar una visión objetiva que destaque los avances más importantes en la investigación científica. Se pueden desarrollar subtemas, destacando claramente a que unidad temática corresponde. Se recomienda si se revisa algún procedimiento experimental mencionar las ventajas y desventajas de su aplicación. Es recomendado una conclusión final que integre la información entregada en la revisión.
- **Agradecimientos:** Se pueden incluir las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo del trabajo, indicando claramente a que autor corresponde la fuente de financiamiento. También se pueden incluir agradecimientos a personas que prestaron ayuda técnica o de revisión del manuscrito. En esta sección se debe declarar si existió conflicto de interés. En caso de no haber conflicto de interés se debe mencionar esta situación. Se recomienda consultar la siguiente dirección URL <http://zl.elsevier.es/es/revista/neurologia-295/conflicto-intereses-publicaciones-cientificas-90101004-editorial-2012> para aclarar en concepto y situaciones de conflicto de interés.
- **Referencias:** En el texto se deben citar las referencias con el apellido del primer autor, sus iniciales y el año de la publicación. En la sección de referencias se deben ordenar las mismas por orden alfabético. Se recomienda utilizar algún programa de manejo de referencias como EndNote con el formato de referencias de Journal of Neurochemistry.

Ejemplos:

Semenova M. M., Maki-Hokkonen A. M., Cao J., Komarovski V., Forsberg K. M., Koistinaho M., Coffey E. T. and Courtney M. J. (2007) Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat. Neurosci.* 10, 436-443.

La abreviación de los títulos de las revistas debe de acuerdo a el listado de revistas indexadas en *Index Medicus* (Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC 20402, USA, DHEW Publication No. 95-267). Ejemplo: *Acta Neurol. Scand.*

Acta Physiol. Scand. Anal. Biochem. Arch. Biochem. Biophys. Biochem. J. Biochem. Pharmacol. Biochim. Biophys. Acta Biol. Chem. Hoppe Seyler Br. J. Pharmacol. Eur. J. Pharmacol. Experientia J. Biol. Chem. J. Cell Biol. J. Mol. Biol. J. Pharmacol. Exp. Ther. J. Physiol. (Lond.) Mol. Pharmacol. Nature Proc. Natl Acad. Sci. USA Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Science

Leyendas para las Figuras

Los títulos y leyendas de las Figuras deben presentarse en forma clara y corta. Se debe identificar y explicar todo símbolo, como flecha, número o letra que haya empleado para señalar alguna parte de las ilustraciones. En la reproducción de preparaciones microscópicas, explícite la ampliación y los métodos de tinción empleados.

Unidades de Medida y Nomenclaturas.

Use unidades correspondientes al sistema métrico decimal. Las abreviaturas deben ser definidas la primera vez que aparecen en el texto. El listado de abreviaturas debe ser de acuerdo a la siguiente publicación Biochem. J. (1978) 169, 1-27. Al finalizar este instructivo se mencionan las abreviaturas que no deberían ser definidas (el listado esta en idioma inglés).

La nomenclatura que se refiere a drogas y sustancias químicas no terapéuticas deben nombrarse de acuerdo a la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Mientras que para fármacos solo se acepta el nombre genérico INN (DCI). Respecto a los nombres de fantasía solo pueden ser nombrados entre paréntesis con el signo ® siempre que esté registrada la patente y que no exista un conflicto de interés evidente con el laboratorio fabricante del fármaco.

Publicación de Artículos:

- Los artículos originales de investigación o de revisión serán evaluados por un comité especializado. Sin embargo para aquellos trabajos de revisión agrupados por unidades temáticas específicas, el editor en jefe de la revista y el co-editor del número, antes de aceptar los manuscritos revisarán que se cumplan a cabalidad las instrucciones antes detalladas.
- Los artículos originales de investigación que no se agrupen en unidades temáticas específicas y que sean aceptados para publicación, serán publicados en el volumen y número del congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. La fecha aproximada de publicación será comunicada a los autores con suficiente antelación.
- Respecto a la revisión de artículos originales los revisores enviarán al Editor en Jefe, los cambios propuestos, sus opiniones, sus proposiciones, rechazos, etcétera, las cuales serán comunicadas a los autores con absoluta confidencia.
- Las publicaciones de artículos originales tendrán un costo de UF 0,3 por página que servirán para la manutención de la Revista.

Abreviaciones Permitidas:

ADP, CDP, GDP, IDP, UDP, 5(pyro)-diphosphates of adenosine, cytidine, guanosine, inosine, and uridine AMP, etc.-5-phosphates of adenosine, etc. ANOVA, analysis of variance ATP, etc.-5` (pyro)-triphosphates of adenosine, etc. ATPase, adenosine triphosphatase bp, base pair Ci, curie CoA and acyl-CoA-coenzyme A and its acyl derivatives (e.g., acetyl-CoA) cpm, counts per minute CNS, central nervous systemCSF, cerebrospinal fluid Cyclic AMP, 3,5-cyclic adenosine monophosphate Cyclic GMP-3,5-cyclic guanosine monophosphate DNA, deoxyribonucleic acid DNase, deoxyribonuclease DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine dpm, dps-disintegrations per minute, disintegrations per second EDTA, ethylene-diaminetetraacetate EEG, electroencephalogramEGTA, ethyleneglycol bis(aminoethylether)tetraacetate ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay FAD, FADH2, flavin-adenine dinucleotide and its reduced form FMN, flavin mononucleotide g, average gravity GABA, gamma-aminobutyric acid (not Gaba) GLC, gas-liquid chromatography GSSG, GSH, glutathione, oxidized and reduced forms h, hour HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid HPLC, high performance liquid chromatography Ig, immunoglobulin IR, infrared kb, kilobase kDa, kilodalton ìm, micron min, minute MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridinium MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine NAD+, NADH-oxidized and reduced forms of nicotin-amide-adenine dinucleotide NADP+, NADPH-oxidized and reduced forms of nicotin-amide-adenine dinucleotide phosphate NAD, NADP may be used when the oxidation state need not be indicated NMDA, N-methyl-D-aspartate NMN, nicotinamide mononucleotide NMR, nuclear magnetic resonance PCR, polymerase chain reaction Pi, orthophosphate (inorganic) PNS, peripheral nervous system PPI, pyrophosphate (inorganic) rpm, revolutions per minute RNA, ribonucleic acid RNase, ribonuclease RT, reverse transcription s, second SEM, standard error of mean SD, standard deviation TLC, thin-layer chromatography Tris, 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol UV, ultraviolet