

VECTORES CON DOXICICLINA: APLICACIÓN A LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS EN EL HÍGADO

María Santodomingo Pereira⁽¹⁾, Noelia Ruz Expósito⁽²⁾, Miguel A. Campanero, M^a Jesús Renedo Omaechevarría⁽²⁾, María J. Blanco Prieto⁽²⁾

⁽¹⁾ Especialización en Farmacia Industrial y Galénica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España.

⁽²⁾ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España.

Introducción

La Doxiciclina (Dox) es un antibiótico semisintético derivado de la oxitetraciclina, comúnmente utilizado frente a numerosos patógenos intracelulares y extracelulares. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas impidiendo el desarrollo bacteriano (1).

Otra aplicación reciente de la Dox es en el control de la expresión de genes. La Dox puede activar promotores (sistemas tet on/off) que limitan la expresión de un gen concreto, como el gen de la interleukina-12 (IL-12). Esta regulación depende de la dosis de Dox administrada. En la expresión génica regulada por el sistema tet en el hígado, es importante dirigir la Dox a las células hepáticas para evitar los efectos adversos en otros órganos relacionados con la administración de este fármaco por vía oral.

Los más frecuentes son las manifestaciones digestivas por la administración oral como náuseas, vómitos, diarreas, quemazón, cólicos abdominales, gastritis, enterocolitis y ulceraciones esofágicas. También poseen toxicidad a nivel óseo y dentario y son frecuentes las reacciones de fotosensibilidad (hiperpigmentación, eritemas, etc.) Finalmente, también puede aparecer tanto en niños como en adultos el llamado pseudotumor cerebral o hipertensión endocraneana benigna, caracterizada por cefalea, vómitos y edema papilar (2, 3).

En este estudio, se desarrollaron nuevas formulaciones con el fin de vectorizar el fármaco hacia el hígado, disminuyendo así los efectos adversos en otros órganos y conseguir una

liberación controlada del mismo que permita reducir la frecuencia de las administraciones.

El estudio conlleva el diseño, desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro*, de liposomas y nanopartículas biodegradables de Dox, utilizando copolímeros del ácido láctico y glicólico (PLGA), en el caso de los vectores poliméricos. Las nanopartículas fueron preparadas por el método de evaporación del disolvente en emulsión simple (O/A) y múltiple (A₁/O/A₂) mientras que los liposomas fueron preparados por el método de hidratación-extrusión.

Materiales y Métodos

La preparación de las nanopartículas de Dox se ha realizado por el método de evaporación del disolvente, tras la formación de una emulsión simple o de una emulsión múltiple. Para la emulsión simple, diferentes cantidades de Dox se dispersaron en una solución de acetato de etilo que contenía el polímero empleado en cada caso. La mezcla se añadió a una solución acuosa de polivinilalcohol (PVA) al 1%, y se homogeneizó con una sonda de ultrasonidos durante 1 minuto, permitiendo de este modo la formación de la emulsión (O/A). Posteriormente, la emulsión se añadió a una solución de PVA (0,2%) y se mantuvo en agitación durante tres horas para conseguir la evaporación del disolvente orgánico y la formación de las nanopartículas. Para la emulsión múltiple, diferentes cantidades de Dox se disolvieron en una solución de PVA (0,5%). La solución del fármaco se añadió a una solución de acetato de etilo conteniendo el polímero empleado y se homogeneizó con una sonda de ultrasonidos durante 1 minuto. A continuación, esta mezcla se

añadió sobre una disolución acuosa de PVA (1%) y se homogeneizó nuevamente por sonicación durante 1 minuto obteniéndose la emulsión A₁/O. Posteriormente, la emulsión se añadió a una solución de PVA (0,2%) obteniéndose la emulsión A₁/O/A₂ y se mantuvo en agitación durante tres horas para conseguir, al igual que en la emulsión simple, la evaporación del disolvente orgánico y la formación de las nanopartículas. Transcurrido este tiempo, en ambos casos las nanopartículas se recogieron mediante centrifugación y sucesivos lavados con agua destilada. Por último, éstas se liofilizaron y conservaron a 4°C. En este trabajo se han preparado diferentes formulaciones de nanopartículas. La diferencia entre ellas radica en el polímero utilizado y en el método de preparación (emulsión simple o múltiple).

Los liposomas se prepararon por el método de hidratación-extrusión. Para ello, se disolvieron los lípidos, fosfatidilcolina:colesterol (1:1) en una solución de cloroformo:metanol (9:1). Se añadió la Dox disuelta en tampón Hepes. Tras agitar en vórtex 30 segundos, se sonicó en baño hasta la formación de una suspensión lechosa. A continuación, se evaporó la fase orgánica mediante rotavapor. La película formada se hidrató con Hepes y se homogeneizó. El fármaco no encapsulado se eliminó mediante centrifugación y sucesivos lavados con Hepes. Con el fin de obtener liposomas homogéneos de menor tamaño, la emulsión lipídica se sometió a extrusión a través de una membrana de 200 nm. La caracterización de los vectores ha conllevado diversos estudios, que se describen a continuación. Dentro de los estudios fisicoquímicos, la caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido y la carga superficial de los vectores se determinó mediante la medida del potencial zeta. Este parámetro, al igual que el tamaño de partícula, fue obtenido por espectroscopía de correlación fotónica, utilizando un Nanosizer®.

Otro estudio ha sido el de eficiencia de encapsulación. En ellos, la cuantificación de la Dox encapsulada en las diferentes formulaciones, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

(4), utilizando 2 técnicas de extracción del fármaco desde las nanopartículas. En el primer caso, las nanopartículas se disolvieron en cloroformo, permitiéndose de esta forma romper las mismas. Posteriormente, el polímero se precipitó mediante la adición de metanol y una vez centrifugadas las muestras, una alícuota del sobrenadante se analizó mediante HPLC. En el segundo caso, las nanopartículas se mantuvieron en agitación con NaOH 0,1N durante 8 h y una vez centrifugadas las muestras, una alícuota del sobrenadante se analizó mediante HPLC. La cantidad de fármaco encapsulado en los liposomas se cuantificó como la diferencia entre el fármaco total (obtenido por lisis de los liposomas con Tritón X-100, 10 minutos, 100°C) y el fármaco libre (filtración 0,20 µm) analizado también mediante HPLC.

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron dispersando 10 mg de nanopartículas, previamente liofilizadas, en 1 mL de PBS (pH 7,4) que contenía 0,02% de azida sódica, como agente bacteriostático. Las muestras se mantuvieron bajo agitación a 37°C y a diferentes tiempos la Dox liberada fue analizada mediante HPLC.

Resultados y Discusión

La caracterización morfológica (Figura 1) permitió comprobar cómo las nanopartículas de Dox preparadas por emulsión simple o múltiple (con PVA 0,5%, Pluronic 3% o Ovoalbúmina 2% como estabilizador de la fase interna) eran esféricas y similares entre sí. Se muestran los resultados obtenidos para nanopartículas de PLGA 502H cargadas con 10 mg de Dox obtenidas por emulsión múltiple con OVA 2%.

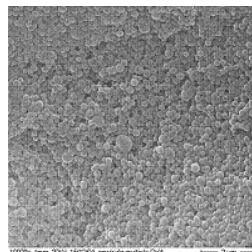


Figura 1. Fotografía de nanopartículas obtenidas por emulsión múltiple con OVA.

Las propiedades físico-químicas de las nanopartículas se muestran en las siguientes

figuras. De este modo el tamaño de todas las formulaciones fue similar con todos los polímeros empleados (Figura 2), y es independiente del método de preparación (Figura 3). Para los liposomas, se observa que la menor polidispersión se obtiene con los de menor carga nominal (Figura 4).

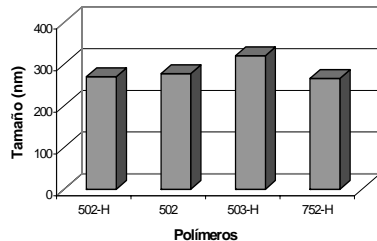


Figura 2. Tamaños medios de distintas formulaciones de Doxiciclina según el polímero empleado.

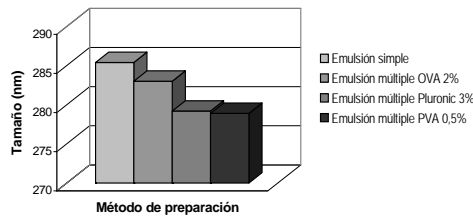


Figura 3. Tamaños medios de distintas formulaciones de Doxiciclina según el método de preparación.

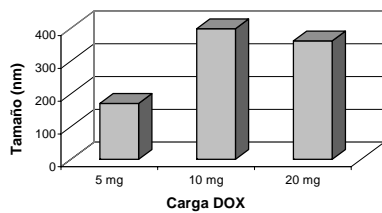


Figura 4. Tamaños medios de los liposomas.

En las Figuras 5 y 6, se muestra la eficacia de encapsulación de las distintas formulaciones en función del método de extracción y del estabilizador empleado en la fase interna, respectivamente.

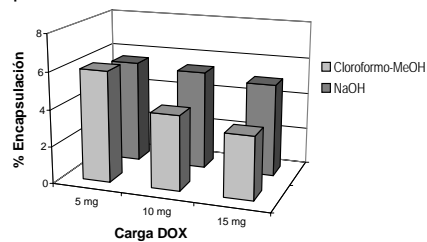


Figura 5. Eficacia de encapsulación según el método de extracción.

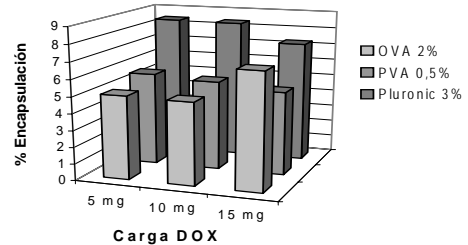


Figura 6. Eficacia de encapsulación según el estabilizador de la emulsión interna.

Se comprueba de este modo cómo el NaOH 0,1 N extrae mejor la Dox de las nanopartículas, observándose así mismo, una disminución de la eficacia de encapsulación al aumentar la carga nominal de antibiótico. Por otro lado, la eficacia de encapsulación mejora significativamente con la utilización de Pluronic 3% como estabilizador de la emulsión interna.

En relación a la carga superficial de las nanopartículas (Tablas 1 y 2), las partículas vacías presentan, en general, un valor más negativo de potencial lo que sugiere que parte de la Dox podría estar localizada en la superficie, lo cual explicaría el burst obtenido en las cinéticas de liberación. En el caso de los liposomas, todas las formulaciones presentan carga neta negativa (Tabla 3).

Tabla 1. Influencia del polímero en el potencial zeta.

Polímero	Carga Nominal (mg Dox)	ζ potencial (mV)
PLGA 502H	-	-11,6 ± 0,9
	10	-8,3 ± 3,5
	20	-10,5 ± 1,0
	30	-10,9 ± 1,2
PLGA 502	-	-18,2 ± 1,1
	10	-8,2 ± 1,0
	20	-5,9 ± 2,9
	30	-7,7 ± 1,0
PLGA 503H	-	-12,7 ± 1,3
	10	-9,4 ± 0,5
	20	-6,4 ± 0,9
	30	-6,6 ± 0,3
PLGA 752H	-	N.D.
	10	-7,8 ± 0,5
	20	-7,7 ± 0,5
	30	-4,7 ± 1,7

Tabla 2. Influencia del método de preparación en el potencial zeta de nanopartículas cargadas con 10 mg de Dox, con el polímero PLGA 502H

Método de preparación	ζ potencial (mV)
Emulsión simple	$-8,3 \pm 3,5$
E. múltiple PVA 0,5%	$-9,2 \pm 1,0$
E. múltiple Pluronic 3%	$-11,9 \pm 0,5$
E. múltiple OVA 2%	$-6,8 \pm 0,3$

Tabla 3. Potencial zeta de liposomas.

Carga Nominal (mg Dox)	ζ potencial (mV)
5	-32,477
10	-44,647
20	-40,837

Los estudios de liberación *in vitro* de las nanopartículas cargadas con Dox, utilizando el polímero PLGA 502H, son mostrados en la Figura 7.

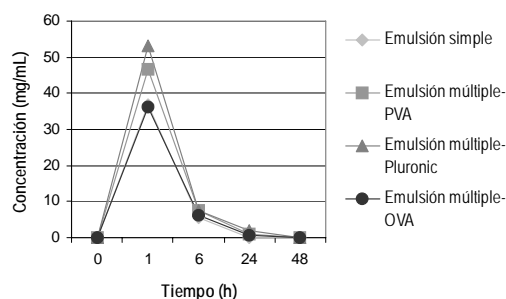


Figura 7. Cinéticas de liberación *in vitro* de nanopartículas cargadas con 10 mg de Dox, utilizando el polímero PLGA 502H

El perfil de liberación se caracteriza por una liberación inicial rápida (efecto burst) de la Dox. La totalidad de fármaco es liberada al cabo de 48 horas. Además, se comprueba cómo la Dox liberada se mantiene intacta, ya que con el método cromatográfico empleado, no se detectaron productos de degradación en el medio.

Como conclusión, hemos preparado vectores poliméricos y lipídicos conteniendo Dox para su aplicación en la regulación de la expresión de genes en el hígado. Las nanopartículas formuladas se caracterizan por encapsular

mayores cantidades de Dox que los liposomas. Actualmente, se están optimizando las formulaciones para mejorar tanto la encapsulación como los perfiles de liberación del fármaco antes de pasar a los estudios en animales.

Bibliografía

- Flórez, J. Armijo, J.A. Mediavilla, A. Farmacología humana 1997, Ediciones Masson, Barcelona, España.
- Lefort, A. Med Clin Nort Am; 84(6):1471(2000).
- Panadidi, F. Med Clin Nort Am; 85(1):1(2001).
- Ruz, N., Zabala, M., Kramer, M.G., Campanero, M.A., Dios, M.C., Blanco-Prieto, M.J. J Chromatog. A; 1031, 295 (2004).

Autor de contacto

Nombre y apellidos: María J. Blanco Prieto

e-mail mjblanco@unav.es

Institución Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. U. Navarra

Dirección Irunlarrea s.n

Ciudad Pamplona

Tel.: 948425600 Ext 6519

Fax: 948425649