

PRODUCCION DE “CARRIERS” BIOCAMPATIBLES PARA APLICACIONES EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

A:D. OLIVERA†, M. LOPRETTI†, F. BARREIRO‡

† Facultad de Ciencias, Universidad de la República; LATU, Montevideo - Uruguay.

‡ LSRE, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia Ap 1134, 5301-857 Bragança
alvarobq@fcien.edu.uy; mlopretti@gmail.com; barreiro@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

El quitosano, β -1-4 2-amino-2-deoxi-D-glucosa o D-glucosamina es un polisacárido con excelentes propiedades biológicas. La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso y es motivo de su actividad biocida (Lárez Velásquez, 2008). Este polímero biocompatible y biodegradable encuentra diversas aplicaciones en el área biomédica como vehículo para la entrega y descarga controlada de fármacos (Kato et al., 2003). Estos sistemas son utilizados para distribuir o transportar drogas dentro del organismo, orientados a un órgano, tejido, o grupo de células, permitiendo programar un perfil de descarga del componente microencapsulado, mientras llevan “a salvo” el agente terapéutico para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Pueden cargar varios componentes activos, beneficiando la distribución, la retención en el organismo, o incrementando la eficacia del tratamiento mientras suprimen los mecanismos sistémicos o celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica de la droga. La presencia de grupos amino facilita la unión de distintos componentes permitiendo la funcionalización de los microvehículos.

La adaptación de esta tecnología a la administración de ácidos nucleicos, tiene la capacidad de superar las barreras extracelulares que limitan la terapia génica. La descarga controlada puede mantener concentraciones elevadas de ADN en el microambiente celular, incrementando así la efectividad del tratamiento. Aunque los vectores virales son utilizados para estos fines, existen riesgos concernientes a la seguridad en su empleo, ejemplos de esto son la recombinación aleatoria y la inducción de una respuesta inmune, encontrando trabas frente a las normas que rigen su utilización en la industria farmacéutica. Si bien existen otros vectores no virales como la poli-L-lisina, tales sistemas descargan su contenido de forma concertada, lo que resulta en períodos cortos de expresión génica y la necesidad de repetir la administración del fármaco (Aral y Akbuga, 2003). Se ha reportado que plásmidos microencapsulados en quitosano, inducen una muy alta actividad proteica en períodos de 12 semanas post transfección (Kato et al., 2003).

El objetivo de este trabajo se centró en estudiar la compatibilidad y el comportamiento de proteínas y ADN con este tipo de matriz, con la meta de lograr la inserción de estos sistemas en el sector productivo. La metodología y técnicas de análisis empleadas, nos permitieron estudiar la distribución del componente microencapsulado en el volumen completo de estos sistemas, calcular el porcentaje de liberación y determinar la cinética de descarga.

METODOLOGIA

En este trabajo se puso a punto la técnica de entrecruzamiento con glutaraldehído reportada por Thanoo, et al. (1992) (en: Dhawan et al., 2004) con algunas modificaciones. La misma se basa en la formación de una emulsión agua en aceite con la posterior adición de un agente entrecruzante que coagula las microgotas formadas por la fase dispersada. Se microencapsuló seroalbúmina bovina (BSA) (SIGMA), BSA-FITC (BSA-isotiocianato de fluoresceína) y ADN de timo de vaca (GE Healthcare) como prototipos. Para la fabricación de microesferas cargadas con BSA-FITC se cambió el agente entrecruzante por paraformaldehído al 30%, debido a la autofluorescencia que presenta el glutaraldehído.

Los microvehículos obtenidos se evaluaron por distintos métodos:

- a) espectrofotometría: determinación del rendimiento de microencapsulación, ensayos de liberación y permanencia.
- b) microscopía de barrido confocal láser (CLSM): para visualizar la distribución de carga de una proteína reportera fluorescente dentro de los microvehículos
- c) citometría de flujo: conteo y separación por poblaciones de distinto tamaño.
- d) microscopía electrónica de transmisión (TEM): análisis ultraestructural de la configuración interna del polímero y su carga.
- e) microscopía electrónica de barrido (SEM) de alta resolución: observación de las características topográficas de las microesferas en su interior y superficie

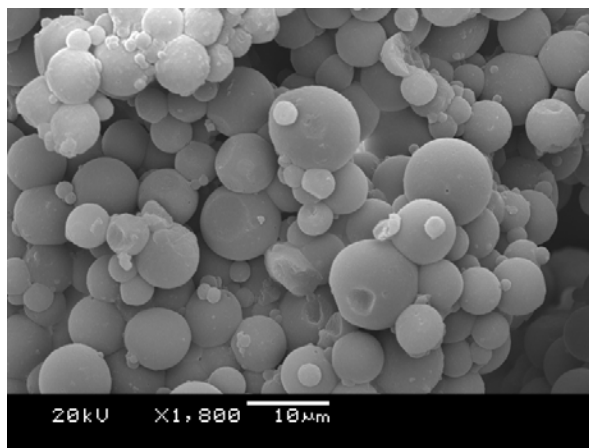


Fig. 1. Micrografía SEM mostrando microesferas de quitosano cargadas con ADN.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron microesferas entre 1y 20 micras de diámetro (Fig. 1), destacando una población del 45% entre las 6 y 12 micras según los datos aportados por la citometría de flujo. La microscopía confocal permitió determinar que el componente microencapsulado se distribuye de manera homogénea en todo el volumen de la matriz polimérica. Los ensayos de liberación y datos cinéticos (Fig. 2 y 3) sobre una producción de 50.0 mg de microesferas cargadas para cada componente, muestran una buena eficiencia de incorporación de los materiales prototipo así como la liberación de casi la totalidad de los mismos en un período analizado durante 30 días (no se muestran datos), presentando diferentes velocidades de descarga para el ADN y la proteína.

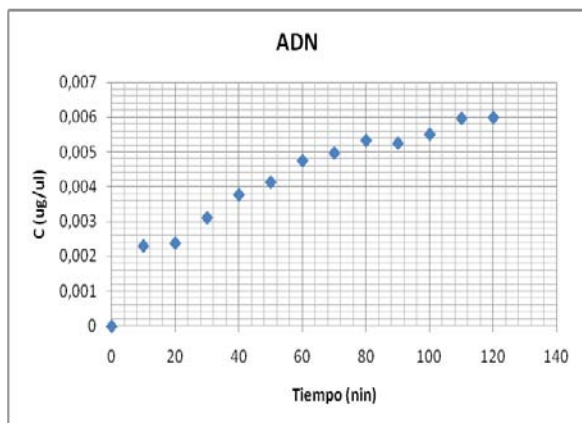


Fig. 2. Perfil de liberación del ADN microencapsulado

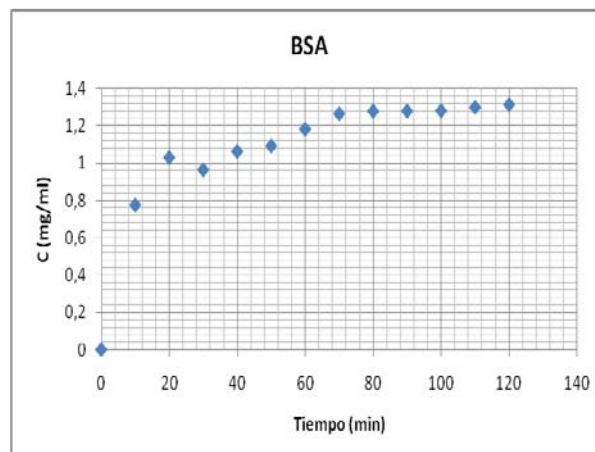


Fig. 3. Perfil de liberación de la BSA microencapsulada

CONCLUSIONES

Se mostró que estos sistemas son compatibles con compuestos de interés en tratamientos médicos. El empleo de un polímero con actividad germicida incrementa la protección de los bioactivos. Las características de retención de estas matrices, permiten obtener nuevamente en forma libre, todo el agente microencapsulado, posibilitando así la programación de dosis de acción terapéutica. La conjunción de estas propiedades viabilizan su desarrollo y aplicación en la industria farmacéutica.

REFERENCIAS

- Cenk Aral, Julide Akbuga, Preparation and *in vitro* transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA:poly(L-lysine) complexes. J. Pharm Pharmaceut Sci 6,(3) 321-326(2003).
- Cristóbal Lárez Velásquez, Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. UDO Agrícola 8, (1) 1-22(2008).
- Sanju Dhawan, Anil Kumar Singla, Vivek Ranjan Sinha, Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. AAPS PharmSciTech 5, (4) Article 67(2004).
- Yoshinori Kato, Hiraku Onishi, Yoshiharu Machida, Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. Current Pharmaceutical Biotechnology 4, 303-309(2003).