



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

Tesis doctoral presentada por

Juan José Carreras Martínez

Dirigida por:

Dra. Teresa M^a Garrigues Pelufo

Dra. Ana Melero Zaera

Valencia, 2022



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Teresa M^a Garrigues Pelufo, Doctora en Farmacia, Catedrática de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València y **Ana Melero Zaera**, Doctora en Farmacia, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el Gdo. en Farmacia **Juan José Carreras Martínez**, titulado *“Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias”*, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente. Para que conste, firman el presente documento.

Valencia, diciembre 2022

TERESA
MARIA|
GARRIGUE
S|PELUFO

Firmado
digitalmente por
TERESA MARIA|
GARRIGUES|
PELUFO
Fecha: 2022.12.22
18:38:28 +01'00'

Dña. M^a Teresa Garrigues Pelufo

ANA|
MELERO
|ZAERA

Firmado
digitalmente por
ANA|MELERO|
ZAERA
Fecha: 2022.12.20
17:48:03 +01'00'

Dña. Ana Melero Zaera

A mi familia

Índice

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE FÁRMACOS	1
1.2 <i>Enfermedades inflamatorias de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica</i>	4
1.3 <i>Tratamientos potenciales e inconvenientes de administración asociados</i>	6
1.4 <i>Administración tópica de fármacos: Retos y posibles soluciones</i>	7
2. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VÍA ORAL	10
2.1 <i>Enfermedad inflamatoria intestinal. Tratamiento y vías de administración</i>	11
2.2 <i>Vía oral y tratamiento local: inconvenientes y retos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias</i>	11
OBJETIVOS GENERALES	15
CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE LIPOSOMAS ULTRAFLEXIBLES DE CICLOSPORINA A PARA ADMINISTRACIÓN TÓPICA	19
RESUMEN	21
I.- ANTECEDENTES	25
1. LA PIEL COMO VÍA DE ABSORCIÓN DE FÁRMACOS	25
1.1. <i>Estructura de la piel</i>	26
a) Epidermis.	27
b) Dermis.....	31
c) Hipodermis.....	32

1.2. Anejos cutáneos	32
1.3. Rutas cutáneas de penetración de fármacos	33
1.4. Difusión transdérmica de fármacos.....	36
2. NANOTECNOLOGÍA APLICADA A LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE FÁRMACOS.....	39
2.1. Liposomas como sistemas promotores de liberación transdérmica.....	39
2.2. Mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración de fármacos.....	43
2.3. Nuevos Sistemas liposomales.....	45
2.3.1. Liposomas ultraflexibles o transfersomas.....	45
2.3.2. Etosomas.....	47
2.4. Preparación de liposomas	49
3. HIDROGELES COMO SISTEMAS FARMACÉUTICOS.....	52
4. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA.....	57
5. ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE FORMULACIONES LIPOSOMALES.....	60
6. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA PIEL	61
6.1 <i>Psoriasis</i>	61
6.2 <i>Dermatitis atópica</i>	64
7. TRATAMIENTOS DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA PIEL.....	66
7.1. <i>Ciclosporina A</i>	66
II.- OBJETIVOS	71
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. MATERIALES	73
1.1. <i>Formulación de sistemas liposomales</i>	73
1.2. <i>Otros materiales químicos y disolventes</i>	75
1.3. <i>Ensayos con piel humana</i>	76
1.4. <i>Ensayos con piel porcina</i>	76
2. METODOLOGÍA.....	78
2.1. <i>Desarrollo y validación del método analítico por HPLC</i>	78
2.1.1 <i>Análisis de las muestras</i>	82
2.2. <i>Sistemas liposomales</i>	83
2.2.1 <i>Formulación de los sistemas liposomales</i>	83

2.2.1.1 Preparación de las MLVs.....	84
2.2.1.2. Reducción de tamaño de las MLVs	85
2.2.2. Caracterización de los sistemas liposomales	87
2.2.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z.....	88
2.2.2.2. Morfología de las vesículas con CyA	88
2.2.2.3. Evaluación de la eficacia de encapsulación (EE%)	89
2.2.2.4. Cuantificación de fosfolípidos.....	90
2.2.2.5. Morfología (Imágenes-TEM)	91
2.2.2.6. Evaluación de la flexibilidad.....	92
2.2.2.7. Estabilidad durante almacenamiento.....	92
2.3. Efecto de la liofilización sobre las formulaciones	93
2.3.1. Determinación de crioprotectores.....	93
2.3.2. Liofilización de las formulaciones	94
2.3.3. Morfología de las formulaciones liofilizadas.....	94
2.4 <i>Estudio de biocompatibilidad: toxicidad de los sistemas liposomales en cultivos celulares</i>	95
2.4.1 Cultivos celulares	95
2.4.2 Ensayos de proliferación y viabilidad celular	95
2.5 <i>Tape-stripping</i>	96
2.5.1 Tape-stripping tradicional	96
2.5.2 Tape-stripping diferencial	98
2.6. <i>Estudios in vitro de liberación y permeabilidad transdérmica de CyA</i>	99
2.7. <i>Hidrogeles liposomales</i>	106
2.7.1 Formulación hidrogeles liposomales	106
2.7.2 Caracterización hidrogeles liposomales.....	106
2.7.2.1 Calculo de la concentración de ciclosporina A.....	106
2.7.2.2 Caracterización reológica.....	107
2.7.3 Estudio de liberación de CyA a partir de las formulaciones de hidrogel liposomal.....	108
2.8. <i>Análisis estadístico</i>	108

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 109

1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC.....	109
2. SISTEMAS LIPOSOMALES	111
2.2. <i>Concentración de Ciclosporina A en las suspensiones liposomales</i>	111

2.3. Caracterización de los sistemas liposomales.....	112
2.3.1. Determinación de tamaño de partícula (diámetro medio) y PDI.....	112
2.3.2. Determinación del potencial Z.....	116
2.3.3. Morfología de las vesículas liposomales.....	118
2.3.4. Eficacia de encapsulación y cuantificación de fosfolípido.....	120
2.3.5. Resumen de caracterización.....	121
2.4. Flexibilidad.....	122
2.5. Estudio de estabilidad de las formulaciones liposomales.....	123
2.6. Efecto de la liofilización sobre las formulaciones.....	127
2.6.1. Morfología de las vesículas liposomales tras de la liofilización.....	129
2.7. Estudio de biocompatibilidad: toxicidad de los sistemas liposomales en cultivos celulares.....	131
2.8. Tape-stripping.....	134
2.8.1. Tape-stripping diferencial.....	134
2.9. Estudio in vitro de permeabilidad, a través de piel separada por calor ...	137
3. FORMULACIÓN LIPOSOMAL EN HIDROGELES.....	144
3.1 Formulación hidrogeles liposomales.....	144
3.2 Caracterización reológica de los hidrogeles liposomales.....	144
3.3 Estudio de liberación de CyA a partir de formulaciones hidrogel liposomal.....	152
4. RESUMEN E IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE CAPÍTULO.....	154
V.- CONCLUSIONES.....	159

CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS Y MICROPARTÍCULAS DE PLGA CON CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	163
RESUMEN.....	165
I.- ANTECEDENTES.....	169
1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	169
Signos y síntomas.....	170

1.1	<i>Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa</i>	171
a)	Colitis ulcerosa	172
b)	Enfermedad de Crohn	174
1.2	<i>Fármacos utilizados en el tratamiento de la EII</i>	178
CICLOSPORINA	181
2.	NANOPARTÍCULAS Y MICROPARTÍCULAS	182
2.1	<i>Nanopartículas y micropartículas formuladas con CyA y PLGA</i>	185
3.	ABSORCIÓN INTESTINAL	187
4.	INFLUENCIA DEL MUCUS INTESTINAL	188
<i>Mucina: la glicoproteína del moco</i>	189
II.-	OBJETIVOS	193
III.-	MATERIALES Y MÉTODOS	195
1.	MATERIALES	195
1.1	<i>CyA Y FORMULACIONES DE CyA</i>	195
1.2	<i>NANOPARTÍCULAS Y MICROPARTÍCULAS</i>	197
1.2.1	Preparación de las nanopartícula por nanoprecipitación	198
1.2.2	Preparación de las micropartículas por el método nano spray-drying	199
1.2.3	Determinación del tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta	200
1.2.4	Determinación de la eficacia de encapsulación y la carga	201
1.2.5	Perfil de liberación in vitro de las partículas cargadas con CyA	202
1.3	<i>Otros materiales</i>	204
2.	MÉTODOS	205
2.1	<i>Estudios de permeabilidad in vitro con células CaCo-2</i>	206
2.2	<i>Desarrollo de un método de extracción de fármaco del moco intestinal</i> ..	209
A.	Preparación de mucus artificial	209
B.	Simulación de la mucoadhesión tras la administración oral	210
C.	Métodos de extracción ensayados.....	210
Método (1).	Etanol- Sonicación	211
Método (2).	Etanol-Agitación	211
Método (3).	Etanol- Agitación vórtex	211
Método (4).	Acetonitrilo-Ácido ortofosfórico.....	211
2.3	<i>Estudio de absorción intestinal in situ en rata Wistar</i>	212

2.3.1	Soluciones de trabajo.....	213
2.3.2	Técnica experimental.....	215
2.3.3	Tratamiento de las muestras.....	220
2.3.4	Tratamiento matemático.....	222
2.3.5	Cálculo de la constante aparente de velocidad de absorción, K_a	223
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		225
1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y BIOFARMACÉUTICA DE LAS NP Y MP DE PLGA.....	225
2.	ESTUDIOS DE ABSORCIÓN <i>IN VITRO</i> CON CÉLULAS CACO-2.....	227
3.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	229
4.	ESTUDIO CINÉTICO DE ABSORCIÓN INTESTINAL EN RATA WISTAR.....	230
5.	EFICACIA FARMACOLÓGICA DE LA NUEVA FORMULACIÓN <i>IN VIVO</i>	236
6.	RESUMEN E IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE CAPÍTULO.....	244
V.- CONCLUSIONES.....		247
CONCLUSIONES GENERALES.....		249
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		253
ANEXO I. ABREVIATURAS.....		299
ANEXO II. AUTORIZACIONES DE PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....		303

Resumen

Las enfermedades inflamatorias con componente autoinmune de la piel y del tracto gastrointestinal, como son la psoriasis y la dermatitis atópica y la enfermedad inflamatoria intestinal, respectivamente, son enfermedades prevalentes que necesitan mejorar su tratamiento.

La ciclosporina A es un fármaco inmunosupresor que ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, pero también sus efectos adversos a nivel sistémico.

En el caso de las enfermedades cutáneas, la administración por vía tópica de este fármaco aportaría grandes ventajas como la posibilidad de actuar a nivel local y evitar efectos sistémicos. Sin embargo, la ciclosporina A presenta un tamaño molecular que dificulta su difusión a través de la piel, impidiendo el tratamiento tópico y limitando su utilización a la administración oral.

En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, gran cantidad de la dosis administrada de ciclosporina A se absorbe a través de la mucosa intestinal, permaneciendo durante un tiempo limitado en el tracto gastrointestinal, donde debe ejercer su acción terapéutica. En estos casos, el tratamiento local supone un gran desafío ya que el tejido a tratar es absorbente en sí mismo. Además, esta absorción conlleva efectos sistémicos indeseados.

Por todo ello, se presenta la necesidad de mejorar el diseño de las formas de administración de ciclosporina A para el tratamiento de estas patologías. Con el fin de superar estos inconvenientes, se ha formulado la ciclosporina A en distintos sistemas de administración.

Para la piel, se ha diseñado una serie de sistemas liposomales ultraflexibles, transfersomas y etosomas, con características técnicas que las hacen estables y aptas para transportar fármacos, y que han permitido la administración *ex vivo* de ciclosporina A, de manera efectiva, a través de piel humana, mostrando una distribución a través de los diferentes estratos de la piel.

Para la vía oral, se han diseñado partículas nano- y microestructuradas cargadas con ciclosporina A, que han mostrado características óptimas de mucoadhesión y de liberación controlada del fármaco en la mucosa gastrointestinal, aumentando así el tiempo de contacto con el tejido a tratar y disminuyendo la absorción y el paso a circulación sistémica.

Por lo tanto, estas diferentes formas de liberación controlada se erigen como prometedores tratamientos para enfermedades inflamatorias, con componente inmunológico de la piel y gastrointestinales, permitiendo ejercer una acción farmacológica más selectiva, localizada y duradera, al mismo tiempo que se reduce la cantidad de fármaco que accede a circulación sistémica y, por tanto, sus posibles efectos adversos.

Abstract

Inflammatory diseases with autoimmune component of the skin and the gastrointestinal tract, such as psoriasis and atopic dermatitis, and inflammatory bowel disease, respectively, are prevalent diseases in need of improved treatment.

Cyclosporin A is an immunosuppressive drug that has been shown to be effective for the treatment of autoimmune diseases but has adverse effects at the systemic level.

In the case of skin diseases, topical administration could provide great advantages such as the possibility of acting locally, avoiding systemic effects. However, this drug's molecular size, hinders its diffusion through the skin, hampering topical treatment and limiting its use to oral administration.

In the case of inflammatory bowel disease, a large amount of the administered dose of cyclosporin A is absorbed through the intestinal mucosa, remaining for a limited period in the gastrointestinal tract, where it should exert its therapeutic action. In these cases, local treatment can be particularly challenging as the treated tissue is self-absorbent, leading to undesirable systemic effects.

For all these reasons, there is a need to find an appropriate dosage form for cyclosporin A for the treatment of these pathologies. To overcome these drawbacks, cyclosporin A has been formulated in advanced delivery systems.

For the skin, a series of ultraflexible liposomal systems, transfersomes and ethosomes have been designed. The new formulations have proven to be stable and suitable for drug transport, and have allowed the effective ex vivo administration of cyclosporin A through the different layers of the human skin.

For the oral route, nano- and microstructured particles loaded with cyclosporin A have been designed, which have shown optimal characteristics of mucoadhesion and controlled release of the drug in the gastrointestinal mucosa, thus increasing the contact time with the tissue to be treated and decreasing absorption and passage to systemic circulation.

In conclusion, the results of this work suggest that these new forms of controlled release are promising results for skin and intestinal inflammatory diseases with immunological components, as they would allow a more selective, localized and long-lasting pharmacological action, while reducing possible adverse effects.

Índice de figuras

<i>Figura 1. Diagrama esquemático de la piel humana con sus diferentes capas de células y apéndices (17).</i>	27
<i>Figura 2. Estructura de la epidermis, formada por estrato basal, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato corneo (7).</i>	28
<i>Figura 3. Esquema de rutas cutáneas de penetración.</i>	35
<i>Figura 4. Esquema del modelo de "ladrillo y cemento" del SC con organización laminar simplificada de dominios intercelulares que muestran los principales lípidos del SC. También muestra las posibles rutas de permeación de fármacos a través del SC; la ruta transcelular y la intercelular (14).</i>	35
<i>Figura 5. Diagrama de la estructura básica y composición de un liposoma.</i>	40
<i>Figura 6. Clasificación de liposomas de acuerdo con su diámetro medio y el número de bicapas.</i>	41
<i>Figura 7. Esquema comparativo de la estructura de diferentes liposomas (39).</i>	42
<i>Figura 8. Posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración de fármacos sobre la piel. (A) es el mecanismo de fármaco libre, (B) es el proceso de potenciar la penetración de los componentes de liposomas, (C) indica la adsorción de vesículas y/o la fusión con el estrato córneo (SC), (D) ilustra la penetración de la vesícula intacta en y/o a través de la piel intacta y (E) ilustra la penetración de la vesícula por vía trans-apendicular (73).</i>	43
<i>Figura 9. a) Deformabilidad en la piel de los transfersomas respecto a los liposomas convencionales; b) Efecto de gradiente de hidratación (73,88).</i>	46
<i>Figura 10. Esquema del modelo de penetración a través de la piel del sistema liposomal (25).</i>	48
<i>Figura 11. Modelo propuesto para la difusión de los etosomas a través de la piel (84).</i>	49
<i>Figura 12. Representación de los diferentes protocolos de preparación para la obtención de diferentes vesículas liposomales. LOVs, vesículas oligolaminares largas; GUVs: vesículas unilamelares gigantes (90).</i>	51

<i>Figura 13. Fases del lípido en función de la temperatura. El cambio de fase se debe a un desorden de las cadenas hidrocarbonadas que forman parte de los lípidos debido a un cambio de temperatura.</i>	52
<i>Figura 14. Estructura química de la HPMC o hipromelosa, con fórmula molecular $C_{32}H_{60}O_{19}$ (101).</i>	54
<i>Figura 15. Diseño de la célula estática vertical de difusión tipo Franz.</i>	57
<i>Figura 16. Patogénesis de la psoriasis. A) La compleja interacción de células cutáneas, macrófagos, células dendríticas, células T y demás células del sistema inmune liberan citocinas y quimiocinas que producen los primeros cambios en la piel. La diferenciación de células Th1 y Th17 es estimulada por las células dendríticas mediante IL-23. B) Los mediadores liberados por las células del sistema inmune inducen y mantienen las lesiones producidas en la piel psoriásica. A su vez, los queratinocitos amplían la respuesta inflamatoria a través de sus mediadores (135).</i>	64
<i>Figura 17. Mecanismo de acción de la Ciclosporina (Adaptación) (150).</i>	68
<i>Figura 18. Estructuras químicas de (a) ciclosporina A y (b) fosfatidilcolina.</i>	74
<i>Figura 19. Esquema del estudio in vitro de permeabilidad transdérmica con CDF.</i>	99
<i>Figura 20. Curva de calibración para CyA.</i>	109
<i>Figura 21. Cromatograma de Ciclosporina analizado mediante HPLC para una concentración de 7,8 $\mu\text{g/ml}$.</i>	110
<i>Figura 22. Potenciales Z (mV) determinados de las formulaciones liposomales seleccionadas para los ensayos de permeabilidad en piel (media \pm desviación estándar).</i>	117
<i>Figura 23. Visualización de las formulaciones liposomales cargadas con CyA, mediante TEM. (a) SLC, (b) SLE, (c) SLT1, (d) SLT2-SON, (e) SLT2-EXT.</i>	119
<i>Figura 24. Eficacia de encapsulación (EE %), concentración y porcentaje de incorporación de fosfatidilcolina (PC) en las formulaciones liposomales, (media \pm DS).</i>	120
<i>Figura 25. Estabilidad de las formulaciones liposomales almacenadas a 4°C durante 70 días, (a) efecto sobre el tamaño de partícula (diámetro medio) y (b) sobre el PDI, (media \pm desviación estándar).</i>	124

Figura 26. Efecto sobre el tamaño de las vesículas. a) Estudio de estabilidad a 25°C durante 1 día. b) Estudio de estabilidad a 30°C durante 2 horas. c) Estudio de estabilidad a 45°C durante 2 horas. d) Estudio de estabilidad a 60°C durante 2 horas (Media ± DS). Circulo negro: SLC; Triangulo negro: SLT2-EXT; Triangulo blanco: SLT2-SON; Diamante blanco: SLT1; Cuadrado negro: SLE.	126
Figura 27. Efecto sobre el PDI. a) Estudio de estabilidad a 25°C durante 1 día. b) Estudio de estabilidad a 30°C durante 2 horas. c) Estudio de estabilidad a 45°C durante 2 horas. d) Estudio de estabilidad a 60°C durante 2 horas. Circulo negro: SLC; Triangulo negro: SLT2-EXT; Triangulo blanco: SLT2-SON; Diamante blanco: SLT1; Cuadrado negro: SLE.	126
Figura 28. Efecto de los crioprotectores sobre el tamaño de las vesículas de las formulaciones liposomales, tras la congelación a -80°C durante 3 h; comparado con el tamaño inicial, * p < 0.05; n = 6 (Media ± DS).	128
Figura 29. Vesículas liposomales con CyA resuspendidas después de la liofilización, observadas en TEM. SLC con (a.1.) lactosa y (a.2.) sorbitol; SLT1 con (b.1.) glucosa y (b.2.) combo; SLT2-EXT con (c.1.) glucosa y (c.2.) lactosa; SLE con (d.1.) lactosa y (d.2.) combo.	130
Figura 30. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales convencionales.	131
Figura 31. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales transfersomas.	132
Figura 32. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales etosomas.	132
Figura 33. Resultados del tape stripping diferencial.	135
Figura 34. Perfiles de difusión in vitro de CyA a partir de las diferentes formulaciones liposomales, a través de epidermis humana en células de difusión tipo Franz. Los resultados se representan cantidad acumulada de fármaco por superficie por hora (n ≥ 4).	138
Figura 35. Curva de flujo. Representa la fuerza o presión aplicada frente a la deformación. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE.	146

Figura 36. Curva de viscosidad frente a la velocidad de corte. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE. _____	148
Figura 37. Prueba de barrido de frecuencia. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE. _____	149
Figura 38. Prueba de fluencia y recuperación. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE. _____	150
Figura 39. Perfil de liberación de CyA a partir de las diferentes formulaciones liposomales en hidrogel en células de difusión tipo Franz. Los resultados se presentan por porcentaje de la dosis liberada ($n \geq 4$). _____	152
Figura 40. Afectación del intestino por la EC y CU (234). _____	171
Figura 41. Hallazgos colonoscópicos de paciente con CU (235). _____	173
Figura 42. Hallazgos colonoscópicos de paciente con EC (236). _____	176
Figura 43. Estructura química del PLGA ácido poli(láctico-co-glicólico) (261) _____	185
Figura 44. Estructura de las mucinas (270) _____	190
Figura 45. Mucina de membrana (teñida en verde) en las células epiteliales intestinales (271). _____	191
Figura 46. Estructura de la ciclosporina A (274). _____	195
Figura 47. A) SandimmunNeoral®. B) Sandimmun® inyectable (275,276) _____	197
Figura 48. Imágenes obtenidas por SEM. A) NP-PLGA. B) NP-PLGA-CyA. _____	197
Figura 49. Esquema del Nano Spray Dryer. Adaptación (40). _____	200
Figura 50. Distribución de los animales en cada grupo de estudio _____	216
Figura 51. Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio. (Elaboración propia). _____	218
Figura 52. Perfil de liberación de las NP y MP de CyA en SGF pH 6.8 (media \pm SD) (n=3). _____	226
Figura 53. Cormatogramas obtenidos para distintos patrones de CyA por espectroscopía de masas _____	227
Figura 54. Recta patrón obtenida para CyA mediante espectrometría de masas _	228
Figura 55. Concentraciones medias de CyA (n=6) en el lumen intestinal a cada tiempo. (Sandi = microemulsión; I.V. = solución; MP = micropartículas-CyA; NP = nanopartículas-CyA). _____	231
Figura 56. Esquema del modelo experimental del ensayo farmacológico. _____	237

<i>Figura 57. Peso corporal durante el tratamiento con DSS.</i>	238
<i>Figura 58. Fotografía de la longitud del colon de los animales.</i>	239
<i>Figura 59. Longitud del colon de los animales.</i>	239
<i>Figura 60. estudio histológico (10x, scale bar = 100 μm). (a) blank, (b) DSS, (c) Sandimmun (50 mg/kg), (d) CyA-NP (50 mg/kg), (e) CyA-MP (50 mg/kg), (f) Sandimmun (25 mg/kg), (g) CyA-NP (25 mg/kg), (h) CyA-NP (12.5 mg/kg).</i>	240

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Mecanismos de acción de liposomas como sistemas de liberación de fármaco en piel – adaptación- (73).</i>	44
<i>Tabla 2. Materiales usados en la formulación de los sistemas liposomales</i>	73
<i>Tabla 3. Otros materiales utilizados</i>	75
<i>Tabla 4. Condiciones cromatográficas para determinación de CyA por HPLC</i>	78
<i>Tabla 5. Límites/criterios de los parámetros de validación del método analítico.</i>	82
<i>Tabla 6. Composición cuantitativa de las formulaciones</i>	83
<i>Tabla 7. Resumen de las formulaciones</i>	87
<i>Tabla 8. Concentración de CyA en las formulaciones liposomales (µg/ml) (n=6).</i>	111
<i>Tabla 9. Tamaño de partícula (DM) y PDI determinados a partir de las formulaciones liposomales sin CyA, según método de reducción de tamaño (media ± desviación estándar).</i>	112
<i>Tabla 10. Tamaño de partícula (DM) y PDI determinados a partir de las formulaciones liposomales con CyA, según método de reducción de tamaño (media ± desviación estándar).</i>	116
<i>Tabla 11. Datos de caracterización de los sistemas liposomales cargados con CyA y seleccionados para los estudios de permeabilidad cutánea: Tamaño, PDI, Potencial-Z, Eficacia de encapsulación (EE%) y contenido de fosfatidilcolina (PC%).</i>	121
<i>Tabla 12. Diámetro y volumen de las vesículas cargadas con CyA después de la extrusión en frío (Media +- SD). También se enumera el volumen perdido.</i>	122
<i>Tabla 13. Parámetros de difusión a través de la piel In vitro skin de CyA en diferentes formulaciones de liposomas (Media ± DS). (*) Diferencias estadísticas P < 0.001.</i>	138
<i>Tabla 14. Propiedades físicas y químicas de la ciclosporina (274).</i>	196
<i>Tabla 15. Dosis y volúmenes de anestesia según peso del animal</i>	213
<i>Tabla 16. Preparaciones utilizadas en el estudio de absorción intestinal in situ en rata Wistar</i>	214
<i>Tabla 17. Caracterización fisicoquímica de las NP.</i>	225
<i>Tabla 18. Caracterización fisicoquímica de las MP.</i>	225
<i>Tabla 19. Recuperación (%) de CyA mediante el método de extracción.</i>	230

<i>Tabla 20. Valores medios de CyA recuperado en el intestino de rata Wistar tras la administración de nanopartículas (% de dosis inicial)</i>	<i>232</i>
<i>Tabla 21. Valores medios de CyA recuperado en el intestino de rata Wistar tras la administración de micropartículas (% de dosis inicial)</i>	<i>233</i>
<i>Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones.</i>	<i>233</i>
<i>Tabla 23. Resumen de los grupos experimentales del ensayo in vivo.</i>	<i>236</i>

Introducción

1. Administración tópica de fármacos

La administración de fármacos por vía tópica presenta varias ventajas con respecto a otras vías de administración, como la capacidad de administrar el fármaco de forma más selectiva en la piel o mucosas, evitando las fluctuaciones en los niveles del fármaco, las variaciones inter- e intra-pacientes debidas al metabolismo, la mejora del cumplimiento del tratamiento y una mayor idoneidad para la autoadministración. La piel constituye un lugar ideal para la administración de sustancias farmacológicas con efectos tanto locales como sistémicos. Sin embargo, también actúa como barrera mecánica para la penetración de una gran variedad de sustancias químicas y microorganismos debido a su baja permeabilidad (1). Para esta investigación es de especial interés esta función, que protege al organismo de la difusión de xenobióticos a través de ella y cómo superarla.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con una superficie de aproximadamente 1,5-2 m² y 4 kg de peso. Está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis y los apéndices asociados: folículos pilosos, glándulas sudoríparas y endocrinas y uñas. El estrato córneo (SC) corresponde con la capa superior de la epidermis. Está formado por 18-21 capas celulares con un grosor de 10-20 µm y es responsable de la función de barrera de la piel. Los corneocitos son células delgadas, poligonales, muertas y sin citoplasma, rodeadas por una matriz lipídica, que forman la llamada estructura de ladrillo y mortero definida por Michaels et al. (2). Las

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

terminaciones nerviosas, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos se sitúan en primer lugar por debajo de la epidermis, en la dermis, lo que puede utilizarse como ventaja para el diseño de sistemas de administración de fármacos. Por último, los folículos pilosos, las glándulas de secreción y sudoración atraviesan todas las estructuras de la piel desde la dermis hasta la superficie.

Un fármaco administrado por vía tópica debe difundir a través de varias capas con diferentes propiedades químicas. Tras la liberación de la formulación, el fármaco debe distribuirse en el SC y difundir a través de él. Esta es la capa considerada como limitante para la absorción cutánea. Después de atravesar esta capa de alta lipofilia, el fármaco debe difundir desde el SC a la capa inferior de la epidermis viable, que es una capa hidrofílica. A continuación, debe permeabilizar hacia la dermis.

Hay dos objetivos posibles para una formulación tópica en función del lugar de destino:

- a) Dirigir el fármaco a una o más capas viables de la piel.
- b) Administración transdérmica del fármaco con una finalidad sistémica.

A pesar de las ventajas de la administración cutánea de fármacos y de su facilidad de acceso, no es un órgano fisiológico de intercambio de xenobióticos, sino todo lo contrario. La presencia del SC, que actúa como una barrera muy eficaz, hace que la

administración de fármacos por vía cutánea sea un reto importante en la mayoría de los casos (3).

La administración tópica de fármacos es posible y se utiliza ampliamente para muchas aplicaciones terapéuticas, pero no es factible para todo tipo de fármacos. Los fármacos deben cumplir varios requisitos para acceder a las capas más profundas de la piel y/o a la circulación sistémica, como un tamaño pequeño (<500 Da), un coeficiente de reparto adecuado, un grado de ionización bajo, etc. Salvo algunos ejemplos de fármacos que difunden muy eficazmente a través de la piel y que dan lugar a una disponibilidad sistémica, como la tretinoína, los corticoides, la nicotina, la cafeína o el fentanilo, la mayoría de los fármacos no difunden a través de esta capa para proporcionar un nivel plasmático apreciable (4–6).

Esto significa que varios fármacos, con eficacia demostrada para tratar afecciones cutáneas, como la psoriasis o la dermatitis atópica (DA), deben administrarse por vía sistémica en lugar de tópica. La optimización de la administración tópica de los fármacos en este caso reduciría las dosis aplicadas, el metabolismo de primer paso hepático y la toxicidad sistémica asociada, lo que puede limitar su uso en muchos casos. Todos estos problemas podrían superarse si consiguiéramos la difusión de estos fármacos a través del SC, lo que también mejoraría las terapias actualmente disponibles y aumentaría la adherencia de los pacientes a los tratamientos. Además, la aplicación de los fármacos por vía tópica, si se evitaran los efectos sistémicos, sería más segura para las mujeres embarazadas y en

periodo de lactancia, mejorando así la calidad de vida de estos pacientes.

1.2 Enfermedades inflamatorias de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica

Hoy en día, en el mundo desarrollado y en los países industrializados hay un aumento de la incidencia de muchas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. Según "ACCION PSORIASIS - Asociación de pacientes de psoriasis y artritis psoriásica y familiares", la psoriasis no sólo deteriora la salud física, sino que también afecta a su dimensión emocional y social. La encuesta más amplia realizada a estos pacientes revela datos como que la vida social del 61% se ha visto afectada y el 36% presenta falta de autoestima. Además, tres cuartos de los encuestados aseguran que su vida diaria se ve afectada por síntomas como dolor, picor, descamación o grietas. Dependiendo de la localización de las lesiones cutáneas provocadas por la enfermedad estas pueden ser visibles y generar rechazo en otras personas, y esto afecta a otros ámbitos importantes para la vida de los pacientes, como las relaciones íntimas, en un 57%, o en su carrera profesional, en un 50%. Como se comprueba en los resultados de esta encuesta, esta enfermedad produce un impacto físico, psicológico, social y económico importante en las personas afectadas (7). La psoriasis se caracteriza por pápulas eritematosas elevadas y bien delimitadas con escamas brillantes adheridas. La artritis psoriásica se asocia con daño articular

progresivo, y los pacientes tienen una carga importante de deterioro físico (8).

Por otro lado, según los especialistas, la DA se ha convertido en un problema de salud pública, ya que en los últimos años ha aumentado su prevalencia y es la causa de la "marcha atópica", que puede provocar la progresión de la DA a otras enfermedades alérgicas como el asma o la rinitis alérgica (9). En la actualidad, la DA es una enfermedad crónica incurable que, debido a sus síntomas, puede afectar significativamente a la calidad de vida de los pacientes. Las personas que viven con esta enfermedad ven sus efectos en la piel, pero también el efecto debilitante que tiene en su vida diaria, como el picor persistente, la piel agrietada, gruesa y supurante. Además, esta afección puede causar efectos psicológicos negativos, como trastornos del sueño, ansiedad, depresión o aislamiento, que a menudo está relacionado con el rechazo y la marginación. También es muy relevante la carga económica asociada a la enfermedad, que además de ser muy elevada, no podemos obviar por su alto impacto y en concreto, por los costes de tratamiento.

Por ello, es necesario desarrollar mejores terapias, productos más fáciles de administrar, menos costosos, menos tóxicos y más eficaces. La fisiopatología de la DA incluye la disfunción de la barrera cutánea y la desregulación de la inflamación y la inmunidad de la piel, y potencialmente implica a múltiples genes (10). Por otra parte, la psoriasis en la mujer no reduce la fertilidad, pero sí la tasa de embarazos (7). Esto es de gran importancia para nuestro proyecto, ya que nuestro enfoque evitará/disminuirá en gran medida los niveles

plasmáticos de los agentes terapéuticos, facilitando así su uso en mujeres embarazadas y lactantes.

1.3 Tratamientos potenciales e inconvenientes de administración asociados

Entre las diferentes opciones terapéuticas potenciales para tratar estas afecciones que no pueden administrarse por vía tópica, se ha seleccionado para este trabajo la Ciclosporina A (CyA), ya que presenta problemas de tamaño (1200 Da) que no permite la difusión pasiva a través de la piel.

La CyA es un polipéptido cíclico lipofílico de 11 aminoácidos con propiedades inmunosupresoras. Está disponible comercialmente en forma de cápsulas blandas para administración oral, solución para administración oral, preparados intravenosos y colirio en emulsión para tratamiento oftálmico (11).

La administración oral de CyA se utiliza desde 1997 para el tratamiento de la psoriasis, y se ha indicado también para la DA, los trastornos bullosos y las enfermedades del tejido conectivo (12). La eficacia de la CyA para el tratamiento de la psoriasis y la DA está bien documentada (13,14), aunque actualmente se utiliza como terapia de segunda línea debido a sus graves efectos adversos, que en su mayoría dependen de la dosis y la duración del tratamiento (12,15).

En el presente trabajo se postula la administración tópica de CyA como una estrategia prometedora para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes de la piel. Ofrecería ventajas sobre la administración oral, como la localización de la dosis en el tejido diana, la reducción de la dosis y la evitación de los efectos adversos sistémicos. Sin embargo, aunque se han realizado investigaciones sobre la administración tópica de CyA, debido al peso molecular (PM) de este fármaco (1.202,61 Da), las estrategias propuestas son en la mayoría de los casos ineficaces, debido a la insuficiente penetración del fármaco a través de la piel (16).

1.4 Administración tópica de fármacos: Retos y posibles soluciones

En las últimas décadas, muchos grupos de investigación han realizado grandes esfuerzos para mejorar la administración tópica de fármacos mediante diferentes estrategias, como el uso de potenciadores químicos, tratamientos fisiológicos para reducir la función de barrera de la piel o el uso de diferentes tipos de nanotransportadores. En esta vía de administración, el vehículo tiene una influencia más pronunciada en las preparaciones cutáneas que en cualquier otra membrana, ya que puede modular el paso del fármaco a través de la piel, dependiendo de las propiedades de este (17).

Uno de los problemas más difíciles de la administración transdérmica de moléculas de alto PM, como la CyA, es que la piel es

una barrera muy eficaz. Por regla general, sólo las moléculas lipofílicas de tamaño molecular $< 500-600$ Da pueden difundir pasivamente a través del SC intacto (18). Por esta razón principal, la administración tópica de fármacos de moléculas más grandes sigue siendo un reto. Se han explorado varios enfoques para la administración de macromoléculas a través de la piel (potenciadores químicos, iontoforesis, ablación con láser, etc.), que en algún momento son eficaces, pero presentan algunos inconvenientes importantes (17). Además, a menudo provocan irritación de la piel, son poco aceptados por los pacientes y deben ser aplicados por personal capacitado. Todas estas cuestiones desaniman a los pacientes a seguir el tratamiento, lo que provoca su fracaso. En este contexto, los enfoques para mejorar la administración de fármacos a través de la piel han dado lugar al diseño de diferentes tipos de nanotransportadores, entre los que los sistemas liposomales han mostrado resultados muy prometedores (19,20). Los liposomas son vesículas microscópicas con un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas formadas por bicapas lipídicas compuestas principalmente por fosfolípidos no tóxicos y biodegradables (21). Se utilizan ampliamente por su capacidad para encapsular fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos. Las investigaciones posteriores han conducido al desarrollo de tipos de liposomas modificados, que incluyen tensioactivos (transfersomas) o etanol (etosomas) en su composición, que proporcionan un doble efecto potenciador de la administración de fármacos en la piel (22–25). En primer lugar, son más flexibles que los liposomas clásicos (por lo que también se denominan flexosomas), lo que puede dar lugar a

diferentes interacciones entre la vesícula y la piel, y, en segundo lugar, los tensioactivos y el etanol se han señalado como potenciadores de la permeabilidad de varios fármacos (25). Estos liposomas modificados, han aparecido como nanosistemas prometedores; la deformabilidad, su característica principal, les permite atravesar el microambiente epidérmico, mejorando la administración de fármacos en la piel (26). Además, los etosomas son significativamente más biocompatibles con los fibroblastos de la piel embrionaria humana en comparación con las soluciones de etanol, por lo que son una mejor alternativa a la mejora química clásica (27).

Basándose en estos criterios, este estudio pretende preparar y caracterizar vesículas lipídicas estables: liposomas, transferomas y etosomas para administrar CyA a través de la piel humana. Se trata de vesículas fosfolipídicas ultraflexibles, mucho menos rígidas que los liposomas tradicionales. Un efecto esencial de los potenciadores de la flexibilidad presentes en estos sistemas es la alteración de la organización del SC. Además, las vesículas pueden fusionarse con las bicapas lipídicas del SC alteradas, generando una vía hacia las capas más profundas de la piel, a través de la cual su contenido puede difundirse pasivamente. Varios estudios han demostrado también que la vía folicular es otra vía de penetración que puede participar en la administración de fármacos mediante vesículas ultraflexibles (5,28–30). Además, numerosos estudios han demostrado que los etosomas son seguros para la piel y las células dérmicas y estables durante al menos 2 años (31).

2. Administración de fármacos por vía oral

Para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades, la vía de administración de elección, al tratarse de la forma fisiológica de absorción y además más cómoda de administración, es la administración oral de medicamentos. La absorción de los fármacos administrados por esta vía es un proceso complejo, condicionado, por un lado, por la fisiología del tracto gastrointestinal, el tiempo de tránsito, la interacción con alimentos u otros fármacos, características propias del paciente, y por otro, por las propiedades del fármaco, como su disolución, interacción con el entorno gastrointestinal, la permeabilidad a través de la membrana o efectos de primer paso intestinal y/o hepático (32). Todos estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de administrar un fármaco por esta vía.

Entre los factores a considerar ya mencionados cabe resaltar la interacción con la mucosa y el moco gastrointestinal. EL moco puede afectar negativamente a la absorción o a la acción de fármacos administrados por vía oral ya que puede ejercer una retención del fármaco disminuyendo o retrasando su absorción, sin embargo, en algunos casos, la presencia del mucus y este efecto puede ofrecer beneficios para el tratamiento (33,34).

2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal. Tratamiento y vías de administración

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una patología prevalente que afecta cada vez a un mayor número de personas en la población mundial (35). Engloba dos enfermedades, la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU). Los tratamientos convencionales para estas enfermedades no son efectivos en un 80% de los pacientes afectados, y parte de estos acaban requiriendo cirugía en algún momento (36). La etiología de la enfermedad es desconocida (37), lo que dificulta su tratamiento farmacológico, siendo éste muy inespecífico. Además, estos tratamientos conllevan generalmente efectos adversos importantes, como ocurre con los fármacos de elección para estas patologías, que son los inmunosupresores y corticoides (38). Su administración se realiza habitualmente en forma de comprimidos recubiertos para la vía oral o en formas farmacéuticas de aplicación rectal, dependiendo de la zona donde se localiza la inflamación. Debido a los efectos adversos sistémicos que provocan, las dosis requeridas de corticosteroides e inmunosupresores no pueden administrarse durante largos períodos de tiempo (39).

2.2 Vía oral y tratamiento local: inconvenientes y retos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Estas vías de administración presentan un problema grave cuando la zona a tratar es el propio intestino, ya que la mayor parte de la dosis administrada es absorbida a través de la mucosa intestinal hacia la circulación sistémica, disminuyendo así la cantidad de fármaco

disponible en la zona a tratar (40), obligando a administrar dosis muy superiores de lo necesario y dando lugar a efectos sistémicos y tóxicos indeseados en un alto índice de pacientes tratados (35).

Para lograr un tratamiento óptimo de la EII, el medicamento debe aplicarse idealmente de forma local, para obtener altas concentraciones de medicamento en el tejido afectado, con la administración de una dosis menor, y minimizar el acceso a la circulación sistémica y los efectos adversos posteriores (41). Además, este tipo de administración ofrece un efecto inmediato en la zona a tratar. Este es un desafío difícil cuando el tejido objetivo es un tejido absorbente en sí mismo, ya que el fármaco se elimina rápidamente de la luz intestinal hacia el torrente sanguíneo.

Por todo ello, se presenta la necesidad de mejorar el diseño de las formas de administración disponibles para el tratamiento de estas patologías.

En este contexto, los sistemas nanoestructurados de tipo polimérico ofrecen múltiples posibilidades (38), por una parte permiten liberar el fármaco de forma gradual en el lumen intestinal, debido a su perfil de liberación sostenida. Y gracias también a sus propiedades mucoadhesivas que aumentan el tiempo de contacto, producen una acción farmacológica más selectiva, localizada y duradera, al tiempo que reducen la cantidad de fármaco que accede a circulación sistémica y, por tanto, sus posibles efectos adversos.

El fármaco inmunosupresor CyA se formuló en nanopartículas poliméricas (NP) preparadas por el método de nanoprecipitación y en micropartículas (MP) fabricadas por nano spray-drying (40). El polímero utilizado en las formulaciones fue el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), que es biodegradable y es utilizado en diferentes productos farmacéuticos (42). La CyA es efectiva para el tratamiento de la EII, pero también causa varios efectos adversos graves (43–45) que podrían ser minimizados mediante la utilización de tecnología avanzada de administración de medicamentos.

A través de estos sistemas de liberación se pretende conseguir una acumulación de las partículas en el lumen intestinal desde donde se consiga una liberación sostenida en el tiempo de dosis bajas. Con esta estrategia, se pretende concentrar el activo en el lugar de acción y reducir su acceso a la circulación sistémica. De esta forma se espera reducir en gran medida los efectos secundarios sistémicos asociados al uso de la CyA. Estos efectos, como se ha explicado anteriormente, son limitantes a la hora de la utilización de la CyA como tratamiento de primera línea para esta patología.

Objetivos generales

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para
enfermedades inflamatorias

Los objetivos generales de la tesis doctoral que se presenta han sido los dos siguientes:

1. Desarrollar varios sistemas de vesículas lipídicas ultraflexibles con el fin de aumentar la penetración de CyA a través de la piel. Para ello, se desarrollarán y caracterizarán las diferentes formulaciones y se evaluará los parámetros de difusión *in vitro*, la acumulación del fármaco en las distintas capas de la piel y se crearán formulaciones tipo hidrogel con las diferentes vesículas.
2. Estudiar el perfil de absorción intestinal de CyA formulada tanto en MP como en NP de PLGA utilizando métodos *in vitro* e *in situ* y comparar con dos formulaciones comerciales, con el fin de evaluar si las nuevas formulaciones modifican el perfil de absorción minimizando el acceso del fármaco a circulación sistémica.

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

Capítulo 1.

Desarrollo de liposomas ultraflexibles de ciclosporina A para administración tópica

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

Resumen

Las enfermedades inflamatorias de la piel que cursan con un componente inmunológico, como son la psoriasis y la DA, son patologías muy extendidas que necesitan mejorar su tratamiento. La administración tópica de fármacos presenta grandes ventajas respecto a otras vías de administración, como es la posibilidad de actuar de forma local y evitar efectos sistémicos.

Uno de los tratamientos utilizados para el tratamiento de estas enfermedades es la CyA. Su efectividad ha sido demostrada, pero también sus efectos adversos a nivel sistémico. La administración tópica de CyA podría utilizarse si se aplicara directamente sobre la piel, con un objetivo terapéutico local, formulada en el vehículo adecuado que permita evitar niveles sistémicos y, por consiguiente, efectos adversos. Sin embargo, el PM (>500 Da) y la lipofilia de la CyA impiden su difusión a través de la piel humana.

Para superar este problema se plantea la utilización de liposomas, vesículas microscópicas con gran capacidad para encapsular fármacos, como sistemas promotores de liberación transdérmica. En ese punto, nace el “Proyecto Emergente GV2015-054”, financiado por la Generalitat Valenciana y cuenta también con la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (SAF2017-85806-R). Ambos proyectos llevados a cabo en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de València.

Buscando una mayor flexibilidad respecto a los liposomas convencionales, en el presente trabajo se preparan, mediante diferentes metodologías, nuevas vesículas lipídicas: liposomas ultraflexibles o transfersomas y etosomas. Su composición incluye tensioactivos o etanol de forma que proporcionan un doble efecto potenciador de la administración de fármacos en la piel: mayor flexibilidad y efecto potenciador de la permeabilidad.

Las vesículas se caracterizaron en términos de tamaño de partícula, polidispersión, potencial Z, morfología, encapsulación de fármacos, contenido de fosfolípidos y flexibilidad. También se realizó un estudio de liofilización, en presencia y ausencia de agentes crioprotectores, para garantizar la estabilidad a largo plazo.

La distribución CyA en los diferentes estratos de la piel gracias a los sistemas liposomales, se estudió con la utilización de piel porcina. La capacidad para administrar CyA en la piel se evaluó utilizando epidermis humana en célula estática vertical de difusión tipo Franz (CDF) y se comparó con las soluciones de fármacos con las proporciones de potenciadores utilizadas en los diferentes liposomas, para verificar que la promoción la realizan las vesículas, y no los componentes sin ensamblar. Posteriormente, los diferentes sistemas liposomales se formularon en un hidrogel y se estudiaron sus características reológicas y la liberación de CyA a partir de estas formulaciones.

Las características técnicas de las vesículas liposomales diseñadas las hacen estables y aptas para transportar fármacos.

Además, estas formulaciones liposomales permitieron administrar CyA de manera efectiva *in vitro* a través de piel humana y mostraron una distribución a través de los diferentes estratos de la piel. El presente trabajo presenta un enfoque prometedor para el tratamiento tópico de patologías cutáneas con componente inmunológico y como son la psoriasis y la DA.

I.- ANTECEDENTES

1. La Piel como vía de absorción de fármacos

La piel es una de las principales vías de absorción de fármacos. Sin embargo, la piel forma una excelente barrera que impide la entrada de sustancias, constituyendo así un importante obstáculo a la absorción de casi todos los fármacos, excepto pequeñas moléculas que presentan un intervalo de lipofilia adecuado. Por otra parte, conseguir que se establezca un elevado y constante flujo de difusión de fármacos a través de la piel es una tarea con una baja probabilidad de éxito, a menos que se comprometa la función de barrera protectora de la piel. Para mejorar la difusión de fármacos, se han descrito numerosas estrategias para aquellas moléculas que, debido a sus características fisicoquímicas, no pueden difundir a través de la piel a la velocidad adecuada y/o a las concentraciones suficientes para lograr su objetivo terapéutico (46). Por lo tanto, es necesaria la utilización de diferentes técnicas para superar la función barrera de la piel (17,20).

1.1. Estructura de la piel

La piel es el órgano más complejo y extenso del cuerpo humano; representa un 10% de la masa corporal total de un individuo adulto, pudiendo llegar a ocupar una superficie corporal de 2 m² en un individuo adulto, y pudiendo pesar hasta 4 kg (17). Según las diferentes zonas del cuerpo, su espesor puede variar en gran medida, desde los 0,05 mm de los párpados, hasta los 2 mm de las palmas de las manos (46).

Las funciones de la piel han sido revisadas ampliamente por varios autores (47–50). Entre ellas, la principal es constituir una envoltura de protección de las estructuras internas frente a golpes mecánicos y heridas, y a su vez, actuar como barrera de defensa frente a factores externos impidiendo la penetración de sustancias como microorganismos, agentes químicos, e incluso radiaciones, que pueden resultar dañinas para el tejido (46,50). Además de proporcionar una cubierta para la superficie corporal, la piel está implicada en la prevención de la pérdida de líquidos y electrolitos del medio interno y la regulación de la temperatura corporal.

La piel es un órgano multicapa, constituido por un epitelio estratificado compuesto por tres capas histológicamente diferentes junto con los llamados apéndices cutáneos, que son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas. Las tres capas que forman la piel, del exterior al interior, son la epidermis (tejido epitelial

superficial), la dermis (tejido conectivo profundo) y la hipodermis (tejido subcutáneo graso).

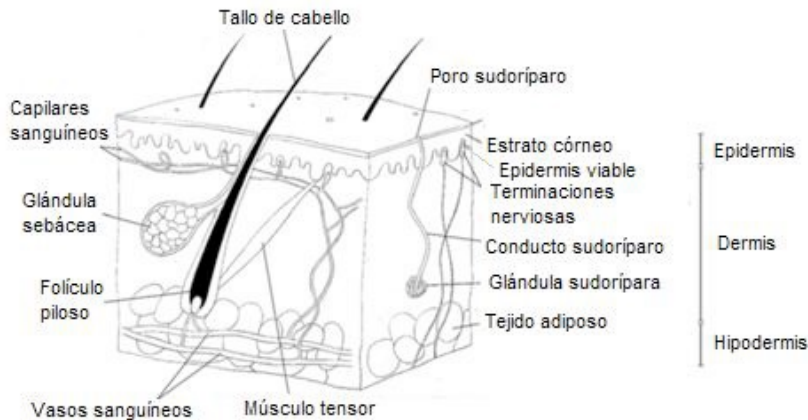


Figura 1. Diagrama esquemático de la piel humana con sus diferentes capas de células y apéndices (17).

a) Epidermis.

La epidermis es la capa más externa de la piel, es avascular y se subdivide en dos zonas: la epidermis viva (50-100 micras) que se compone principalmente de queratinocitos (95%) y, en menor medida de melanocitos células de Langerhans y las células de Merkel (51,52); y el SC, compuesto por células ricas en queratina y fisiológicamente inactivas, dispuestas en una matriz extracelular lipídica, denominadas corneocitos (51).

La epidermis se encuentra en continua renovación, gracias a un proceso de diferenciación celular mediante el cual los queratinocitos sufren una serie de cambios metabólicos y anatómicos. Estas células

se encuentran en continua formación en el estrato más profundo, el estrato basal, aunque solo un 15% de ellas interviene en este proceso, ya que el resto se encuentra en un estado de reposo, y solo se activan en condiciones de elevada necesidad proliferativa. Desde el estrato basal, las células van migrando y ascendiendo hacia el exterior de la piel, desde donde finalmente serán desprendidas. La epidermis sana tarda alrededor de 28 días en renovarse por completo, siendo este período de renovación mucho menor en enfermedades descamativas de la piel como la psoriasis, que se comentarán en mayor profundidad más adelante (50).

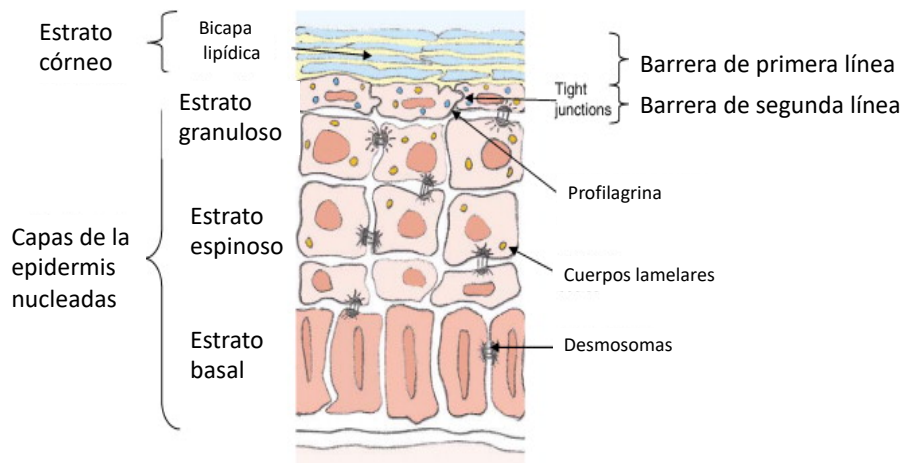


Figura 2. Estructura de la epidermis, formada por estrato basal, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato corneo (7).

Como se muestra en la Figura 2, se pueden distinguir cuatro estratos diferentes dentro de la epidermis. El estrato basal o germinal, el estrato granuloso y el estrato espinoso, que forman la denominada

epidermis viva o viable, y el estrato córneo, que compone la epidermis muerta o no viable (52,53).

Además, en algunas zonas del cuerpo, podemos encontrar, entre el estrato granuloso y el SC, otro estrato denominado lúcido (52).

- **Epidermis muerta:**

La epidermis muerta está formada por el SC. Es la capa más externa de la epidermis y es la principal responsable de la función barrera de la piel gracias a su lipofilia y a la elevada cohesión existente entre sus células (54). Es en esta capa donde tiene lugar la última etapa de la diferenciación de los queratinocitos a corneocitos, células planas muertas altamente queratinizadas y sin núcleo. En esta capa los corneocitos quedan incrustados en múltiples bicapas lipídicas de colesterol, ceramidas y ácidos grasos en una proporción equimolar (46). Esta organización del SC se conoce, comúnmente, como el modelo "brick and mortar", un sistema descrito originalmente por Michaels et al. (1975) (2). Los corneocitos se encuentran íntimamente unidos por los corneodesmosomas, los cuales sufren un paulatino proceso de degradación, lo que permite la descamación gradual de la piel (55). Este proceso dura aproximadamente 3 semanas (50,56).

La composición del SC y la elevada cohesión entre sus células son las responsables de la anteriormente comentada función barrera que impide la penetración de sustancias a través de la piel además de contrarrestar la pérdida de agua y sales (50) y por lo tanto es el factor limitante en la difusión de fármacos a través de la piel (21,53). En cuanto a su espesor, el SC está formado por entre 15 y 20 capas de

queratinocitos y cuando se seca tiene un espesor de 10-15 μm . En cambio, tras su hidratación, su espesor puede aumentar hasta 40 μm (55,57).

- **Epidermis viva:**

La capa más externa de la epidermis viva es el estrato lúcido. Está formada por muchos estratos de queratinocitos muertos con sus contornos poco definidos. Representa la zona de transición entre el estrato granuloso y el SC pero no se encuentra en todo el cuerpo, principalmente se desarrolla en la gruesa piel de las palmas de las manos y las plantas de los pies (52).

En el resto de las zonas donde no se presenta el estrato lúcido, inmediatamente debajo del SC se encuentra el estrato granuloso, formado por queratinocitos planos y poliédricos, parcialmente desprovistos de sus orgánulos y núcleos, y por lo tanto, sin capacidad de división (52). Estas células sintetizan gránulos de queratohialina, cuyo componente principal es la profilagrina, la cual se transforma en filagrina, proteína esencial para la fisiología y la biogénesis normal del SC, al facilitar la compresión celular de dicha capa (58).

A continuación se encuentra el estrato espinoso, cuyo nombre deriva de la apariencia espinosa que presentan sus células debido a los desmosomas que poseen (46). En este estrato, los queratinocitos han perdido casi toda la capacidad de división. En esta capa también se

pueden encontrar las células de Langerhans, que son células derivadas de la médula ósea con función inmunológica (52).

El estrato más interno de la epidermis viva es el estrato basal o germinativo, constituido por una sola capa de queratinocitos unidos a través de hemidesmosomas a la membrana basal, la cual limita la epidermis de la dermis (57). En este estrato se encuentran los queratinocitos con capacidad de división mediante mitosis. Además de los melanocitos, los encargados de la síntesis de melanina, y las células de Merkel, responsables de la percepción de ciertos estímulos (52).

b) Dermis

La dermis es una capa de tejido conectivo que comprende la mayor parte de la piel. Presenta 3-5 mm de espesor, se encuentra unida a la cara interna de la membrana basal y separa la dermis de la hipodermis. Es un tejido resistente y elástico, con capacidad protectora frente a golpes mecánicos.

Esta capa está compuesta principalmente por fibroblastos, las células responsables de la secreción de proteínas estructurales, como el colágeno, la elastina y los glucosaminoglicanos (59).

Además de la asociación de los fibroblastos con estas fibras proteicas, la dermis se compone también, aunque en menor medida, de células inmunitarias y células dendríticas cutáneas. También cabe

destacar que la dermis está altamente irrigada por el sistema sanguíneo e inervada por el sistema nervioso (56).

c) Hipodermis

Inmediatamente debajo de la dermis se encuentra la capa más interna de la piel, la hipodermis o tejido subcutáneo, la cual está compuesta principalmente por tejido graso y fibras de colágeno, que conectan esta estructura flexible con los tejidos adyacentes. Su función principal se basa en la protección térmica y mecánica y juega un papel importante en el almacenamiento de energía y en el metabolismo (46,60).

1.2. Anejos cutáneos

Dentro de los anejos cutáneos se encuentran las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas, las uñas, el pelo y los folículos pilosos.

Los folículos pilosos se componen de cinco capas de células epiteliales y su principal función es la de anclar el pelo en la dermis (59).

Cada folículo piloso (FP) tiene asociada una glándula sebácea que segrega sebo, el cual se compone de ácidos grasos libres,

triglicéridos y ceras, sustancias que protegen y lubrican la piel y mantiene el pH de la superficie próximo a 5 (61).

Las glándulas sudoríparas son abundantes a lo largo de toda la superficie cutánea, con una mayor proporción en las palmas las de las manos, plantas de los pies y axilas. Su principal función es la producción de sudor para facilitar el enfriamiento corporal por evaporación.

1.3. Rutas cutáneas de penetración de fármacos

El grado de permeabilidad de la piel para un compuesto depende de la ruta de absorción.

Se ha descrito dos vías principales de difusión de fármacos a través de la piel: la vía transapendicular y la vía transepidérmica. La ruta transapendicular incluye la permeación a través de las glándulas sudoríparas y a través de los folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas. Debido a que los anejos cutáneos apenas ocupan el 0,1%-1% del área superficial de la piel en algunas zonas del cuerpo, esta ruta se había considerado inicialmente insignificante para muchos autores (28,51,62). Sin embargo, en la última década, se ha visto que la penetración de compuestos a través de los folículos pilosos de la piel representa una ruta muy importante para la absorción de fármacos, puesto que las moléculas sólo tiene que atravesar la capa basal del folículo, una única capa no queratinizada fácil de atravesar (63,64).

Por el contrario, la vía transepidérmica es la vía por la que los compuestos difunden a través de la epidermis, siendo el SC la principal barrera. A su vez, esta ruta se divide en dos; en primer lugar, la vía intercelular, que es una manera continua a través de los dominios de lípidos intercelulares ya que el fármaco tiene que disolverse en la matriz lipídica que mantiene unidos los corneocitos y así ir difundiendo hacia el interior, y en segundo lugar la vía transcelular, por la cual los compuestos atraviesan tanto los queratinocitos como los lípidos intercelulares (Figura 4). La vía transcelular no sólo requiere el reparto y difusión a través de los queratinocitos, sino que también a través de los lípidos intercelulares. Por lo tanto, los lípidos intercelulares desempeñan un papel importante en la naturaleza de barrera del SC (21). Por la ruta intercelular, las moléculas siguen un camino continuo pero tortuoso entre los corneocitos teniendo que recorrer una mayor distancia que por la vía transcelular. A pesar de ello, esta es la ruta que recorren la mayoría de las moléculas capaces de difundir a través de la piel, ya que el fármaco solo sufre un proceso de reparto en un tipo de medio, a través del cual difunde hacia el interior del organismo.

Cabe señalar que un compuesto puede penetrar a través de la piel simultáneamente por las diferentes rutas, dado que éstas no son consideradas exclusivas unas de otras. Las rutas a las que se hace referencia se resumen en el siguiente esquema y en la Figura 3.

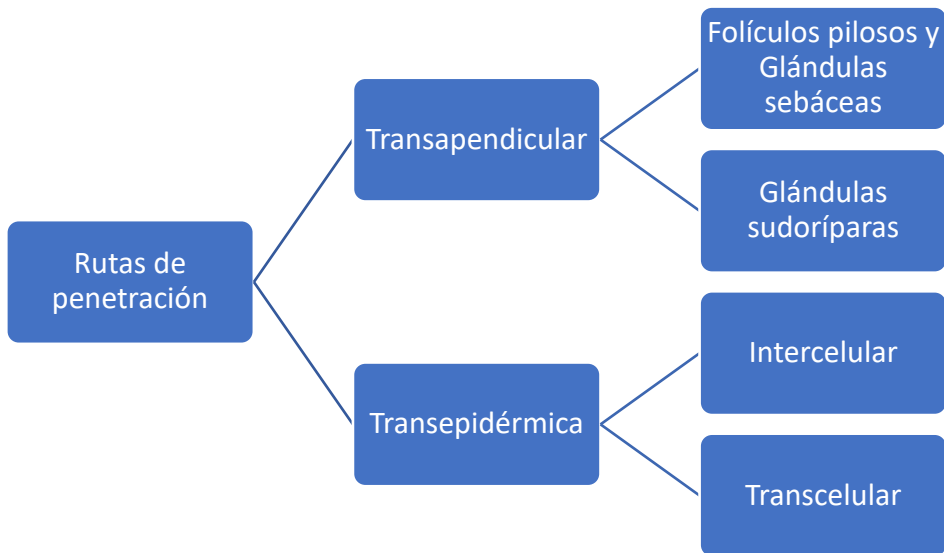


Figura 3. Esquema de rutas cutáneas de penetración.

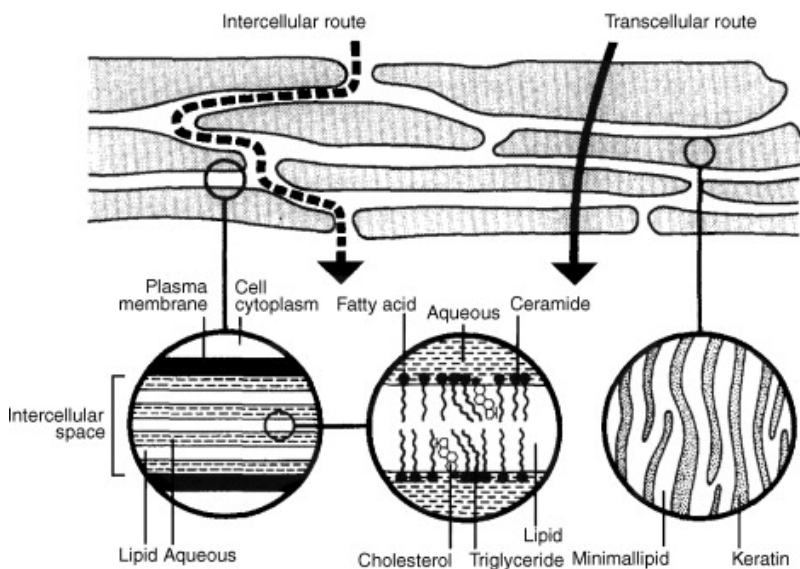


Figura 4. Esquema del modelo de "ladrillo y cemento" del SC con organización laminar simplificada de dominios intercelulares que muestran los principales lípidos del SC. También muestra las posibles rutas de permeación de fármacos a través del SC; la ruta transcelular y la intercelular (14).

Por otro lado, la ruta transepidérmica es la que ha sido considerada como la ruta que siguen la mayoría de los compuestos para difundir a través del SC. Dicha ruta se subdivide en dos posibles recorridos de penetración de fármacos: la ruta transcelular, por la cual los compuestos atraviesan tanto los queratinocitos como los lípidos intercelulares, y una segunda ruta, la intercelular, donde el fármaco tiene que disolverse en la matriz extracelular lipídica y, así, ir difundiendo hacia el interior (59).

Con el fin de aumentar las posibilidades de absorción transepidérmica, se han desarrollado numerosas estrategias que se componen de métodos pasivos y métodos activos. Estos métodos incluyen el uso de medios físicos como la iontoforesis o sonoforesis entre otros, medios químicos al hacer uso de agentes potenciadores de la penetración (tensoactivos y disolventes orgánicos) u oclusión del SC, y medios tecnológicos mediante la formulación de liposomas, transfersomas y etosomas (31).

1.4. Difusión transdérmica de fármacos

La permeación en la piel tiene lugar principalmente por difusión pasiva. Este proceso de difusión pasiva depende tanto de la piel como de las características fisicoquímicas de las moléculas, tales como su PM, su grado de ionización y su coeficiente de reparto (65).

Hay que tener en cuenta que el SC es una zona compleja, con compartimentos lipídicos (bicapa lipídica) y compartimentos acuosos (corneocitos) íntimamente relacionados entre sí. Por ello, toda partícula capaz de cruzar el SC ha de seguir un camino tortuoso entre los diferentes elementos. El PM es inversamente proporcional a la difusión de moléculas. De hecho, estas deben tener un PM < 500 Da para difundir de forma pasiva por el SC y un coeficiente de reparto intermedio, es decir, un valor de logP (octanol-agua) entre 1-3 lo que maximiza el flujo a través de esta capa (18).

Así pues, las propiedades idóneas que debe presentar una molécula para lograr una óptima difusión a través del SC son: bajo PM (PM < 500 Da), buena solubilidad en agua y en lípidos, es decir, un coeficiente de reparto intermedio, y un bajo punto de fusión (66).

Existe un modelo que caracteriza la permeabilidad de los fármacos mediante difusión pasiva a través de la piel, el cual se basa en la aplicación de la primera ley de Fick, que establece que en medios isotrópicos, la velocidad de transferencia de la sustancia que difunde a través de una superficie de área igual a 1, es proporcional al incremento de concentración (18). La ecuación representativa de este tipo de procesos es:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot P \cdot C}{L}$$

Ecuación 1

Donde dM/dt es la velocidad de penetración por unidad de superficie; D el coeficiente de difusión del fármaco; P el coeficiente de reparto del fármaco en la piel y el vehículo; C la concentración del fármaco en el vehículo y L la longitud del camino difusional.

Para estimar la capacidad de la molécula para atravesar los diferentes estratos que constituyen la piel, se determina su coeficiente de permeabilidad (K_p). Dicho coeficiente es una constante que engloba a P , D y L .

$$K_p = \frac{J}{C} = \frac{D \cdot P}{L}$$

Ecuación 2

Así pues, según este modelo, se puede establecer que las características del fármaco más relevantes en el proceso de permeación son: La concentración del fármaco en el vehículo, el coeficiente de difusión, el coeficiente de reparto vehículo-membrana y la influencia del pH en casos de fármacos ionizables (61).

2. Nanotecnología aplicada a la administración tópica de fármacos

Debido a la gran eficiencia de la piel como barrera protectora, la administración transdérmica de fármacos es una vía bastante limitada. Para mejorar esta potente vía de administración se ha desarrollado diversas estrategias, que se pueden dividir en dos grupos: la utilización de promotores químicos o la utilización de medios físicos como iontoforesis, electroporación, magnetoforesis, entre otros (67,68). No obstante, en las últimas décadas se ha otorgado una creciente importancia al desarrollo de vectores de fármacos en escala nanométrica, y sus aplicaciones en absorción transdérmica. Dentro de este grupo, se engloban los liposomas, como uno de los vectores con mejores propiedades para este fin, sobre los que se ha desarrollado este trabajo (53).

2.1. Liposomas como sistemas promotores de liberación transdérmica

Desde hace más de 40 años, cuando en el año 1960 el equipo de Alec D. Bangham observó por primera vez la capacidad de los fosfolípidos para formar estructuras de doble capa cerrada en sistemas acuosos, los liposomas ha sido un sistema de vectorización de fármacos muy estudiado y forman, hoy en día, un campo de intensa investigación. Actualmente los liposomas se consideran como el

sistema portador de fármacos más exitoso conocido hasta la fecha, con numerosas aplicaciones terapéuticas (29,69).

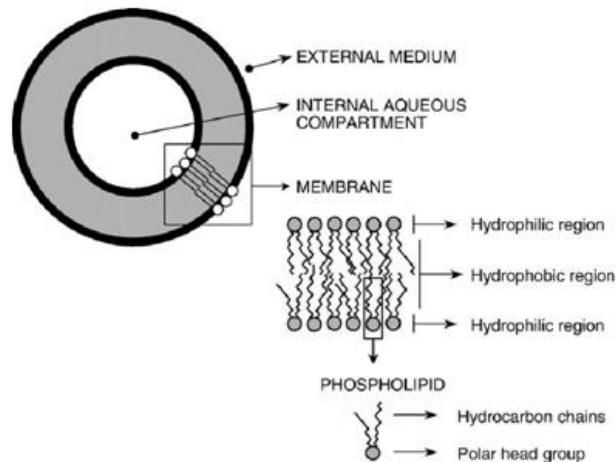


Figura 5. Diagrama de la estructura básica y composición de un liposoma.

Los liposomas son pequeñas vesículas microscópicas de una o más bicapas lipídicas formadas por fosfolípidos que encierran en su interior un núcleo acuoso (70). Estos fosfolípidos son el principal componente de los liposomas y le otorgan unas determinadas características fisicoquímicas que repercuten en su comportamiento y en su efectividad como sistemas de liberación (71). Los liposomas generalmente se pueden clasificar según su tamaño (partículas pequeñas, medianas o grandes), en base al número de bicapas lipídicas (uni, oligo o multi laminar) y en base a los fosfolípidos que las constituyen (neutros, aniónicos, catiónicos) (70). Las Vesículas unilamelares pequeñas (SUV) se componen de una sola bicapa lipídica con un diámetro medio de 25 a 100 nm. Las vesículas unilaminares

grandes (LUV), también constan de una bicapa lipídica y son de tamaño superior a 100 nm, mientras que las vesículas multilaminares (MLV) se componen de varias bicapas lipídicas concéntricas y miden entre 1 y 5 micras (Figura 6) (29).

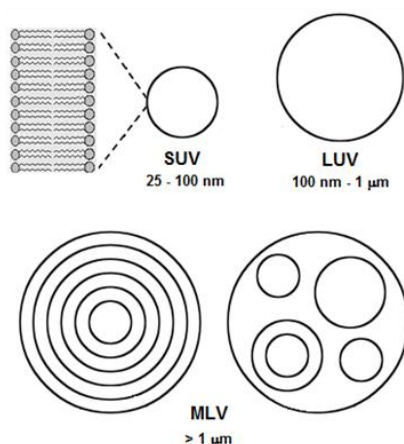


Figura 6. Clasificación de liposomas de acuerdo con su diámetro medio y el número de bicapas.

La composición de estas partículas influye en sus propiedades físico-químicas (carga superficial, lamelaridad, elasticidad, etc), que caracterizarán su comportamiento y eficacia como sistemas de liberación (71,72).

Los liposomas son transportadores muy versátiles ya que presentan capacidad para encapsular tanto fármacos hidrófilos como lipófilos. Los fármacos hidrosolubles se incorporaran en el compartimento acuoso interno, mientras que los fármacos liposolubles se incorporaran en las bicapas lipídicas (51,71).

En cuanto a su aplicación en la administración tópica de medicamentos, las formulaciones de liposomas para administración tópica actúan como una matriz de solubilización de fármacos poco solubles en agua, es decir, como potenciadores de la penetración y al mismo tiempo constituyendo un depósito local que puede ser más eficaz y menos tóxico en comparación con otras formulaciones convencionales (69).

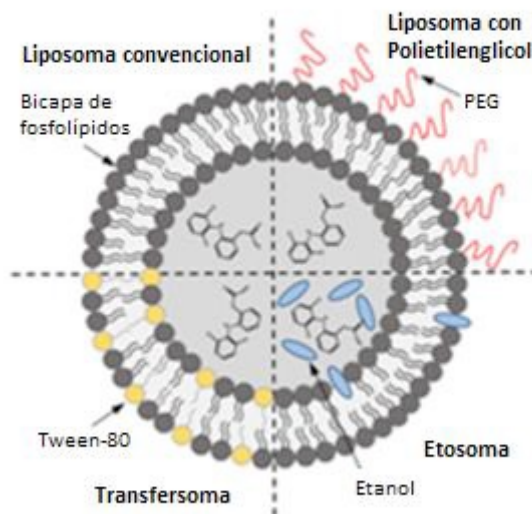


Figura 7. Esquema comparativo de la estructura de diferentes liposomas (39).

2.2. Mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración de fármacos.

Los liposomas pueden actuar como sistemas de administración de fármacos en la piel, diferentes mecanismos se han propuesto para describir este proceso (Figura 8). En la Tabla 1 se comentan los diferentes mecanismos propuestos (21).

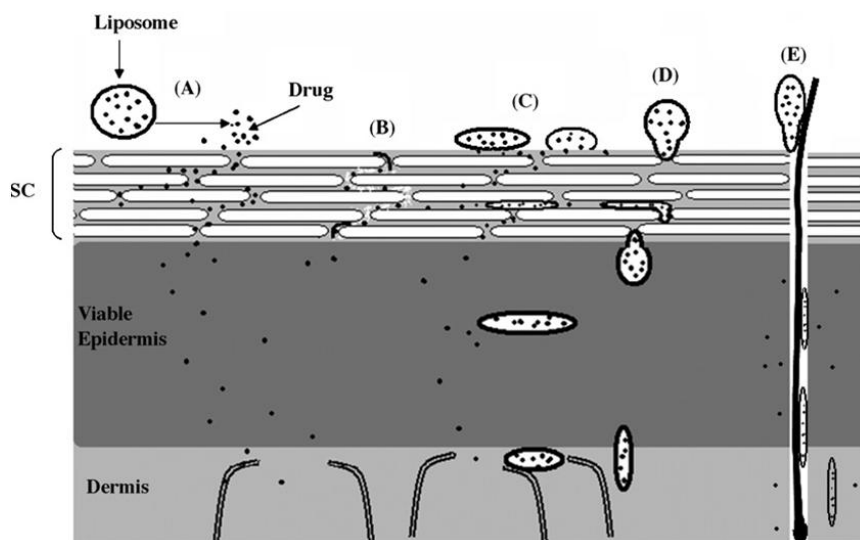


Figura 8. Posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración de fármacos sobre la piel. (A) es el mecanismo de fármaco libre, (B) es el proceso de potenciar la penetración de los componentes de liposomas, (C) indica la adsorción de vesículas y/o la fusión con el estrato córneo (SC), (D) ilustra la penetración de la vesícula intacta en y/o a través de la piel intacta y (E) ilustra la penetración de la vesícula por vía trans-apéndice (73).

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

Tabla 1. Mecanismos de acción de liposomas como sistemas de liberación de fármaco en piel – adaptación- (73).

Mecanismo	Descripción
(A) Fármaco libre	El fármaco penetra en la piel de forma independiente después de salir de las vesículas (74). Se ha observado que la permeabilidad transdérmica a través de este mecanismo es insignificante (75).
(B) Promoción de la absorción de fármacos	Kato et al. (1987) descubrió que la lecitina potencia la absorción transdérmica reduciendo la función barrera de la piel. Observó cambios en las ultraestructuras de los lípidos intercelulares tras la aplicación de las vesículas, lo que sugiere un efecto promotor de la absorción (76). También se han realizado estudios de permeabilidad cutánea con liposomas sin y con PC. Estos últimos multiplicaron por 8 la permeabilidad del fármaco (75). Diferentes estudios muestran que si el fármaco está fuera de la vesícula o los componentes del liposoma están en solución, la permeabilidad del fármaco no se ve aumentada (77–79).
(C) Adsorción vesicular y/o fusión con el SC	Las vesículas pueden adsorberse a la superficie del SC y transferir el fármaco directamente a partir de las vesículas hacia la piel, o las vesículas pueden fusionarse y mezclarse con la matriz lipídica del SC, favoreciendo el proceso de reparto del fármaco en la piel.
(D) Penetración vesicular intacta en piel	La posibilidad de que las vesículas intactas penetren la piel humana se sugirió desde el primer momento (Mezei y Gulasekharam, 1980, 1982) (80,81). Diversos autores proponen que los liposomas que llevan la carga de fármaco son capaces de difundir de forma intacta a través de la epidermis. Mediante micrografía electrónica se ha mostrado la presencia de liposomas intactos en la dermis (82).
(E) Penetración trans-ependicular	Se ha sugerido que las rutas de trans-ependiculares no juegan un papel importante en la administración transdérmica de liposomas, ya que no se han observado diferencias entre animales y humanos de diferente densidad de folículos pilosos (22). Sin embargo, la penetración de la vesícula en los folículos pilosos, pero no necesariamente a través de ellos, se demuestra en numerosos estudios (22,23,30,83).

2.3. Nuevos Sistemas liposomales

En general, los liposomas convencionales tienen poca utilidad como portadores de fármacos para la administración a través de la piel, al quedar retenidos en las capas superiores del SC y presentar baja penetración en las capas más profundas de la piel. Por ello tras muchas investigaciones se han desarrollado otras estructuras liposomales cuya estructura permite cubrir este déficit (84).

2.3.1. *Liposomas ultraflexibles o transfersomas*

Los transfersomas son un tipo de vesículas descritas inicialmente por Cecv G. y Blume en G. 1992 (85) compuestas por fosfolípidos y un agente activador denominado “edge activator” o “activador de borde”, que es un tensioactivo de cadena, tales como colato de sodio, desoxicolato, Span® 80 o Tween 80®. Este tensioactivo se encarga de desestabilizar la bicapa lipídica que compone el liposoma, aumentando así su deformabilidad y proporcionando una mayor flexibilidad en comparación con los liposomas convencionales (71,85,86).

Según estos autores, el gradiente osmótico causado por la diferencia de agua entre la superficie de la piel y el interior de la piel constituye la fuerza impulsora que permite la penetración de este tipo de liposomas (87). Pese a que la mayoría de compuestos penetran la piel de forma más eficaz bajo condiciones de oclusión, estas vesículas

únicamente podrán penetrar a través de las capas de la piel en condiciones de no oclusividad, para permitir la evaporación del exceso de agua de la formulación en la que se encuentran y mantener así el gradiente osmótico (24).

La penetración de los transfersomas a través de la piel puede explicarse mediante dos posibles mecanismos. En primer lugar, la adherencia a la superficie de la piel y desorganización de los componentes de la bicapa lipídica del SC por la acción del tensioactivo y los fosfolípidos de la vesícula. En segundo lugar, la penetración de las vesículas intactas a través de los canales intercelulares de menor resistencia a la penetración y fusión con los lípidos de la matriz (21,60). A pesar de ello, otros autores afirman que estos liposomas penetran el SC por la vía intracelular o transcelular (25).

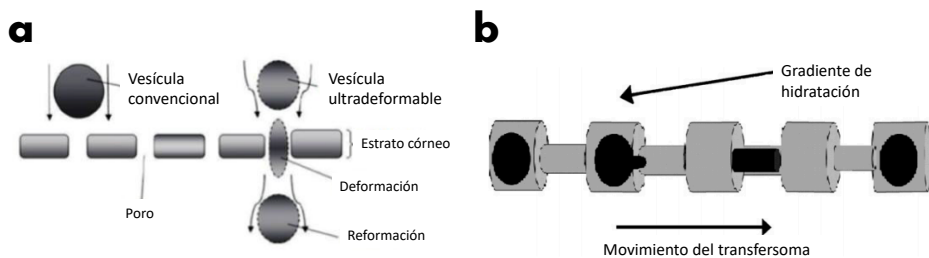


Figura 9. a) Deformabilidad en la piel de los transfersomas respecto a los liposomas convencionales; b) Efecto de gradiente de hidratación (73,88).

2.3.2. Etosomas

Los etosomas son otra modificación de los liposomas clásicos. Estos se componen de fosfolípidos, una elevada proporción de etanol (20 - 45%) y agua. El etanol en elevada concentración actúa como promotor químico al penetrar en los lípidos de la membrana celular, desestructurando las bicapas lipídicas del SC, y confiere a los etosomas las características que derivan en una mejor capacidad de penetración transdérmica en comparación con los liposomas convencionales: una carga neta superficial negativa, un menor tamaño y una mayor estabilidad, y eficacia de encapsulación (EE), sobre todo para fármacos lipófilos. Gracias a todo ello, los etosomas consiguen llegar a las capas más profundas de la piel, donde se fusionan con los lípidos de la piel, liberando así el fármaco que se encuentre encapsulado (84,87).

El transporte de los fármacos se puede modular mediante la alteración de las proporciones de alcohol/agua o alcohol-poliol/agua. Algunos fosfolípidos preferidos son fosfolípidos de soja tales como Phospholipon 90 (PL-90). Se emplea normalmente en un intervalo de 0,5-10% w/w. El colesterol en concentraciones que oscilan entre 0,1-1% también se puede añadir a la preparación. Los ejemplos de alcoholes, que se pueden utilizar, incluyen etanol y alcohol isopropílico. También glicoles, y tensioactivos no iónicos (éteres de alquilo-PEG) se pueden combinar con los fosfolípidos en estas preparaciones (27).

El mecanismo de absorción del fármaco a partir de etosomas no está claro. La absorción del fármaco probablemente se produce por dos efectos (Figura 10):

- a) *Efecto del etanol*, que actúa como un potenciador de la penetración a través de la piel. El mecanismo de su efecto potenciador de la penetración es bien conocido. El etanol penetra entre los lípidos intercelulares y aumenta la fluidez de los lípidos de la membrana celular, disminuyendo la densidad de los lípidos de múltiples capas de la membrana de la célula y fluidificando el cemento intercelular (25,27).
- b) *Efecto del etosoma*, que consiste en el aumento de la fluidez de los lípidos de la membrana celular causada por el etanol de los etosomas resultando en un aumento de la permeabilidad de la piel, favoreciendo que los etosomas penetren muy fácilmente dentro de las capas profundas de la piel, donde se consiguen fusionar con los lípidos de la piel y liberar los fármacos (25,27).

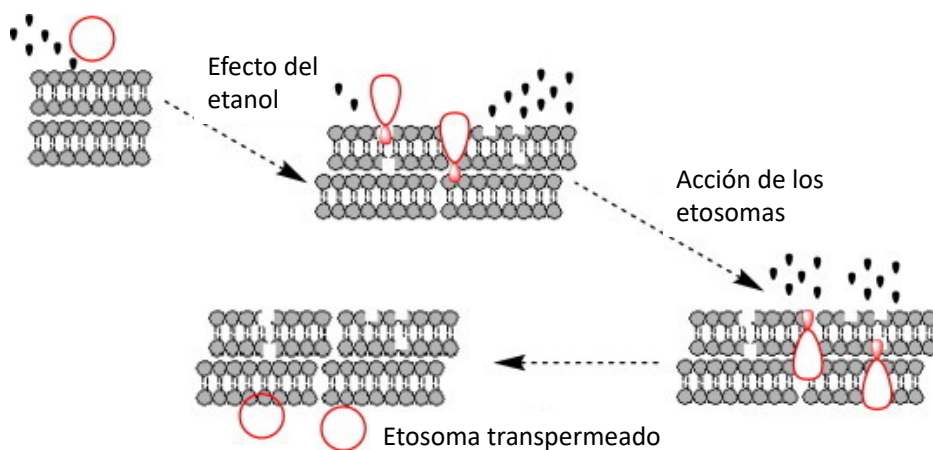


Figura 10. Esquema del modelo de penetración a través de la piel del sistema liposomal (25).

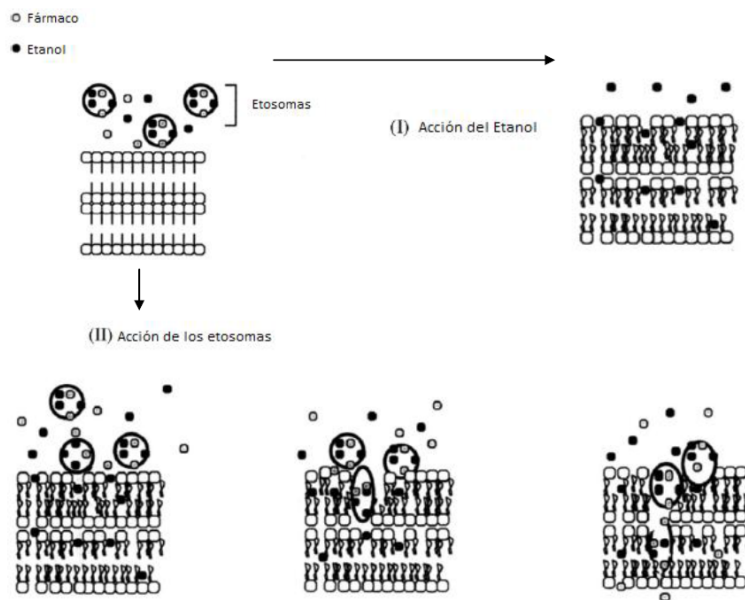


Figura 11. Modelo propuesto para la difusión de los etosomas a través de la piel (84).

2.4. Preparación de liposomas

La elección correcta del método de preparación de liposomas depende de los siguientes parámetros:

- 1) Las características fisicoquímicas del material a encapsular y las de los ingredientes de los liposomas;
- 2) La naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas;
- 3) La concentración efectiva del fármaco a encapsular y su toxicidad;

- 4) Los procesos adicionales que ello suponga durante la administración de las vesículas;
- 5) Tamaño óptimo, polidispersión y vida útil de las vesículas de la aplicación prevista y
- 6) La reproducibilidad entre lotes y la posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes (89).

Los liposomas se fabrican en su mayoría utilizando diversos procedimientos en los que los fármacos hidrófilos quedan atrapados mediante el uso de una solución acuosa de estos materiales como fluido hidratante o por la adición de una solución de fármaco en algún momento durante la fabricación de los liposomas. Generalmente, los fármacos lipófilos se solubilizan en la solución orgánica de los lípidos constitutivos y después se evaporan a una película de lípido que contiene el fármaco seco seguido de hidratación y agitación. Las dispersiones de lípidos obtenidos permiten obtener MLVs con un número de bicapas alta y variable, y su distribución de tamaños es amplia. Si se suministra a estos sistemas una energía adicional, se puede desestabilizar las estructuras multilaminares y formar estructuras de bicapa individuales (por ejemplo, sonicación por ultrasonidos, extrusión a través de filtros de policarbonato de tamaño definido). Si se somete a los MLVs a ultrasonidos de altas frecuencias durante un determinado período de tiempo, se puede obtener liposomas de tipo SUVs. Por otro lado, las LUVs se obtienen generalmente por extrusión de MLVs (Figura 12)(90).

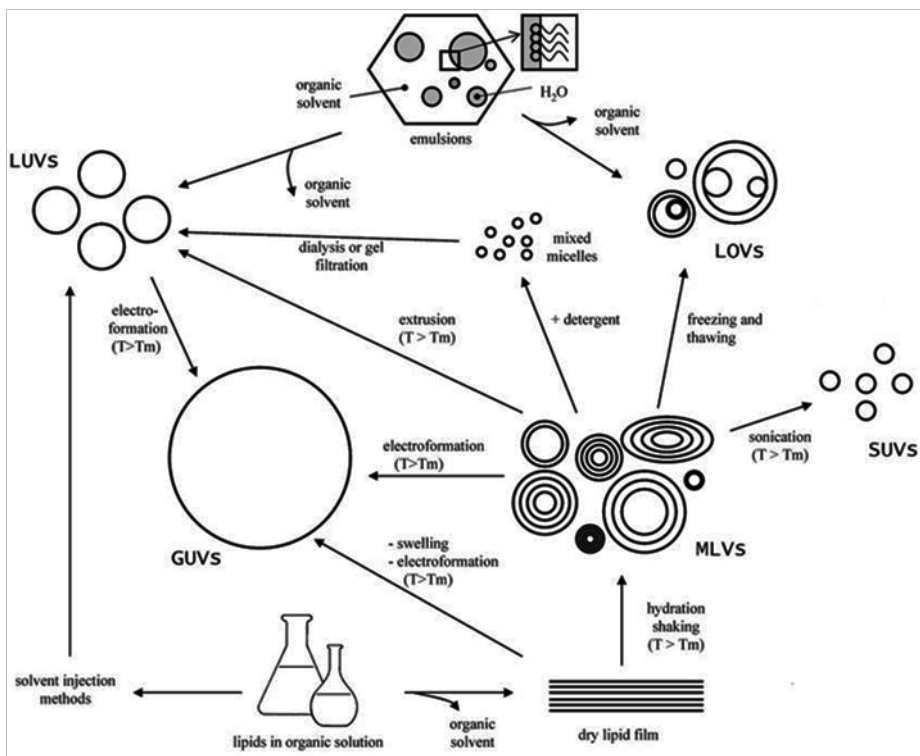


Figura 12. Representación de los diferentes protocolos de preparación para la obtención de diferentes vesículas liposomales. LOVs, vesículas oligolaminares largas; GUVs: vesículas unilamelares gigantes (90).

En la preparación de liposomas es muy importante que la membrana se mantenga en la fase gel-líquida desordenada (Figura 13). Las membranas de lípidos que existentes en la fase gel-cristalina ordenada tienen propiedades mecánicas particulares (alta rigidez, alto empaquetado lateral) que no favorecen la preparación de vesículas liposomales. Se ha demostrado que cuando las MLV se someten a sonicación o extrusión a temperaturas inferiores a la temperatura de transición principal (T_m), la eficiencia de la generación de SUV o LUV es extremadamente baja (90).

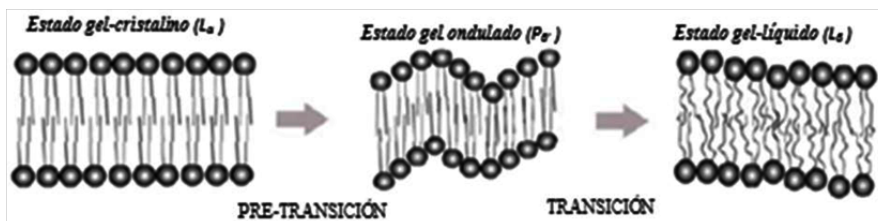


Figura 13. Fases del lípido en función de la temperatura. El cambio de fase se debe a un desorden de las cadenas hidrocarbonadas que forman parte de los lípidos debido a un cambio de temperatura.

3. Hidrogeles como sistemas farmacéuticos

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales que se obtienen a partir de polímeros hidrófilos, bien sean naturales o sintéticos, los cuales pueden absorber y retener una cantidad significativa de agua. Esta capacidad de hidratación es el resultado de un equilibrio entre hidratación y fuerzas elásticas (91).

En su estructura presentan grupos funcionales (-OH, -COOH, -CONH₂, ...) que en ambientes acuosos se hidratan sin que se disuelva el hidrogel, debido al entrecruzamiento de las cadenas de polímeros (92).

En el estado deshidratado, el hidrogel (xerogel) tiene una estructura cristalina y, cuando entra en contacto con un medio acuoso, tiende a absorber agua. Esta capacidad de hinchamiento proporciona alta permeabilidad para fármacos y metabolitos de bajo PM (93–95).

Debido a su biocompatibilidad y a su naturaleza blanda y elástica, que minimiza la irritación de tejidos, es considerado un sistema de características óptimas para su aplicación en la biomedicina, y concretamente para la administración tópica de sustancias (96).

Presentan una estructura altamente porosa, constituyendo un reservorio con elevada capacidad de carga de fármacos, protegiéndolos de la degradación ambiental y liberándolos posteriormente.

Los hidrogeles poseen múltiples ventajas como sistemas de liberación modificada de fármacos (97). Debido a ello, se pensó que podrían ser un buen sistema para albergar los sistemas liposomales, formando una forma farmacéutica óptima para la liberación sostenida de CyA ya que, en cualquier otro tipo de formulación semisólida, los sistemas liposomales se desestabilizan.

En función del origen de los polímeros, los hidrogeles pueden ser naturales o sintéticos. Entre los polímeros naturales se encuentran: gelatina, chitosano, ácido hialurónico, colágeno o celulosa. Entre los sintéticos está el ácido acrílico, el vinil acetato, etc. (98,99). También existen derivados sintéticos de polímeros naturales, como es el caso de la hidroxipropilmetilcelulosa, que es el polímero que se ha seleccionado para este trabajo.

Hidroxipropilmetilcelulosa, **HPMC o hipromelosa**: es una metilcelulosa que ha sido modificada por tratamiento álcali y óxido de propileno, por lo tanto, se considera una modificación sintética de un

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

polímero natural, la celulosa. Se trata de un polvo blanquecino, con forma de gránulos o finas fibras y que en contacto con agua se hincha formando soluciones coloidales viscosas. Su viscosidad está directamente relacionada con los grupos metoxi que contiene (Figura 14). Se utiliza ampliamente para la preparación de formas farmacéuticas orales y tópicas (100).

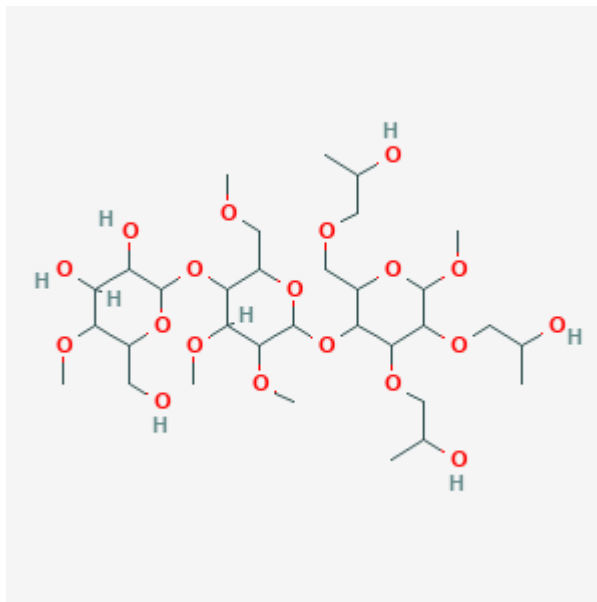


Figura 14. Estructura química de la HPMC o hipromelosa, con fórmula molecular $C_{32}H_{60}O_{19}$ (101)

Este polímero tiene diversas aplicaciones comerciales, por ejemplo, se utiliza ampliamente en formulaciones oftálmicas, ya que presenta propiedades similares a la metilcelulosa, pero sus mucílagos tienen mayor claridad y menor cantidad de fibras no dispersables. Por eso se utiliza como agente humectante y espesante en colirios y lágrimas artificiales y como humectante en lentes de contacto y lubricante de prótesis oculares (100). Es el caso del Artific[®], un colirio

de HPMC indicado para el alivio sintomático de la irritación y la sequedad ocular.

Además de sus aplicaciones en formulaciones oftálmicas, se utiliza como agente humectante en suspensiones, estabilizante, espesante y emulgente de geles y pomadas, y como coloide protector, ya que previene la coalescencia o aglomeración de gotículas y partículas, inhibiendo así la formación de sedimentos. También se utiliza ampliamente en la industria cosmética (94).

Hidrogeles como sistemas de liberación controlada para administración tópica:

Cuando se administra una formulación sobre la piel, se puede obtener un efecto local (administración tópica) si el fármaco queda retenido en las capas superficiales de la misma o bien un efecto sistémico (administración transdérmica), si el fármaco atraviesa los diferentes estratos y accede a los vasos sanguíneos.

La administración tópica de fármacos mediante el uso de hidrogeles ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, se utilizó un hidrogel de carbopol con microesponjas con fluconazol para el tratamiento de infecciones fúngicas tópicas, evitando efectos adversos sistémicos e interacciones (102). También se han propuesto hidrogeles de alcohol de polivinilo entrecruzados con glutaldehído para el tratamiento tópico antibacteriano con nitrofurazona (103). U otros hidrogeles

también de alcohol de polivinilo y dextrano entrecruzados para el tratamiento con sulfadiazina argéntica (104).

La liberación de fármacos a través de liposomas en sistemas hidrogelificados también se ha estudiado con anterioridad. Por ejemplo, se han utilizado nanopartículas de oro carboxiladas con liposomas estabilizados en su superficie, integrados en un hidrogel de acrilamida. Estos sistemas demostraron ausencia de irritación en piel en un estudio *in vivo* con ratones, manteniendo la integridad estructural de los liposomas y permitiendo controlar su velocidad de liberación mediante la variación de la concentración reticular (105). También se han incluido liposomas de PC con hidrocortisona en hidrogeles de carbopol. Estos sistemas, a diferencia de las formulaciones convencionales, obtuvieron una permeabilidad percutánea y unos niveles plasmáticos de corticoide significativamente inferiores, con unas concentraciones en piel mayores y constantes durante 8 horas (106).

Los hidrogeles son, por tanto, un buen punto de partida para formular adecuadamente y poder administrar los liposomas de forma tópica con un objetivo terapéutico local en una forma farmacéutica semisólida, de fácil aplicación y capaz de retener los liposomas sobre la superficie de la piel, mediante la formación de una película polimérica sobre la misma (107,108).

4. Métodos *in vitro* para el estudio de la permeación transdérmica

Los modelos experimentales *in vitro* tienen como finalidad la obtención de datos que se relacionen con la absorción obtenida *in vivo*. Presentan ventajas importantes frente a los modelos *in vivo*, como el control de las condiciones de ensayo, mayor rapidez, la utilización de un menor número de muestras de piel, la utilización de pequeñas cantidades de fármaco y excipientes, y la menor complejidad en el análisis de las muestras. Sin embargo, la mayor limitación que tienen es que no reproducen la complejidad metabólica de un ser vivo ni sus relaciones con el medio ambiente.

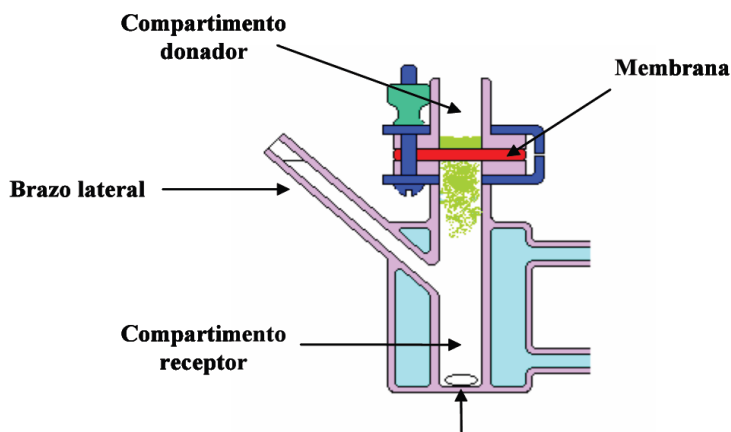


Figura 15. Diseño de la célula estática vertical de difusión tipo Franz.

Para los estudios de absorción a través de la piel, el método *in vitro* más utilizado y aceptado por la comunidad científica son las

células (o celdas) de difusión, ya sean de tipo estático o dinámico. Para los ensayos de permeabilidad, en el presente trabajo se ha usado la CDF (Figura 15).

Las CDF representan, desde su desarrollo en 1975, uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y desde los últimos años, también la liberación de fármacos. Constituyen un sistema compuesto por dos cámaras, una dadora y otra receptora, separadas por una membrana de origen animal, humano o sintético, que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra. En el compartimento superior se coloca la formulación que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras correspondientes, que posteriormente se cuantifican mediante técnicas analíticas adecuadas. Entre los parámetros que influyen en la difusión de los fármacos, están la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor (109).

Dentro de este método se puede distinguir dos tipos de ensayo, en función de la cantidad de fármaco suministrado al compartimento dador: método de dosis infinita y de dosis finita. En este trabajo se ha usado el método de la *dosis infinita*, que supone la existencia de una concentración constante de sustancia penetrante en el compartimento dador y el mantenimiento de las condiciones sumidero (condiciones alejadas de la saturación del fármaco en el medio de disolución) durante todo el ensayo en el compartimento

receptor. Se admite una disminución de la concentración en la fase dadora, o un incremento de esta en la fase receptora no superior al 10%, ya que ello supone una variación importante en las condiciones de flujo de orden cero. Así, tras un periodo inicial, llamado periodo de latencia, se establece un gradiente de concentración a través de la membrana y, por tanto, la velocidad de penetración de la sustancia se mantiene constante. Una variación de este método consiste en renovar periódicamente el compartimento dador, para asegurarse que la concentración de fármaco en el dador es siempre mayor que en el receptor. Esto nos permite calcular el flujo en estado estacionario de forma sencilla. El método de la *dosis finita* consiste en añadir una concentración de fármaco insuficiente para mantener las condiciones sumidero, por tanto, con el tiempo llega a equilibrarse a la concentración del receptor. Este método, aunque más próximo a la situación real, requiere una distribución muy homogénea en toda el área de absorción, y cálculos mucho más complejos, lo que también dificulta en gran medida la interpretación de la información obtenida (110).

5. Estudio de biocompatibilidad de formulaciones liposomales

Los sistemas liposomales son buenos candidatos para mejorar la absorción transdérmica de fármacos debido a su excelente biocompatibilidad y facilidad para integrarse con los lípidos de la piel (111). Demostrando, en algunos casos, ser más biocompatibles que el fármaco en solución (112), ya que están compuestos principalmente por sustancias consideradas seguras, como son los fosfolípidos (113). A pesar de ello, al modificar su estructura y añadir diferentes componentes, su toxicidad podría verse aumentada. La interacción de estas sustancias con proteínas podría desencadenar una respuesta inmunitaria con una consecuente hipersensibilidad. La biocompatibilidad o toxicidad final es el resultado de la combinación de diferentes propiedades de estos sistemas, como es el tamaño, carga superficial y composición (114,115). Por todo ello, dentro del proceso de diseño y desarrollo de sistemas liposomales, es necesario la evaluar la biocompatibilidad.

La toxicidad puede ser evaluada *in vitro* mediante ensayos de viabilidad en líneas celulares como la cepa de fibroblastos diploides MLD y la de fibroblastos de ratón 3T3 (116,117), líneas de queratinocitos, como la NEB-1 (118), células de melanoma murino B16F10 (119) y macrófagos murinos RAW 264.7 (120,121). Estos ensayos incluyen pruebas con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) o lactato deshidrogenasa (LDH) (122–124).

Los resultados de viabilidad celular son expresados como porcentaje de viabilidad, siendo considerados no tóxicos con un porcentaje superior al 80% e inferior al 40% como citotóxicos (125). Como limitación de estos ensayos, cabe destacar la capacidad de estos sistemas liposomales para estimular e inducir el crecimiento celular debido a la naturaleza de sus componentes lipídicos (126).

6. Enfermedades inflamatorias de la piel

Existen diferentes enfermedades inflamatorias de la piel con componente inmunológico o en ocasiones denominadas enfermedades autoinmunes de la piel. Entre ellas, las más relevantes son la psoriasis y la DA. Aunque también se incluyen otras menos comunes, como la dermatitis herpetiforme, pénfigo vulgar o vitíligo (127).

6.1 Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune mediada por las células T de la piel, cuyo inicio suele relacionarse con la alteración de la respuesta inmune de individuos genéticamente predispuestos, tras la exposición a ciertos desencadenantes ambientales.

Se estima que el 2,3% de los españoles están diagnosticados de psoriasis, siendo más prevalente la enfermedad en hombres (2,7%)

que en mujeres (1,9%) (128). Puede desarrollarse a cualquier edad, pero es más probable que aparezca entre los 15 y 30 años (128,129).

Esta enfermedad se caracteriza por producirse una hiperplasia de la epidermis debida a una hiperproliferación y diferenciación anormal de los queratinocitos que acaba conduciendo a un engrosamiento de la epidermis. En piel sana, el proceso de diferenciación de los queratinocitos requiere de 28 días, ya que los queratinocitos basales van dividiéndose y ascendiendo por la piel hasta llegar al estrato espinoso, donde cesan su ciclo celular para iniciar el proceso de diferenciación terminal, sintetizando proteínas específicas, liberando lípidos extracelulares y constituyendo la envoltura corneocítica. Sin embargo, en piel psoriásica este proceso ocurre en 3-5 días. Este limitado periodo, junto con la mayor proliferación y diferenciación incompleta de los queratinocitos hace que las células se vayan acumulando en la superficie cutánea, dando lugar a placas gruesas, enrojecidas y con presencia de abundantes escamas (130,131).

Se considera ésta una enfermedad de causa desconocida, con base genética e inmunomediada por linfocitos T, en la que influyen factores ambientales y psicosomáticos como desencadenantes (132). Estas lesiones se originan por la interacción entre diversas células y mediadores del sistema inmune, tanto en su forma innata como adaptativa, el epitelio y el tejido conectivo (133).

Esquemáticamente, existe una secuencia de pasos en la activación de los linfocitos T que da lugar al desarrollo de la psoriasis.

En individuos predispuestos, la activación de la respuesta inmune se inicia por la presencia de un antígeno que causa la maduración de las células epidérmicas presentadoras de antígenos, las células de Langerhans, y su posterior migración a los ganglios linfáticos locales. Es allí donde estas células presentan los antígenos a los linfocitos T indiferenciados, provocando su activación y posterior proliferación, y constituyéndose así una colonia de linfocitos T específicos contra ese antígeno. Estos linfocitos migran a través de la circulación hacia las áreas de inflamación cutánea donde, tras entrar en contacto con el antígeno implicado, liberan citocinas, provocando la proliferación y alteración de la maduración de los queratinocitos, la inflamación de polimorfonucleares y cambios vasculares característicos de las lesiones de psoriasis (132,133).

Como se muestra en la Figura 16, las células inmunes innatas y adaptativas contribuyen a la patogénesis de la psoriasis. Actualmente, se considera una enfermedad autoinmune inflamatoria modulada por la interleuquina 17 (IL-17), producida por los linfocitos T CD4+ (Th17). La infiltración de neutrófilos en la dermis es otra fuente de IL-17 en el proceso psoriásico. La activación de células inmunitarias, como células dendríticas, además de los propios queratinocitos, promueve la secreción de otros factores como la IL-23 y el TNF, que aumentan la respuesta de los Th17. Estos Th17 y sus citocinas asociadas tienen múltiples efectos sobre los queratinocitos. Además los Th17 interactúan con otras células inmunes y pueden atraer neutrófilos al lugar de la inflamación (134).

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

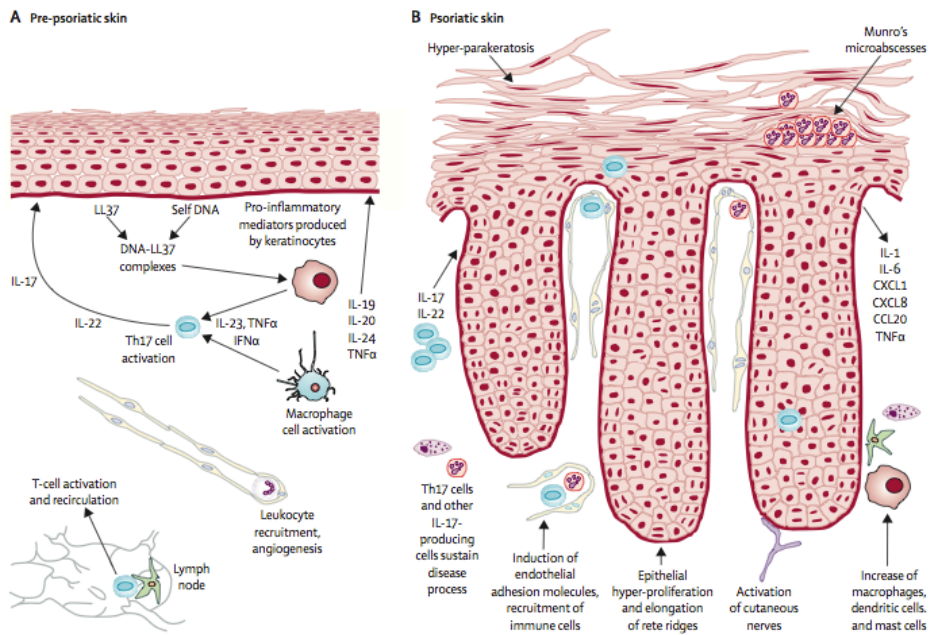


Figura 16. Patogénesis de la psoriasis. A) La compleja interacción de células cutáneas, macrófagos, células dendríticas, células T y demás células del sistema inmune liberan citocinas y quimiocinas que producen los primeros cambios en la piel. La diferenciación de células Th1 y Th17 es estimulada por las células dendríticas mediante IL-23. B) Los mediadores liberados por las células del sistema inmune inducen y mantienen las lesiones producidas en la piel psoriásica. A su vez, los queratinocitos amplían la respuesta inflamatoria a través de sus mediadores (135).

6.2 Dermatitis atópica

La DA es otra dermatosis inflamatoria, prurítica, de curso crónico, caracterizada por el desarrollo de lesiones de eczema con un patrón de distribución característico que afecta a individuos que presentan una hiperactividad cutánea frente a diversos factores ambientales (136). La prevalencia de la enfermedad se sitúa entre el 4% y el 20% de la población (137,138).

Los pacientes con DA presentan una alteración de las subpoblaciones de linfocitos T, ya que las reacciones inflamatorias propias de la DA están determinadas por una proliferación de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2). Estos individuos, cuando entran en contacto con un determinado alérgeno, producen una respuesta con formación de anticuerpos de clase IgE, desencadenando una respuesta de células Th2 con producción de IL-4, IL-5 y IL-13 y una disminución de IFN- γ . Estas citocinas estimularán la producción de IgE por parte de los linfocitos B, así bien esta IgE se unirá a mastocitos y basófilos desencadenando la respuesta inflamatoria (139).

Además de desarrollar anticuerpos de clase IgE frente a alérgenos alimentarios y aeroalérgenos los pacientes con DA desarrollan anticuerpos contra proteínas de los queratinocitos y de las células endoteliales que están presentes en alrededor del 25% de afectados. Estos hallazgos sugieren que la DA está en la frontera entre una enfermedad alérgica y una enfermedad autoinmune (140).

La filagrina es una proteína que se encuentra en el interior de la célula y se sintetiza durante el proceso de cornificación de la piel, a partir del polipéptido profilagrina, siendo esencial para la biogénesis y fisiología del SC normal. Se ha visto que los pacientes con alguna mutación de pérdida de función en el gen de la filagrina (FLG) presentan unos niveles menores de filagrina, lo que conlleva una menor función barrera del SC, siendo estas mutaciones el principal factor genético predisponente para la DA, siendo la deficiencia de la barrera cutánea un evento temprano importante en la fisiopatología del eccema y la alergia. (58,141,142).

7. Tratamientos de las enfermedades inflamatorias de la piel

7.1. Ciclosporina A

La CyA es un polipéptido cíclico constituido por 11 aminoácido y con un PM de 1203 Dalton, aislado en 1970 a partir del hongo *Tolypocladium infatum*. Según la clasificación anatómica, terapéutica, química (ATC) se clasifica dentro del grupo de inmunosupresores inhibidores de la calcineurina (143,144). Actúa en las células T disminuyendo la transcripción de citocinas (IL-2 e IFN γ), quimiocinas y factores de crecimiento. Inhibe la presentación antigénica y la función de los mastocitos (degranulación y producción de citocinas) (143).

Inicialmente este fármaco se utilizaba como tratamiento inmunosupresor con el fin de evitar el rechazo en pacientes trasplantados. Sin embargo, en 1997 la FDA autorizó su uso para nuevas indicaciones entre las que se encuentra el tratamiento de las dermatosis inflamatorias como la psoriasis y la DA (145). Además, existe evidencia de que es efectiva en muchas otras enfermedades inflamatorias de la piel, como es el caso de liquen plano erosivo de las mucosas, urticaria crónica idiopática, etc. (146). Pese a los nuevos usos autorizados, debido a sus grandes efectos secundarios, antes de iniciar el tratamiento con CyA se tiene que evaluar si el paciente es apto para el tratamiento, ya que solo se recurre al tratamiento con este fármaco en pacientes con dermatosis graves, que no pueden ser tratadas con

los tratamientos convencionales y que no presenten contraindicaciones (146,147).

En la piel con psoriasis o DA, tras la unión de una célula presentadora de antígenos a una célula TCD4+, se produce un aumento de la concentración de calcio citoplasmático, el cual se unirá a la calmodulina formando un complejo que activará la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio. Esta enzima activada es capaz de desfosforilar el Factor de Activación Nuclear de las células T (NFAT), el cual, una vez desfosforilado, migra al núcleo, interacciona con el ADN y, como consecuencia, activa los genes de transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-4 e INT- χ , entre otras (138,143,144).

La CyA difunde en el citoplasma de las células TCD4+ y forma un complejo con una proteína citoplasmática conocida como ciclofilina. Este complejo CyA-ciclofilina inhibe la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio, lo que se traduce en niveles más bajos del NFAT desfosforilado en los linfocitos T. En el caso de la psoriasis, la disminución del NFAT implica niveles más bajos de citocinas inflamatorias (148), teniendo elevada relevancia esta disminución de citosinas al tratarse de factores de activación de las células T en numerosos procesos inmunológicos, incluyendo la psoriasis.

En el caso de la DA, la disminución del NFAT provocada por la CyA implica niveles más bajos de citocinas inflamatorias Th2, presente en los pacientes atópicos, siendo las más importantes la IL-31, citocina que provoca picor, y la linfopoyetina estromal tímica, la cual activa las

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

neuronas sensoriales, conduciendo así la sensación de picor al cerebro, al regular su liberación desde el timo (138,149).

La utilización de CyA como tratamiento de la DA proporciona unas respuestas rápidas y eficaces, pero su uso se ve limitado debido a los efectos nefrotóxicos que puede presentar si se alcanzan concentraciones plasmáticas determinadas, como ocurre con los tratamientos sistémicos (73).

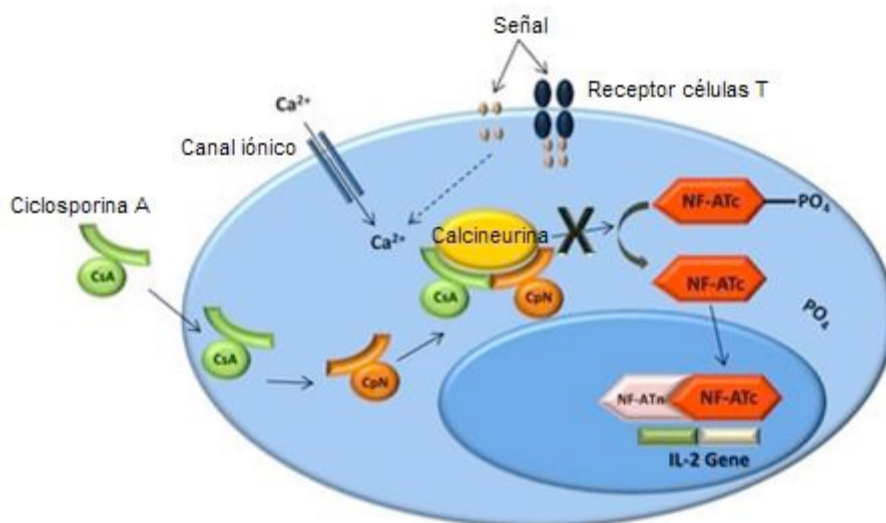


Figura 17. Mecanismo de acción de la Ciclosporina (Adaptación) (150).

Cuando la CyA es administrada por vía oral o parenteral, da lugar pues a efectos sistémicos importantes. Algunos de sus efectos adversos más graves son la nefrotoxicidad e hipertensión, debidos a una vasoconstricción sistémica, inducida por la CyA. Al tratarse de un

inmunosupresor, el tratamiento sistémico provoca una disminución en la eficacia del sistema inmune. Esta inmunodepresión aumenta la probabilidad de contraer enfermedades infecciosas, o de que se produzca la reactivación de infecciones latentes. A pesar de su eficacia, el balance beneficio-riesgo, derivado de estos efectos adversos graves, justifican las reticencias de los facultativos a la prescripción de CyA para el tratamiento de la psoriasis y DA, ya que su presentación comercial es únicamente sistémica, por vía oral o parenteral (148). La aplicación tópica de la CyA no ha resultado eficaz debido principalmente a su incapacidad para difundir de forma pasiva a través de piel intacta. Sin embargo, si es efectiva en lesiones ulceradas y en mucosas, donde el SC no supone una limitación a la absorción y la CyA puede acceder libremente hasta la dermis (146).

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

II.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo de la tesis doctoral que se presenta es desarrollar distintos tipos de sistemas de vesículas lipídicas ultraflexibles para conseguir administrar CyA a través de la piel.

Para ello se ha dividido el presente trabajo en los siguientes objetivos secundarios:

1. Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de CyA en las muestras experimentales.
2. Fabricar distintas formulaciones de sistemas liposomales ultraflexibles y convencionales, cargados con CyA y caracterizar sus propiedades.
3. Estudiar la estabilidad y el efecto de la liofilización sobre las características de las formulaciones liposomales.
4. Evaluar la biocompatibilidad de los diferentes sistemas liposomales mediante el estudio de la toxicidad en cultivos celulares.
5. Estudiar la distribución de CyA en las diferentes capas de la piel y el FP cuando es administrada mediante los nuevos sistemas liposomales.
6. Estudiar *in vitro* la permeabilidad transdérmica de CyA partir de los sistemas liposomales.

7. Desarrollar una formulación tipo hidrogel que contenga las diferentes vesículas liposomales, caracterizar su reología y estudiar la liberación de CyA.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Formulación de sistemas liposomales

Para la formulación de los sistemas liposomales se emplearon los materiales descritos en la siguiente tabla:

Tabla 2. Materiales usados en la formulación de los sistemas liposomales

Nombre	Marca Comercial	Descripción	Ciudad/País origen
Ciclosporina A	Sigma-Aldrich	Estándar. Porcentaje de pureza: 98,5%	Laramie, EEUU
Phospholipon® 90G	Lipoid	Fosfatidilcolina purificada a partir de lecitina de soja. Tm<45°C. PM: 758,07 g/mol	Colonia, Alemania
Colesterol	Acofarma	Polvo cristalino blanco. PM: 386,67 g/mol	Terrasa, España
Tween 20	Scharlau	Densidad: 1,11 g/cm ³ . PM: 386,67 g/mol.	Sentmenat, España
Tween 80	Scharlau	Densidad: 1,07 g/cm ³ . PM: 1227.54 g/mol.	Sentmenat, España
D-limoneno	Sigma-Aldrich	(R)-(+)-Limoneno al 97%	St. Louis, EEUU
NaCl	Sigma-Aldrich	Polvo cristalino blanco. PM: 58,44 g/mol	Barcelona, España

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

Etanol absoluto	BDH Prolabo®	Densidad: 0,79 g/cm ³ . PM: 46,07 g/mol	Bois, Francia
Metanol	BDH Prolabo®	Grado HPLC. PM: 32,04 g/mol.	Bois, Francia
Cloroformo	LiChrosolv® - Merck	Para cromatografía. PM: 119,38 g/mol.	Darmstadt, Alemania
Agua bidestilada	-	Calidad Milli-Q. Resistencia > 18 MΩ · cm y contenido orgánico total (TOC) < 10 ppb.	-

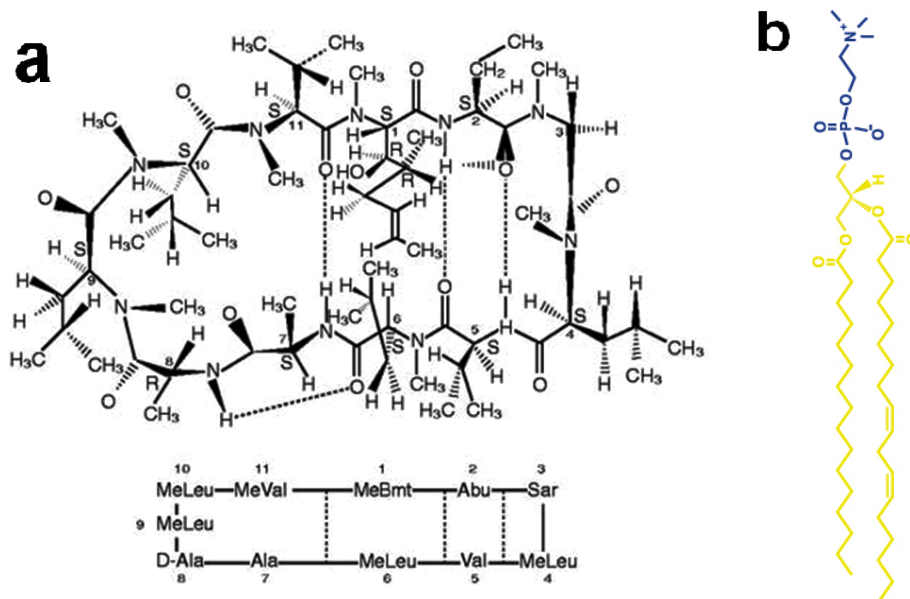


Figura 18. Estructuras químicas de (a) ciclosporina A y (b) fosfatidilcolina.

1.2. Otros materiales químicos y disolventes

En la preparación de todas las disoluciones empleadas y en todos los procesos de lavado, centrifugado y diluciones se ha empleado agua de calidad Milli-Q (modelo Integral 5, Millipore), con una resistencia superior a 18 M Ω -cm y un contenido orgánico total (TOC) inferior a 10 ppb.

Tabla 3. Otros materiales utilizados

Nombre	Fórmula Molecular	PM (g/mol)	Marca Comercial
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	41,05	BDH Prolabo®
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	Panreac
Ácido perclórico	HClO ₄	100,46	Panreac
Molibdato amónico	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1235,86	Panreac
Sodio dihidrogenofosfato anhidro	NaH ₂ PO ₄	120,00	Scharlau
Ácido L-ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176,13	Scharlau
R (+)-Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	Panreac
Lactosa monohidrato	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O	360,31	Guinama
Sorbitol 70%	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	Guinama
Ácido fosfotúngstico	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	2880,2	Sigma-Aldrich
Di-sodio hidrogenofosfato anhidro	Na ₂ HPO ₄	141,96	Scharlau
Hidroxipropilmetilcelulosa	C ₅₆ H ₁₀₈ O ₃₀	1261.45	Acofarma

1.3. Ensayos con piel humana

La piel utilizada para los ensayos de permeabilidad fue piel humana, ya que es la más aceptada por la comunidad científica para este tipo de estudios.

La piel se obtuvo a través de una colaboración con el Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Quirón Salud Valencia.

Se utilizó piel de abdomen femenino, de una única paciente de 39 años para disminuir la variabilidad interindividual. La piel se limpió con solución tampón fosfato pH 7.4 y se eliminó toda la grasa subcutánea, para después envolver en papel de aluminio y congelar a -20°C durante un máximo de 3 meses (151).

1.4. Ensayos con piel porcina

Entre todos los mamíferos, la piel más similar a la humana, desde el punto de vista anatómico y fisiológico es la piel de cerdo ya que presenta un grosor similar, siendo entre 30 y 140 μm frente a las 50-120 μm de la piel humana (57).

Debido a la similitud entre la piel de cerdo y la humana, la oreja de cerdo se utiliza normalmente como sustituto de la humana en estudios *in vitro*, ya que además muestra una penetración de sustancias aplicadas tópicamente similar a la penetración de éstas en la piel humana (152). También se ha comprobado que la absorción de diferentes solutos en los FP de la piel porcina coincide

cuantitativamente con la absorción de los mismo en los FP de piel humana (153).

Además, en estudios de penetración *in vitro* en FP la piel humana no se puede utilizar ya que se contrae instantáneamente tras la extirpación, cerrándose así los FP. En cambio, los FP de la piel de cerdo permanecen abiertos durante el estudio ya que la piel permanece unida al cartílago de la oreja (154).

Debido a que los estudios de absorción percutánea *in vivo* son difíciles de llevar a cabo, es necesario desarrollar métodos alternativos *in vitro* que sean reproducibles, y debido a la similitud entre la piel porcina y la humana y la posibilidad de trabajar con el FP sin ocluir, la piel porcina será el modelo para los ensayos de tape-stripping, concretamente piel de oreja de cerdo, obtenida del animalario del SCSIE (Centro de Soporte a la Investigación) de la Universitat de València.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universitat de València. El protocolo ético del estudio es el número: H1381683846659.

2. Metodología

2.1. Desarrollo y validación del método analítico por HPLC

Para el desarrollo del método analítico para cuantificar la CyA se partió de metodologías ya descritas en bibliografía (155), las cuales se ensayaron a condiciones variables de flujo, volumen de inyección, longitud de onda (λ), temperatura de la columna, composición y pH de la fase móvil.

Se validó el método analítico para la determinación de CyA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello se utilizó un HPLC Agilent series 1100, con detector UV. Se desarrolló un método que permite un análisis a corto plazo, con un sistema de solventes simple y una buena resolución en el cromatograma, además de una sensibilidad adecuada. Las condiciones finales del método analítico desarrollado se describen en el siguiente cuadro (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para determinación de CyA por HPLC

Condiciones cromatográficas	Descripción
Equipo	Agilent series 1100, compuesto por inyector automático, bomba isocrática y detector ultravioleta
Procesado de la señal	Agilent ChemStation®
Flujo	1,2 ml/min
Columna	Kromasil C-18 (150 x 4,6 mm I.D., tamaño de partícula de 5 μ m)

Volumen de inyección	100 µl
Longitud de onda	210 nm
Tiempo de retención (tr)	3,2 min
Fase móvil	Acetonitrilo, metanol y agua (70:20:10 v/v) El pH se ajusta a 6,32 ± 0,02 con ácido acético glacial al 5%.
Temperatura	65°C
Curva de calibración	5 puntos en el rango: 15,6 – 0,12 µg/ml

Se validó el método analítico para el intervalo de concentraciones de la curva de calibración, (Tabla 4) evaluando la aptitud del sistema y los parámetros de linealidad, sensibilidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ), precisión, exactitud y reproducibilidad, de acuerdo con los criterios de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH). Los datos se procesaron mediante el programa Excel Microsoft Office 2011®.

Se representaron las áreas de los picos correspondientes a CyA frente a las concentraciones de los patrones y se ajustaron por mínimos cuadrados, según la ecuación 3.

$$y = bx + a$$

Ecuación 3

Donde y es el área del pico de CyA; x la concentración ($\mu\text{g/ml}$); b la pendiente de la recta y a es la ordenada en el origen.

El coeficiente de correlación, r , expresa la *linealidad* existente entre las concentraciones y las áreas. La sensibilidad del método es la capacidad que presenta para discernir entre concentraciones similares de la misma sustancia, y viene expresado por la pendiente de la recta y su desviación estándar ($b \pm DS$).

El LD es la mínima cantidad de sustancia que puede ser detectada (Ecuación 4) y el LQ es la mínima concentración de sustancia ensayada que puede ser estadísticamente diferenciada del blanco (Ecuación 5).

$$LD = \frac{3 \cdot DSo}{b}$$

Ecuación 4

$$LQ = \frac{10 \cdot DSo}{b}$$

Ecuación 5

La *precisión* se evalúa mediante el coeficiente de variación (CV%) de la media de concentraciones calculadas en los ensayos intradía e interdía. Para calcular el CV% se utilizó la siguiente fórmula,

$$CV\% = \frac{DS}{x} \cdot 100$$

Ecuación 6

Donde x es la media de las concentraciones y la **DS** la desviación estándar de las mismas. La exactitud se determina mediante el error relativo (Er%) midiendo patrones de diferentes concentraciones de CyA, analizadas en tres días diferentes. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación,

$$Er \% = \frac{C_{exp} - C_t}{C_t} \cdot 100$$

Ecuación 7

Siendo C_{exp} la concentración experimental y C_t la concentración teórica.

Para descartar posibles interferencias de los medios y sustancias utilizadas, se inyectaron muestras de los mismos, a la misma concentración y bajo las mismas condiciones, y se verificó que no presentaban ninguna interferencia con el pico de CyA.

Se establecieron como límites/criterios de aceptación los siguientes:

Tabla 5. Límites/criterios de los parámetros de validación del método analítico.

Parámetro	Límite/criterio de aceptación
Aptitud del sistema	CV % de las áreas $\leq 4,0$ % CV % de los $t_r \leq 4,0$ %
Linealidad	$y = mx + b$ $r \geq 0,995$ $r^2 \geq 0,990$
Exactitud	ER % < 10 %
Precisión	
- Intradía	CV % < 10 %
- Interdía	CV % < 10 %
Límite detección (DL)	$< 0,5 \mu\text{g/ml}$
Límite cuantificación (QL)	$< 1,0 \mu\text{g/ml}$

2.1.1 Análisis de las muestras

El análisis cuantitativo y cualitativo de la CyA de las diferentes formulaciones obtenidas en los diferentes estudios realizados en el presente trabajo se realizó por el sistema HPLC, según las condiciones que se describen en la Tabla 4. Cada muestra fue filtrada a través de un filtro de nylon 3mm/0,45 μm antes de la inyección en la columna HPLC y se inyectó dos veces.

2.2. Sistemas liposomales

2.2.1 Formulación de los sistemas liposomales

Se formularon 4 sistemas liposomales diferentes según su composición: los convencionales (SLC), con tensioactivos (SLT1 y SLT2) y con elevado porcentaje de etanol (SLE). Se prepararon con y sin fármaco. Las formulaciones cargadas con CyA en su composición se identificaron con la abreviatura “CyA” al final del código.

La composición cuantitativa de las formulaciones se describe en la siguiente tabla:

Tabla 6. Composición cuantitativa de las formulaciones

Componentes (% p/v)	Formulaciones (códigos)			
	SLC	SLT1	SLT2	SLE
Phospholipon® 90G	3	3	0.8	3
Colesterol	0.1	–	0.08	–
Tween 20	–	–	1.8	–
Tween 80	–	0.55	–	–
D-limoneno	–	–	0.9	–
CyA (*)	0.2	0.06	0.06	0.2
Cloroformo/Metanol (1:1)	200 ml	–	100 ml	–
Etanol absoluto	–	200 ml	–	45
NaCl 0.9%	c.s.p. 100 ml	–	c.s.p. 100 ml	–
Etanol 7% v/v	–	c.s.p. 100 ml	–	–
Agua bidestilada	–	–	–	c.s.p. 100 ml

c.s.p.: cantidad suficiente para.

2.2.1.1 Preparación de las MLVs

Tres lotes de cada formulación se elaboraron con y sin CyA usando dos métodos diferentes según su fórmula: método de la película delgada de lípidos (SLC, SLT1 y SLT2) y el método de Touitou (SLE), con los cuales se obtiene espontáneamente MLVs.

A. Método de la película delgada de lípidos

Los lotes de la fórmula SLC se prepararon de la siguiente forma: el Phospholipon[®] 90G, Colesterol y CyA se disolvieron en una solución cloroformo/metanol (1:1). Se evaporó completamente en rotavapor (BUCHI, modelo R-210), bajo agitación a 50°C y a una presión de 100 mbar hasta formar una película delgada, gracias a la lenta evaporación del disolvente. Una vez formada la película se redujo la presión hasta 50 mbar a 30°C y se dejó 1 hora para terminar de eliminar posibles trazas de disolvente. La película se hidrató con solución de NaCl 0,9% y se agitó por 1 h a 50°C en rotavapor para formar una dispersión liposomal. Se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C (156–158).

La preparación de los lotes de la fórmula SLT1 se realizó bajo las mismas condiciones, pero reemplazando el colesterol por Tween 80, y se usó etanol absoluto como disolvente de la fase lipídica y etanol 7% v/v como solución de hidratación (86,159).

La preparación de los lotes de la fórmula SLT2 se realizó bajo las mismas condiciones que para el SLC, y sólo se adicionó el Tween 20 y D-limoneno al NaCl 0,9% antes de la hidratación de la película (160).

B. Método de Touitou

Los lotes de la formulación SLE se prepararon siguiendo el método Toui Tou (31,161) de la siguiente forma: el Phospholipon[®] 90 y CyA se disolvieron en etanol. Se añadió una cantidad apropiada de agua bidestilada lentamente de forma continua, manteniendo un flujo de $12 \pm 0,5$ ml/h cuidando que el recipiente se encontrara bien sellado y bajo agitación con un Heidolph digital (modelo RZR-2021, Alemania) a 710 ± 5 rpm en un baño de agua a 30°C. Una vez incorporada el agua, la muestra se mantuvo en agitación durante 10 minutos, se dejó reposar 20 minutos más a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C (31,156,162).

2.2.1.2. Reducción de tamaño de las MLVs

Todos los lotes de cada formulación, con y sin CyA, se sometieron a tratamientos físicos para reducir el tamaño de las vesículas en dispersión a fin de facilitar su permeación a través de la piel. Se usaron las técnicas de sonicación y extrusión en membrana

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

que se utilizan con frecuencia para la conversión de MLVs en SUVs y LUVs (70).

A. Método de sonicación por periodos

Una fracción de las suspensiones obtenidas se dividió en volúmenes de 2 ml en tubos de ensayo. Los lotes de las formulaciones SLC, SLT1 y SLT2 se colocaron en baño de ultrasonidos (163) (Elmasonic S 60H, Alemania) a 50°C y se trataron con ultrasonidos en 15 periodos de 10 minutos con 2 minutos de reposo a temperatura ambiente entre cada periodo. Luego se enfriaron los tubos a 4°C en hielo durante 2 minutos. Los lotes de la formulación SLE se trataron con ultrasonidos en 8 periodos de 15 minutos de encendido y 15 minutos de apagado (164) y luego se dejaron reposar por 1 hora a temperatura ambiente. Todos los lotes se almacenaron a 4°C.

B. Método de extrusión en membrana

La fracción restante se dividió en volúmenes de 3 ml en tubos de ensayo. Los lotes de las formulaciones SLC, SLT1 y SLT2 se colocaron en baño de ultrasonido a 50°C y se sonicaron por 2 horas para facilitar la posterior extrusión. Luego se enfriaron los tubos a 4°C en hielo por 2 minutos. Las vesículas sonicadas se homogenizaron manualmente

mediante jeringa plástica, 5 veces a través de filtro de nylon de 450 μm y 20 veces en filtros de 200 μm de policarbonato (LiposoFast®) cuyo tamaño de poro permite la reducción del tamaño particular a 200 nm, consiguiendo así un tamaño de partícula óptimo para su paso a través de los canales intercorneocíticos del SC (86). Por otro lado, los lotes de la formulación SLE se sonicaron durante 1 hora y se dejaron reposar por 1 hora a temperatura ambiente después de la sonicación. El proceso de extrusión fue el mismo que para las formulaciones anteriores. Se almacenó todos los lotes a 4°C.

2.2.2. Caracterización de los sistemas liposomales

Con el fin de facilitar la discusión, en la Tabla 7 se da una descripción general de las abreviaturas de los nombres de las muestras, que se van a utilizar en el texto.

Tabla 7. Resumen de las formulaciones

Método de preparación	Técnica para reducción de tamaño	Muestras vacías	Muestras cargadas con CyA
Película delgada	Sonicación	SL(*)-SON	SL(*)-SON-CyA
	Extrusión	SL(*)-EXT	SL(*)-EXT-CyA
Touitou	Sonicación	SLE-SON	SLE-SON-CyA
	Extrusión	SLE-EXT	SLE-EXT-CyA

(*) Es reemplazado por C, T1 o T2.

Las características de tamaño de partícula y PDI sirvieron como criterio de elección de las formulaciones que serían evaluadas en los ensayos de permeabilidad en piel.

2.2.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z

Tras la síntesis, se llevó a cabo la caracterización de los liposomas. El tamaño, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial Z se midieron mediante un equipo Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments Corp., USA). Se utilizó el modo de dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el tamaño vesicular (diámetro medio) y el PDI a 25 °C. El modo de dispersión de luz de análisis de fase (PALS) se utilizó para determinar el potencial Z (mV) de las vesículas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (165).

2.2.2.2. Morfología de las vesículas con CyA

Las muestras se prepararon mediante la aplicación de una gota de la dispersión sobre una rejilla de cobre (300 mesh) recubierta de carbono y se dejaron durante 4 minutos para permitir que algunas de las vesículas se adhieran al sustrato de carbono. Después de eliminar el exceso de dispersión con un trozo de papel de filtro, se aplicó una gota de solución de ácido fosfotúngstico al 2% durante un minuto y luego se dejó secar al aire. Las muestras se visualizaron con un

Microscopio de Transmisión electrónica (TEM) (JEM-1010, JEOL, 100kV) (166).

2.2.2.3. Evaluación de la eficacia de encapsulación (EE%)

La EE de CyA por los sistemas liposomales se midió por el método de ultracentrifugación. Las muestras se mantuvieron durante la noche a 4°C y se centrifugó en una ultracentrífuga (OPTIMA XL-100K, Beckman, EE.UU.) equipado con rotor TFT-70 a 4°C y 40 000 rpm durante 3 horas (167). La cantidad de CyA en el sobrenadante se determinó por HPLC añadiendo metanol 45% a un volumen pequeño de sobrenadante hasta cubrir el intervalo de validación. La presencia de vesículas en el sobrenadante se analizó mediante DLS.

La EE de los liposomas se determinó mediante la siguiente ecuación (33):

$$EE \% = \frac{(Q_i - Q_s)}{Q_i} \cdot 100$$

Ecuación 8

Donde Q_i es la cantidad inicial de CyA usada para la preparación de los sistemas liposomales y Q_s es la cantidad de CyA determinada en el sobrenadante.

2.2.2.4. Cuantificación de fosfolípidos

Para cuantificar la concentración del fosfolípido, fosfatidilcolina (PC), que forma los sistemas liposomales se utilizó una modificación del método de Rouser et. al (168).

En primer lugar, se preparó una solución 0,5 mM de NaH_2PO_4 . Luego se colocó, por triplicado, 0 μl , 40 μl , 80 μl , 120 μl , 160 μl , 200 μl , 240 μl , 280 μl y 320 μl de esta solución en tubos de ensayo para la curva de calibración. Las muestras fueron los sedimentos de liposomas obtenidos tras la ultracentrifugación y resuspendidos con agua milli-Q a su volumen original. Se hicieron diluciones 1:10 de las muestras y se tomaron, por triplicado, 100 μl colocándolos en tubos de ensayo. Todos los tubos se colocaron a 270°C hasta evaporación completa, luego a cada tubo se le añadió 450 μl de HClO_4 70% y se coló sobre un calefactor a 250 -260°C durante 30 minutos, para que se produjera la mineralización del fósforo. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 3,5 ml de agua milli-Q y 500 μl de molibdato amónico 2,5% p/v, agitando manualmente. Se añadieron 500 μl de ácido ascórbico 10 % (p/v) y se agitó rápidamente con el vortex, y seguidamente se incubó en un baño de agua a 100°C durante 7 minutos. Después de ese tiempo las muestras se enfriaron con hielo y se midió la absorbancia del fósforo a una longitud de onda (λ) de 820 nm (spectrophotometer HITACHI U-2900).

El número de moles de fosfato es igual al número de moles de fósforo y por tanto del fosfolípido que forma parte de la vesícula, por

lo que para determinar la concentración del PC en la muestra se empleó la siguiente ecuación:

$$\frac{mg\ PC}{ml\ muestra} = \frac{\mu mol\ PC \cdot 758,07\ g/mol}{100\ \mu l}$$

Ecuación 9

2.2.2.5. Morfología (Imágenes-TEM)

También se visualizó la morfología de las vesículas con un TEM JEM-1010, JEOL, 100kV en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE). Se tomaron cuatro muestras, una de cada suspensión coloidal diluida 1:1000, se aplicaron sobre una rejilla microscópica de cobre (300 mesh) recubierta de carbono y se dejaron secar durante 4 minutos, para permitir que algunas vesículas quedasen adheridas al carbono. Después, se añadió una gota de solución de ácido fosfotúngstico al 2% durante un minuto para realizar una tinción negativa y se secaron de nuevo para poder visualizarlas en el TEM (169).

2.2.2.6. Evaluación de la flexibilidad

Se extruyeron 500 μ l de cada formulación 9 veces, a través de unas membranas de 100 nm (Whatman®) con ayuda de un sistema de extrusión manual en jeringa (LiposoFast-Basic, Avestin) y se compararon sus diámetros medios antes y después de la extrusión. Se calculó la disminución relativa del diámetro de las vesículas. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (170).

2.2.2.7. Estabilidad durante almacenamiento

Las formulaciones se sellaron y almacenaron a 4°C durante 70 días en condiciones de oscuridad. El diámetro medio y PDI se determinaron por DLS en tiempos preestablecidos, de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.2.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z: 0, 2, 20, 50 y 70 días (171). La estabilidad en condiciones aceleradas se controló incubando cada formulación a 25°C, 30°C, 45°C y 60°C durante 2 h. Cada formulación se mantuvo a 25°C durante 15 días (172). Además, también se comprobó la estabilidad química de CyA determinando el contenido de fármaco en cada formulación almacenada a 35°C y 45°C cada tres días durante 21 días.

2.3. Efecto de la liofilización sobre las formulaciones

2.3.1. Determinación de crioprotectores

Las suspensiones liposomales recién preparadas se congelaron rápidamente en ausencia y en presencia de diferentes crioprotectores. Se utilizaron los hidratos de carbono: glucosa y lactosa, el polialcohol de azúcar: sorbitol, así como una combinación de los tres, en proporción 1:1:1, al cual se le denominó combinación de lioprotectores. Se prepararon soluciones de los azúcares a una relación molar 1:10 con el fosfolípido usado en las formulaciones. Para sorbitol, se preparó una solución al 2.5% (v/v) para las formulaciones con mayor cantidad de fosfolípido, es decir, SLC y SLT1 y otra a 0,7% (v/v) para la de menor cantidad, SLT2 (173,174).

En todos los casos, se colocaron 100 μ l de muestra junto con 400 μ l del crioprotector en viales de vidrio y se congelaron a -80°C (Ultra Low Temperature Freezer US70) durante 3 horas. Trascorridas las 3 horas, las preparaciones se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante 4 horas utilizando un vortex para la agitación. Luego se midió el diámetro medio por DLS, de acuerdo con lo descrito en la sección 2.2.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z. Se usó como comparación, la suspensión liposomal inicial a una dilución adecuada y se determinó diferencias significativas con un nivel de significancia de 0.05 ($p < 0.05$) (173).

2.3.2. Liofilización de las formulaciones

Se eligieron dos de los lioprotectores ensayados que no produjeron cambio significativo en el diámetro medio de las vesículas liposomales después de la congelación. De igual modo, 100 µl de muestra se colocaron junto con 400 µl del lioprotector en viales de vidrio y se congelaron a -80°C durante toda la noche. Inmediatamente se liofilizó durante 48 horas utilizando un liofilizador LyoQuest (HT-40, Telstar) a una temperatura en condensador de - 50°C y una presión de cámara de 0.08 mbar. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en agua bidestilada a las concentraciones iniciales de lípidos. El proceso de rehidratación se completó con 5 minutos de agitación repetida y calentando hasta aproximadamente 50 °C (173).

2.3.3. Morfología de las formulaciones liofilizadas

Las formulaciones resuspendidas se analizaron por microscopía electrónica, utilizando un TEM (JEM-1010, JEOL, 100kV), de acuerdo con lo descrito en la sección 2.2.2.2. Morfología de las vesículas con CyA, para observar cambios en la morfología de las vesículas después de la liofilización con los lioprotectores seleccionados.

2.4 Estudio de biocompatibilidad: toxicidad de los sistemas liposomales en cultivos celulares

2.4.1 Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular RAW 264.7 (ECACC; Salisbury, Reino Unido) para los estudios de toxicidad. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

2.4.2 Ensayos de proliferación y viabilidad celular

Suspensiones de células a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/mL se sembraron en placas de 96 pocillos (200 µl/pocillo) con medio DMEM suplementado al 10% con FBS, penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Tras una incubación de 2 h, el medio se sustituyó por el mismo volumen de medio DMEM suplementado con 0,5% de FBS y se expuso durante 1 hora a 10 µl de cada tipo de formulación de vesículas lipídicas a diferentes concentraciones. A continuación, se desechó el medio y se añadieron 100 µl de solución de MTT (0,5 mg/mL). Después de 1 h el sobrenadante se desechó y los depósitos azules correspondientes al metabolito coloreado se disolvieron en 100 µL de DMSO. La absorbancia a 510 nm se midió con un lector de placas VICTOR3 Multilabel (PerkinElmer; Waltham, MA, USA). Como muestra la siguiente ecuación, los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células de control no tratadas, o

células tratadas con sistemas liposomales vacías en caso de observar proliferación celular.

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \left(\frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ control} \right) \cdot 100$$

Ecuación 10

Donde la *absorbancia de la muestra* corresponde a la absorbancia de las células tratadas con las diferentes formulaciones liposomales, y la *absorbancia control* corresponde a la absorbancia de las células no tratadas o a las células tratadas con sistema liposomal vacío, a 510 nm.

2.5 Tape-stripping

2.5.1 Tape-stripping tradicional

El tape-stripping tradicional se utiliza para eliminar el SC mediante la aplicación sucesiva de cintas adhesivas. Por lo que se trata de una técnica mínimamente invasiva (175,176). De esta forma es posible obtener información sobre la función barrera del SC y como esta capa dificulta el paso del fármaco (177). La cantidad de SC retirada no es linealmente proporcional al número de cintas adhesivas utilizadas para ello y la variación de los resultados se estandariza

manteniendo constante una serie de parámetros, como el tamaño de las cintas adhesivas, la presión aplicada y el tiempo de aplicación antes de retirarlas, entre otros (175).

La piel utilizada para este ensayo es piel de las aurículas externas de las orejas de cerdo. Éstas se encuentran almacenadas entre -2°C y -8°C . Antes del ensayo se descongela la oreja, se lava con agua fría y se seca por completo. Posteriormente, se recorta el vello con unas tijeras, evitando dañar la superficie de la piel con la que se va a trabajar (178).

Una vez la piel está limpia y seca, se cortan porciones del tamaño adecuado y se marca con una circunferencia de 14 mm de diámetro en cada una de las porciones. También se corta una porción de máscara de cinta de aluminio adhesiva en la que se realiza la circunferencia con ayuda de un punzón que permite realizarlos de forma idéntica, y se recorta. A continuación, la piel se coloca sobre un portaobjetos y sobre ella se pega la máscara, de forma que solamente queda al descubierto la zona de piel que se va a utilizar. Una vez fijada la piel al portaobjetos se añade la cantidad de fármaco necesaria y se realiza un masaje de 2 minutos con el dedo.

Una vez el fármaco está aplicado sobre la piel, se cubre de parafilm® y se deja incubar. La temperatura de incubación es de 32°C ya que es la temperatura fisiológica de la piel, y el tiempo de incubación es de 2 horas. Trascurridas estas 2 horas, el parafilm® se retira. Para comenzar la técnica se recortan cintas adhesivas de igual tamaño, 1 cm x 1 cm.

Se coloca la primera cinta sobre la piel incubada con el fármaco con la ayuda de unas pinzas, para evitar cualquier contaminación externa. Para estandarizar la presión que se aplica sobre cada una de las cintas, se utiliza un rodillo que se aplica siempre ejerciendo una presión constante. Posteriormente se retira la cinta adhesiva con unas pinzas y se coloca en un vial. El proceso se repite con 10 cintas adhesivas. Las dos primeras cintas se guardan por separado en viales individuales rotulados como S1 y S2. Las 8 cintas siguientes se guardan siguiendo el esquema: S3-S5, S6-S10.

2.5.2 Tape-stripping diferencial

Esta técnica es el resultado de la combinación del método tape stripping tradicional con una biopsia de cianocrilato en superficie, y es un nuevo método mínimamente invasivo, selectivo y cuantitativo que permite determinar la cantidad de fármaco aplicado tópicamente que ha penetrado en los FP, tanto *in vivo*, como *in vitro* (176,178).

En esta técnica, una vez eliminado el SC con las cintas adhesivas, se coloca sobre la piel una gota de Superglue®, se extiende por toda la superficie de la piel incubada y se deja secar. Posteriormente se cubre con una nueva cinta adhesiva, se ejerce la presión y se retira la cinta mediante un rápido movimiento, retirando un molde de FP formado por el pegamento al polimerizar (178), que incluirá los liposomas con el fármaco si estos se han localizado en el FP. El proceso se realiza una segunda vez para asegurar la completa retirada de las partículas acumuladas.

2.6. Estudios *in vitro* de liberación y permeabilidad transdérmica de CyA

- **Célula estática vertical de difusión de tipo Franz:** los ensayos *in vitro* de difusión transdérmica se realizaron mediante las CDF ya que representa el método *in vitro* mayormente aceptado por la comunidad científica para la evaluación de la penetración transepitelial y la liberación de fármacos. Estas células estáticas verticales de difusión constan de dos cámaras: un compartimento dador y uno receptor, separados entre sí por una membrana.

Cualquier tipo de formulación que contenga un fármaco puede depositarse en el compartimento dador y la cantidad de fármaco que difunde a través de la membrana puede cuantificarse mediante la toma de muestras a partir del compartimento receptor y su posterior análisis.

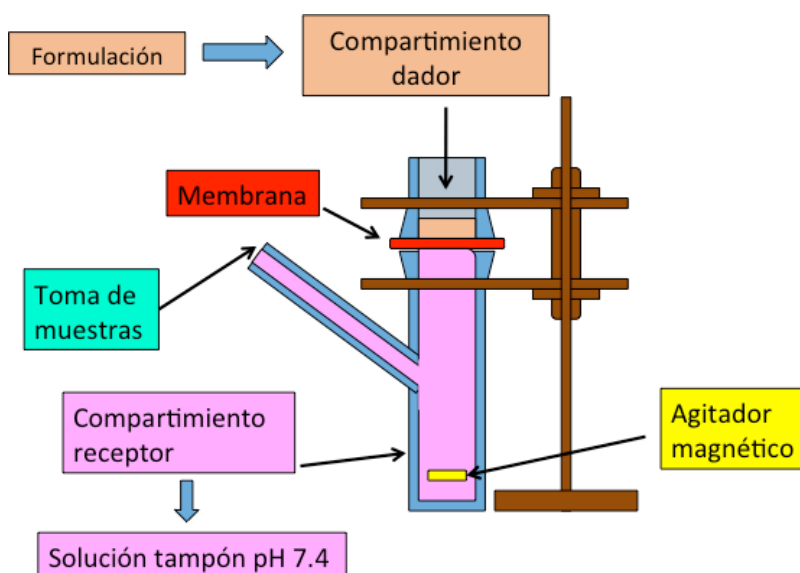


Figura 19. Esquema del estudio *in vitro* de permeabilidad transdérmica con CDF.

Para los ensayos se utilizaron CDF de cristal con un área de difusión de 0,745 cm² y 5 ml de volumen en el compartimento receptor, con 5 ml etanol/PBS al 45% v/v y pH 7,4 (5). Todo ello colocado en el módulo de calentamiento con agitación.

Las muestras analizadas son descritas en la *Tabla 7. Resumen de las formulaciones* (n=6). La permeabilidad cutánea de las formulaciones liposomales con CyA se comparó tanto con la permeabilidad cutánea de una solución de CyA de 5 mg/ml en etanol/PBS al 45% v/v (solución receptora) como con la de los liposomas sin CyA. También se comprobó la difusión de CyA dispersa en agua sin ningún excipiente, mezclando en vortex todos los componentes de la vesícula a la misma concentración. Esto permite diferenciar el efecto debido a la presencia de los potenciadores del que surge de las propias vesículas estructuradas.

- **Membranas:** En los estudios de permeabilidad se utilizó una membrana de diálisis Spectra/Por® entre el compartimento dador y receptor, como soporte de la piel separada por calor. Esta membrana no ejerce ninguna limitación al paso del fármaco, permitiendo así la difusión.
- **Piel separada por calor:** Para los estudios de permeabilidad cutánea se utilizó piel separada por calor. La piel fue obtenida una única paciente caucásicas de edades 39 años. La muestra

fue obtenida del Hospital Quiron Salud de Valencia, previa obtención del consentimiento informado de la paciente. La muestra fue anonimizada con el fin de preservar la identidad de las pacientes. Se realizaron controles sobre la piel de los diferentes voluntarios mostrando valores muy similares de Kp y flujos.

Se limpiaron las muestras de piel humana y el exceso de tejido adiposo y conectivo se eliminó para posteriormente almacenarlas en un congelador a -20°C durante un tiempo máximo de tres meses. Justo antes del inicio de los experimentos, se descongelaron las muestras de piel y se procedió a la separación de la epidermis para los estudios de difusión transdérmica. Para ello se utilizó la técnica de separación por calor descrita por primera vez por Kligman en 1963 (179). Se cortaron discos de piel con un punzón de 25 mm de diámetro, para posteriormente sumergirlos en un baño de agua destilada a 60°C durante 45 segundos. Estas condiciones son óptimas para conseguir debilitar las uniones existentes entre la dermis y la epidermis. Tras los 45 segundos, la piel se retira del baño y se sumerge en una placa Petri con NaCl 0.9% durante 30 segundos para enfriar la piel. La epidermis ya puede separarse de la dermis subyacente con unas pinzas de punta roma, para evitar dañarla.

- **Condiciones experimentales:** Mediante la CDF, puede realizarse distintos tipos de ensayo de difusión. Pueden

realizarse estudios en condiciones de "*dosis infinita*", es decir, la concentración de sustancia penetrante permanece constante en el compartimento dador y se mantienen las condiciones sumidero durante todo el ensayo en el compartimento receptor. Se admite una disminución de la concentración en la fase dadora, o un incremento de esta en la fase receptora no superior al 10%, ya que ello supone una variación importante en las condiciones de flujo de orden cero. En este caso, se espera que, tras un periodo inicial, llamado periodo de latencia, el gradiente de concentración a través de la membrana y, por tanto, la velocidad de penetración de la sustancia, se mantengan constantes.

Durante el periodo de latencia se establece el reparto de fármaco en el tejido y, una vez éste se satura, comienza la difusión (180). No obstante, estas condiciones no reflejan la situación real, ya que, tras la aplicación de una formulación tópica convencional, llega un momento en que se termina la dosis en el dador, dando lugar a una interrupción de la difusión. Por tanto, si se trabaja en condiciones de "*dosis finita*", se espera obtener una asíntota cuando se produce la depleción del dador.

En este caso, ya que el objetivo no es la obtención de niveles plasmáticos que darían lugar a efectos secundarios, la formulación ideal sería aquella capaz de promover el acceso de

fármaco a capas profundas de la piel, pero no permitiendo un flujo constante en el tiempo, para evitar dar lugar a niveles plasmáticos.

En el caso del presente trabajo, los estudios de permeabilidad *in vitro* se llevaron a cabo en condiciones de “dosis infinitas” para facilitar el manejo de los datos y la extracción de conclusiones. Las piezas de piel se montaron sobre las células de difusión con el lado del SC en contacto con el compartimento dador y el lado dérmico sobre un círculo de membrana de diálisis situado en el compartimento receptor, el cual sirve de soporte para la epidermis; se juntaron las dos cámaras de la CDF y se sellaron con una pinza. Se equilibraron durante 1 h, y luego se eliminaron las burbujas de aire de cada CDF. La fase del receptor consistió en 12 ml de solución hidroalcohólica de etanol – buffer 7.4 (50:50 v/v) (5).

Aunque es conocido que el etanol es un potencial promotor de la permeabilidad, en este caso se ha seleccionado como co-solvente para mantener las condiciones sink en el compartimento receptor, ya que se necesita la solubilidad del fármaco en el medio receptor para permitir su difusión continua (4–6,181). Sin embargo, la concentración de potenciación óptima para el etanol se ha fijado en un 30%, ya que concentraciones más altas como las que se utilizan en este caso, inducen la deshidratación de la piel, dificultando así la permeabilidad. Esta concentración se ha mantenido para todos

los experimentos, por lo tanto, la influencia potencial del co-solvente debe ser despreciable en la interpretación de los resultados.

En el compartimento dador, se aplicaron 500 μl de las diferentes formulaciones sin diluir tras su preparación (dosis máxima) sobre el SC y se cubrió con parafilm® y papel de aluminio para evitar la evaporación. Las CDF se colocaron en un baño de agua a 32°C bajo agitación y se tomaron muestras del compartimento receptor de 200 μl cada hora y media durante 30 horas aproximadamente, excepto durante la noche, seguido de la reposición del mismo volumen de solución receptora atemperada. Las muestras recogidas se analizaron por HPLC (182).

- **Cálculo de los parámetros que describen la difusión transdérmica:** Los estudios se llevaron a cabo en condiciones de dosis infinita, considerando que la concentración de la formulación en el compartimento dador no cambia considerablemente (<10%) durante el tiempo experimental. Las condiciones sumidero se mantienen durante el tiempo experimental, ya que la concentración de fármaco en la fase del receptor no excede el 10% de la concentración de saturación del disolvente en el compartimento receptor.

Los datos se expresaron como cantidades acumuladas de fármaco permeado por unidad de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y se representaron en función del tiempo. El flujo se calculó mediante regresión lineal en el estado estacionario como pendiente e intersección con el eje del tiempo, respectivamente. El flujo máximo posible (J_{max}) generalmente se calcula a partir de la siguiente ecuación (183):

$$J_{\text{max}}=J_{\text{ss}}S_{\text{v}}/C_{\text{v}}$$

Ecuación 11

Siendo J_{ss} el flujo calculado en el estado estacionario, S_{v} la solubilidad del fármaco en el vehículo y C_{v} la concentración de fármaco en el compartimento dador. Como las formulaciones de CyA aplicadas en el compartimento dador no estaban diluidas y la cantidad incorporada de CyA era la más alta posible en cada sistema, el coeficiente $S_{\text{v}}/C_{\text{v}}$ en nuestro entorno experimental corresponde a 1, lo que significa que $J_{\text{max}} = J_{\text{ss}}$.

Para comparar las vesículas con diferentes cantidades de CyA, se calculó el coeficiente **Flujo/Dosis**, como sustituto de K_{p} , que sería inexacto en este caso, ya que se desconoce la fracción biodisponible de CyA.

2.7. Hidrogeles liposomales

2.7.1 Formulación hidrogeles liposomales

La formulación de los hidrogeles se realizó a partir de las dispersiones coloidales de los liposomas descritos anteriormente. Para ello, inicialmente se igualó a 450 µg/mL la concentración de CyA en las diferentes soluciones liposomales diluyendo con agua bidestilada. A continuación, se adicionó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en cantidades determinadas a cada solución y se mantuvo en agitación durante 1 hora.

Se realizaron diferentes lotes con HPMC a 0,5%, 1%, 2% y 2,5% (p/v).

2.7.2 Caracterización hidrogeles liposomales

2.7.2.1 Calculo de la concentración de ciclosporina A

Se tomaron muestras de los diferentes lotes de hidrogeles preparados y se disolvió el hidrogel para analizar la concentración de CyA y comprobar que se mantenía estable y era homogénea en los diferentes lotes. Para ello, se tomaron 500 µl de cada lote a los que se añadió 500 µl de una solución de ácido ortofosfórico – acetonitrilo

(50:50) y con ayuda de un vortex se disolvió el hidrogel. Esta solución fue analizada por HPLC y se comprobó la correcta concentración en los diferentes lotes de hidrogel.

2.7.2.2 Caracterización reológica

Las muestras se caracterizaron reológicamente utilizando un reómetro TA Instruments rheometer (AR2000ex). Los ensayos se realizaron utilizando el sensor de placa de cono de 40 mm (número de serie: 993466) y los datos se analizaron mediante TA Data Analysis.

El comportamiento reológico de los hidrogeles fue evaluado por:

- Curva de flujo con velocidad de corte de 0-100 s^{-1} durante un período de 120 segundos para la curva ascendente y 100-0.0 s^{-1} por 120 segundos para la curva descendente;
- Barrido de frecuencia sometiendo las muestras a la tensión de corte constante de 1 Pa, utilizando frecuencias variables de 0,1 a 50 Hz.
- Arrastre y recuperación con esfuerzo cortante de 1 Pa durante 300 segundos y recuperación durante otros 300 segundos, cesando la tensión aplicada;
- Todas las pruebas se realizaron a 32 ± 1 ° C por triplicado. Los gráficos se trazaron en el software Origin 7.0.

2.7.3 Estudio de liberación de CyA a partir de las formulaciones de hidrogel liposomal

Los estudios de liberación de CyA a partir de las formulaciones de hidrogeles con liposomas se realizaron mediante la técnica de las CDF, tal y como se describe en el apartado 2.6. Estudios *in vitro* de liberación y permeabilidad transdérmica de CyA, con la diferencia de que no se empleó el uso de piel separada por calor, las formulaciones se colocaron en el compartimento dador, el cual estaba separado del receptor mediante una membrana de diálisis Spectra/Por®, la cual no ejerce ninguna limitación al paso del fármaco permitiendo así la difusión del mismo. Se ensayaron 6 replicados de cada una de las 4 formulaciones (n=6).

2.8. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DS). La significancia estadística se determinó mediante la prueba t-student y One-way ANOVA, utilizando el software estadístico SPSS-Software. Se aplicó la prueba de Tuckey para comparaciones múltiples (el nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$). Las pruebas de estabilidad se comprobaron mediante regresión lineal de las variables medidas (tamaño, PDI y contenido de CyA) y tiempo (expresado en días). La significancia del valor F se utilizó para probar la existencia de una relación durante el período de tiempo considerado (30 días).

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo y validación del método analítico por HPLC

El método analítico fue desarrollado y validado mediante HPLC, siguiendo las condiciones descritas en el apartado 2.1. Desarrollo y validación del método analítico por HPLC, para la cuantificación de CyA en un intervalo de concentraciones desde 15,6 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,12 $\mu\text{g/ml}$, con las que se realizó una curva de calibración (Figura 20).

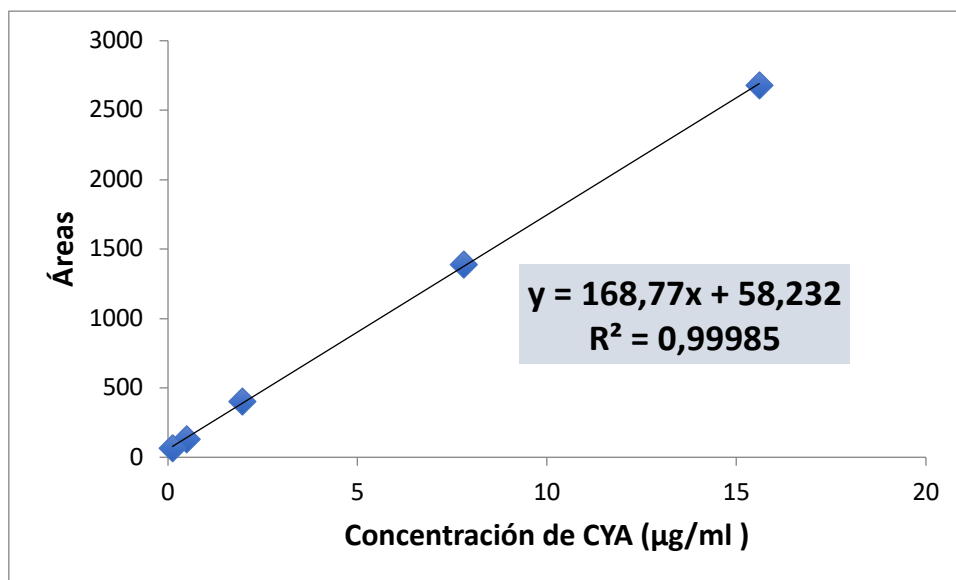
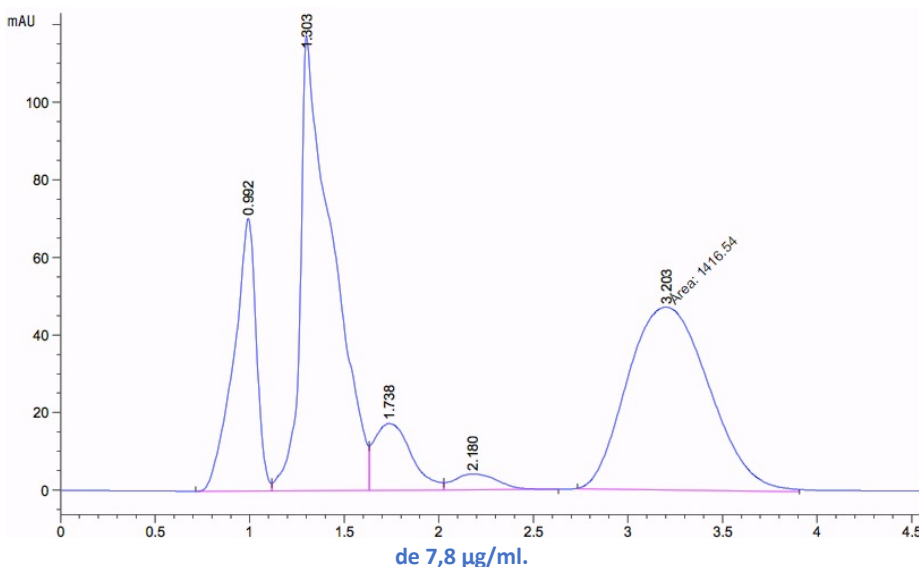


Figura 20. Curva de calibración para CyA.

La Figura 21 muestra un cromatograma de CyA a concentración 7,8 µg/ml, donde se observa el t_r característico del pico.

Figura 21. Cromatograma de Ciclosporina analizado mediante HPLC para una concentración



La relación área cromatográficas y concentración se definió con la ecuación: $\text{Área} = 168,7(\pm 1,2) \cdot C + 58,2(\pm 9,2)$, con un $R^2 = 0,99985$ y un LD de 0,16 µg/ml y LQ de 0,55 µg/ml. Los coeficientes de variación inter- e intradía fueron <10% en todos los casos, demostrando así su precisión y el error relativo fue <10% en todos los valores, demostrando su exactitud.

Por lo tanto, y según las normas de validación de la ICH, el método desarrollado para la determinación de CyA está validado y es lineal, preciso, exacto y reproducible.

2. Sistemas liposomales

2.2. Concentración de Ciclosporina A en las suspensiones liposomales

Las concentraciones obtenidas de CyA en el interior de los liposomas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8. Concentración de CyA en las formulaciones liposomales ($\mu\text{g/ml}$) (n=6).

Formulación	Concentración CyA ($\mu\text{g/ml}$)
SLE	1674,0 \pm 30,1
SLT1	499,4 \pm 34,6
SLT2- EXT	444,6 \pm 14,1
SLT2-SON	251,0 \pm 2,7

Las cuatro formulaciones consiguen aumentar la solubilidad de CyA en medio acuoso respecto al fármaco libre, siendo este aumento de 84 veces para los SLE, 25 para los SLT1, 22 para los SLT2-EXT y 13 veces para los SLT2-SON.

2.3. Caracterización de los sistemas liposomales

2.3.1. Determinación de tamaño de partícula (diámetro medio) y PDI

Se prepararon liposomas sin fármaco (n = 3) y se redujo su tamaño mediante dos métodos diferentes: sonicación por periodos y extrusión mediante membrana de 200 nm. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Tamaño de partícula (DM) y PDI determinados a partir de las formulaciones liposomales sin CyA, según método de reducción de tamaño (media \pm desviación estándar).

Formulación	Nº		Sonicación			Extrusión		
	Lote	DM (nm)		PDI	DM (nm)		PDI	
SLC	1	5311 \pm	3252	0.466	283 \pm	6	0.209	
	2	7646 \pm	5170	0.476	274 \pm	16	0.245	
	3	5631 \pm	2503	0.318	300 \pm	8	0.241	
SLT1	1	319 \pm	12	0.359	141 \pm	1	0.229	
	2	444 \pm	16	0.374	178 \pm	1	0.164	
	3	451 \pm	22	0.377	178 \pm	1	0.172	
	CV%	16		2.8	11		18.7	
SLT2	1	47 \pm	1	0.183	157 \pm	1	0.198	
	2	55 \pm	1	0.108	119 \pm	2	0.256	
	3	49 \pm	1	0.185	161 \pm	3	0.182	
SLE	1	-		-	423 \pm	7	0.123	
	2	-		-	378 \pm	4	0.215	
	3	-		-	575 \pm	3	0.086	

El tamaño obtenido se encuentra dentro del intervalo esperado para vesículas lipídicas de este tipo. De acuerdo con el trabajo de Hinna et al. (184), en el presente estudio, las vesículas extruidas presentan diámetros inferiores a las partículas sonicadas, a excepción de la formulación SLT2. El tamaño obtenido para los etosomas (SLE) fue muy superior al de las otras vesículas, probablemente debido a la flexibilidad introducida por el etanol y al cambio en la tensión superficial entre los fosfolípidos y el núcleo debido a la incorporación del cosolvente en las vesículas (27). Los tamaños obtenidos para los lotes SLC y SLE se alejan del diámetro de poro del filtro (200 nm) utilizado para la extrusión. Este fenómeno puede deberse a que estas formulaciones, a diferencia del resto, tienen su bicapa únicamente compuesta por PC, y que al ser un fosfolípido insaturado permite obtener liposomas flexibles (menor interacciones de Van der-Waals en la cadena hidrocarbonada) que pueden atravesar el poro con un tamaño vesicular mayor. Así también, entre ambas se observa que SLC es menos flexible que SLE, ya que se obtiene menor tamaño, esto debido a la adición de colesterol que está dando cierta rigidez a la bicapa del SLC (185).

El proceso por extrusión resultó ser el que aportó los datos más reproducibles (menor CV% entre lotes). Este método presenta ventajas sobre el método de sonicación, ya que evita la degradación de fosfolípidos y permite duplicar la EE del fármaco (186). Pero presenta el inconveniente de no permitir reducir el tamaño por debajo de 100 nm, ya que no se dispone de membranas con menor tamaño de poro. Por otro lado, la sonicación por periodos es una técnica que

permite obtener LUVs y SUVs de menor tamaño a partir de MLVs, pero su reproducibilidad depende de la potencia aplicada y la duración del proceso (187,188).

En este caso, la sonicación proporcionó peores resultados de tamaño y homogeneidad de tamaño, excepto para SLT2, que mostró menor PDI <0.3 y menor tamaño que su formulación extruida. Por ello, SLT2 fue la única formulación sonicada seleccionada para estudios de permeabilidad. El diferente comportamiento de SLT2 puede explicarse por la presencia de D-limoneno y Tween 20 en cantidades superiores a Tween 80 en SLT1 y colesterol en SLC. Estas sustancias tensioactivas se colocan en la bicapa lipídica de las vesículas y pueden interactuar en la interfaz reduciendo la tensión superficial entre el núcleo acuoso y la bicapa lipídica. Este efecto debe haber estabilizado las vesículas más pequeñas de manera más eficiente que las otras formulaciones.

Los resultados obtenidos con este método evidencian que no fue el más adecuado en el caso de las formulaciones diseñadas, excepto para la formulación SLT2, que tuvo un PDI < 0.3 y un tamaño incluso más pequeño que las formulaciones extruidas. La capacidad de las ondas de ultrasonido para reducir el tamaño de los liposomas, se atribuye a los efectos físicos de cavitación acústica e incluso algunos plantean que también la burbuja de cavitación fragmenta el liposoma, lo cual a su vez reduciría la eficiencia de encapsulación de la fase acuosa, que junto a la distinta naturaleza de la bicapa liposomal de SLT2 respecto al resto de formulaciones, producirían una reducción considerable en su tamaño (163).

Al final de los procesos de sonicación se colocaron las muestras en un baño de hielo, ya que, al bajar la temperatura, las vesículas se hacen más estables evitando que las membranas se fusionen debido a la inestabilidad que se genera en la curvatura de sus bicapas.

En la Tabla 10 se registran los parámetros de tamaño y PDI para los sistemas liposomales con CyA, donde se observan resultados similares a los obtenidos con los sistemas liposomales sin CyA. Es decir, se produce una óptima incorporación del fármaco (CyA) en la bicapa si se formula bajo las mismas condiciones de fabricación. Sin embargo, para las formulaciones SLC y SLE, sus tamaños se reducen y acercan más al tamaño del poro del filtro, lo que hace suponer que se ha disminuido parte de la flexibilidad de la membrana al incorporarse la CyA en su estructura.

En cuanto a la variabilidad en el tamaño, todas las formulaciones seleccionadas mostraron una distribución uniforme, ya que los valores de PDI siempre permanecieron por debajo de 0,260, siendo inferior al límite habitual para este tipo de formulaciones. Según Danaei et al. (189), en aplicaciones de administración de fármacos que utilizan portadores basados en lípidos, un PDI de 0,3 es inferior se considera aceptable, e indica una población homogénea de vesículas de fosfolípidos (190–192).

Tomando como criterio los resultados de tamaño de partícula y PDI obtenidos tras la aplicación de ambos métodos de reducción de tamaño, se seleccionan como viables para su ensayo en piel, las siguientes 5 formulaciones: sistemas liposomales extruidos “SLC-EXT-

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

CyA”, “SLT1-EXT-CyA”, “SLT2-EXT-CyA” y “SLE-EXT-CyA; sistemas liposomales sonicados “SLT2”-SON-CyA”.

Tabla 10. Tamaño de partícula (DM) y PDI determinados a partir de las formulaciones liposomales con CyA, según método de reducción de tamaño (media \pm desviación estándar).

Formulación	Nº	Sonicación				Extrusión en membrana			
		DM (nm)		PDI	DM (nm)		PDI		
SLC-CyA	1	9323	\pm	15065	0.569	215	\pm	8	0.214
	2	82437	\pm	107500	5,111	252	\pm	4	0.206
	3	10269	\pm	4858	0.513	229	\pm	2	0.157
SLT1-CyA	1	339	\pm	5	0.363	178	\pm	3	0.137
	2	109	\pm	1	0.246	185	\pm	6	0.152
	3	326	\pm	11	0.368	179	\pm	2	0.139
SLT2-CyA	1	50	\pm	1	0.157	161	\pm	1	0.139
	2	49	\pm	1	0.164	131	\pm	1	0.254
	3	52	\pm	1	0.177	139	\pm	3	0.222
SLE-CyA	1	-		-	-	279	\pm	2	0.091
	2	-		-	-	261	\pm	1	0.087
	3	-		-	-	290	\pm	3	0.134

2.3.2. Determinación del potencial Z

Los datos obtenidos en las medidas de potencial Z de los distintos sistemas liposomales se recogen en la Figura 22.

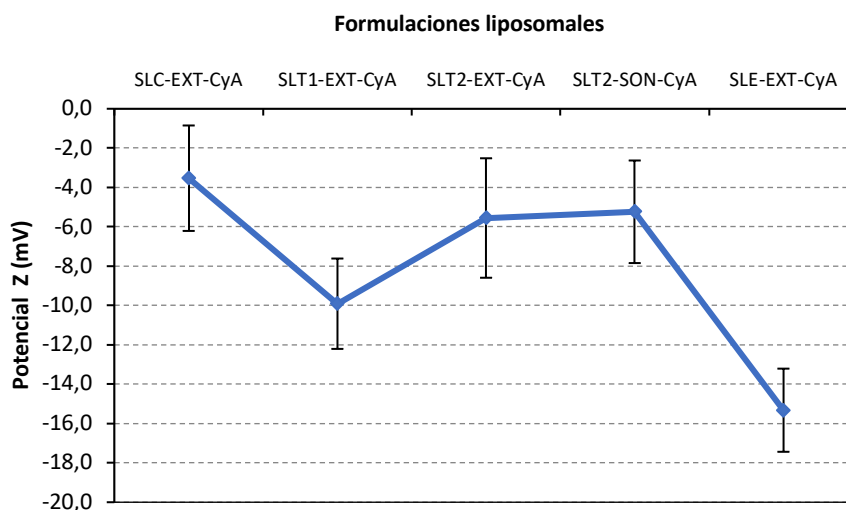


Figura 22. Potenciales Z (mV) determinados de las formulaciones liposomales seleccionadas para los ensayos de permeabilidad en piel (media \pm desviación estándar).

Como se observa en la Figura 22, todas las formulaciones presentaron valores de potencial Z negativos. Como se esperaba, SLC-EXT tuvo el valor negativo más pequeño, debido a su alto porcentaje de PC, que contiene grupos fosfato con una carga negativa débil (193). SLC-EXT forma floculados compactos durante el almacenamiento, debido a la reducción de las fuerzas repulsivas electrostáticas. Estos floculados se pueden dispersar fácilmente agitando suavemente hasta, al menos, 70 días después de su preparación. La formulación que contiene Tween 80 (SLT1) presentó valores de potencial Z estadísticamente diferentes, probablemente debido a su mayor tamaño de partícula causado por la incorporación del tensioactivo dentro de las bicapas de fosfolípidos. Su presencia permitió el establecimiento de fuerzas de atracción débiles (enlaces de

hidrógeno) que potenciaron la formación de floculados, que también se redispersaban fácilmente. La fórmula SLT2, que contiene Tween 20 y D-limoneno (que son más lipofílicos), muestra una diferencia, pero no estadísticamente significativa. El floculado también podría redispersarse fácilmente. Entre todas las formulaciones preparadas, los etosomas (SLE) tuvieron el potencial Z negativo más alto (dentro de las diferencias estadísticas), lo que provocó una repulsión electrostática más fuerte entre las vesículas y la posterior formación de agregados menos compactos que también se redispersaron fácilmente mediante agitación suave. Este resultado era esperable, ya que el etanol aporta carga negativa en la superficie de los etosomas (192). En conclusión, ninguna de las cuatro formulaciones tuvo un valor de potencial Z inferior a -30 mV, que es un índice predictivo de estabilidad a largo plazo (194).

2.3.3. Morfología de las vesículas liposomales

Las estructuras de las vesículas se estudiaron mediante imágenes TEM (Figura 23). Aunque el mejor método para visualizar vesículas en su estructura nativa es la microscopía crioelectrónica, la tinción negativa de muestras seguida de visualización TEM también es un método útil para obtener imágenes de vesículas (169). En este caso, se visualizan estructuras de tipo multilamelar en todas las vesículas, como era de esperar. Presentan una forma esférica regular, aunque algunas parecen ligeramente ovoides, probablemente debido

al proceso de secado de la muestra. El tamaño de partícula estimado no se puede tener en cuenta porque la muestra debe deshidratarse antes de la visualización, y esto provoca una modificación en el tamaño de partícula cuando se compara con su tamaño en dispersión acuosa (medido por DLS).

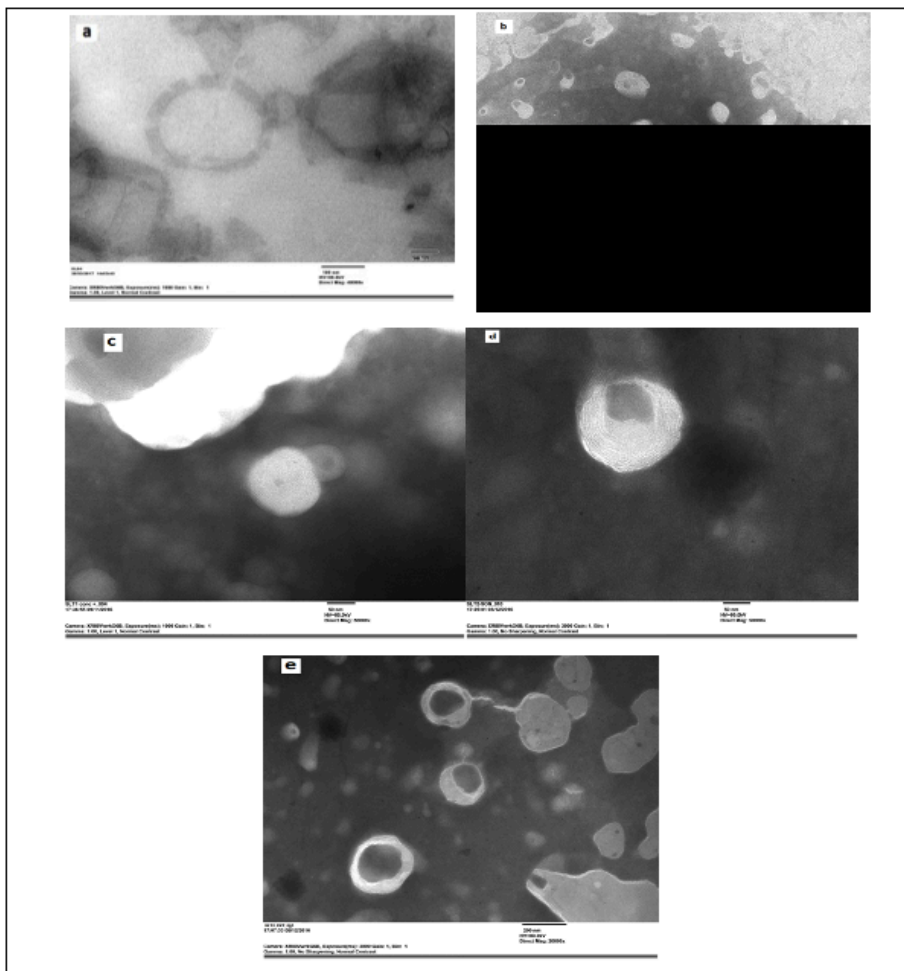


Figura 23. Visualización de las formulaciones liposomales cargadas con CyA, mediante TEM. (a) SLC, (b) SLE, (c) SLT1, (d) SLT2-SON, (e) SLT2-EXT.

2.3.4. Eficacia de encapsulación y cuantificación de fosfolípido

Como se muestra en la Figura 24, la EE del fármaco fue elevada en todas las formulaciones (>50%). El porcentaje de EE de CyA varía desde más del 95% (SLC) hasta aproximadamente el 90% (SLT1, SLE). Estos valores son más altos que los publicados previamente por Duangjit et al (195). Por otro lado, el porcentaje de EE de CyA para SLT2 es casi del 60%, valor similar al publicado por Duangjit et al. La diferencia puede explicarse por la lipofilia de CyA y la composición de la bicapa. De hecho, los tensioactivos, el colesterol y el D-limoneno reducirían el espacio disponible, acondicionando una bicapa lipídica más compleja y, por tanto, reduciendo la capacidad de incorporación de CyA en el SLT2.

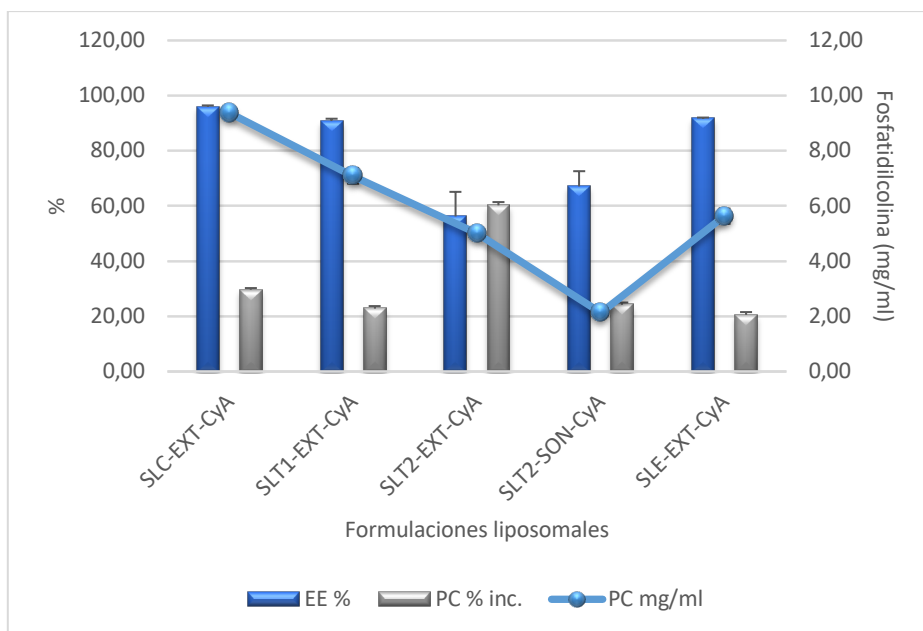


Figura 24. Eficacia de encapsulación (EE %), concentración y porcentaje de incorporación de fosfatidilcolina (PC) en las formulaciones liposomales, (media \pm DS).

Como se muestra en la Figura 24, se incorporó PC en un porcentaje menor (70-80%). Probablemente, esto pueda atribuirse a la pérdida de material durante el proceso de fabricación. SLT2-EXT presentó el menor porcentaje de PC, lo que sugiere que el proceso de extrusión es responsable de una distribución particular de fosfolípido-fármaco dentro de las vesículas y una mayor pérdida de producto. Además, los liposomas con los valores más altos y bajos de EE% presentaron también los valores más altos y bajos de PC, respectivamente.

2.3.5. Resumen de caracterización

A modo de resumen, los resultados de tamaño, PDI y potencial Z de las diferentes vesículas lipídicas cargadas con CyA se presentan en la Tabla 11. También se muestran los porcentajes de EE y PC.

Tabla 11. Datos de caracterización de los sistemas liposomales cargados con CyA y seleccionados para los estudios de permeabilidad cutánea: Tamaño, PDI, Potencial-Z, Eficacia de encapsulación (EE%) y contenido de fosfatidilcolina (PC%).

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial- Z (mVol)	EE%	PC%
SLC	229 ± 2	0.192	-4 ± 1	96.0 ± 0.5	69.8 ± 0.3
SLT1	179 ± 2	0.142	-10 ± 1	90.8 ± 1.1	77.6 ± 1.3
SLT2-EXT	139 ± 3	0.238	-6 ± 2	58.3 ± 6.1	37.9 ± 0.7
SLT2-SON	52 ± 1	0.166	-6 ± 1	63.2 ± 4.8	76.6 ± 0.2
SLE	257 ± 1	0.104	-16 ± 1	91.7 ± 0.8	81.1 ± 0.6

2.4. Flexibilidad

La flexibilidad se midió según lo descrito por Jain et al. (196). Los autores presentaron la reducción de diámetro y el volumen obtenido tras la extrusión como índices de rigidez. Los datos obtenidos para ambos parámetros se recogen en la Tabla 12. Con esta información, se puede concluir que las vesículas SLC se retuvieron de forma eficaz en la membrana, ya que su tamaño se redujo a 101 ± 1 nm, que es el tamaño de poro del filtro. SLT1 y SLT2 pueden deformarse o cambiar de forma más fácilmente y pueden atravesar los poros de la membrana, pero su tamaño disminuyó notablemente. Por otro lado, en el caso de los SLE se redujo solo un 14% de su tamaño inicial, y con un diámetro medio final de 196 ± 1 nm, resultó ser la más flexible de las preparaciones.

Tabla 12. Diámetro y volumen de las vesículas cargadas con CyA después de la extrusión en frío (Media \pm SD). También se enumera el volumen perdido.

Formulation	Tamaño tras la extrusión (nm)			Disminución de tamaño (%)	Volumen perdido (%)
SLC	101	\pm	1	44	43 ± 9
SLT1	126	\pm	3	28	23 ± 4
SLT2-EXT	90	\pm	1	35	29 ± 7
SLT2-SON	54	\pm	1	-	-
SLE	196	\pm	1	14	4 ± 1

El volumen final recogido después de la extrusión en frío está inversamente relacionado con la flexibilidad (196). Este fenómeno se observó para SLC después del tercer pase y para SLT1 y SLT2 después del 17º pase por el filtro, pero no para SLE, donde el volumen final recogido fue $92 \pm 1.8\%$ del volumen inicial. En resumen, llegamos a la conclusión de que los etosomas (SLE), compuestos de PC, CyA y etanol, se encontraban en un estado más fluido y menos rígido que las otras vesículas. Este hallazgo es coherente con resultados previos, ya que se considera que el etanol aumenta la fluidez de las bicapas de PC cuando se encuentra en estado líquido cristalino (31,197). Esto hace ver que la composición lipídica en la bicapa de los liposomas tiene un gran impacto en propiedades de la membrana como la elasticidad (198), permeabilidad y propiedades de enlace con principios activos (19).

2.5. Estudio de estabilidad de las formulaciones liposomales

Para estudiar la estabilidad de las vesículas se midió el tamaño y PDI de las vesículas durante 70 días a 4°C, como se muestra en la Figura 25. También se comparó el tamaño de las vesículas (Figura 26) y el PDI (Figura 27), tanto a 25°C a las 24 horas, como a las 2 horas a 30°C, 45°C y 60°C. Además, el contenido de CyA se midió cada 3 días durante 30 días a 35°C y 45°C. Finalmente, también se probó el efecto de los crioprotectores durante la congelación antes de la liofilización.

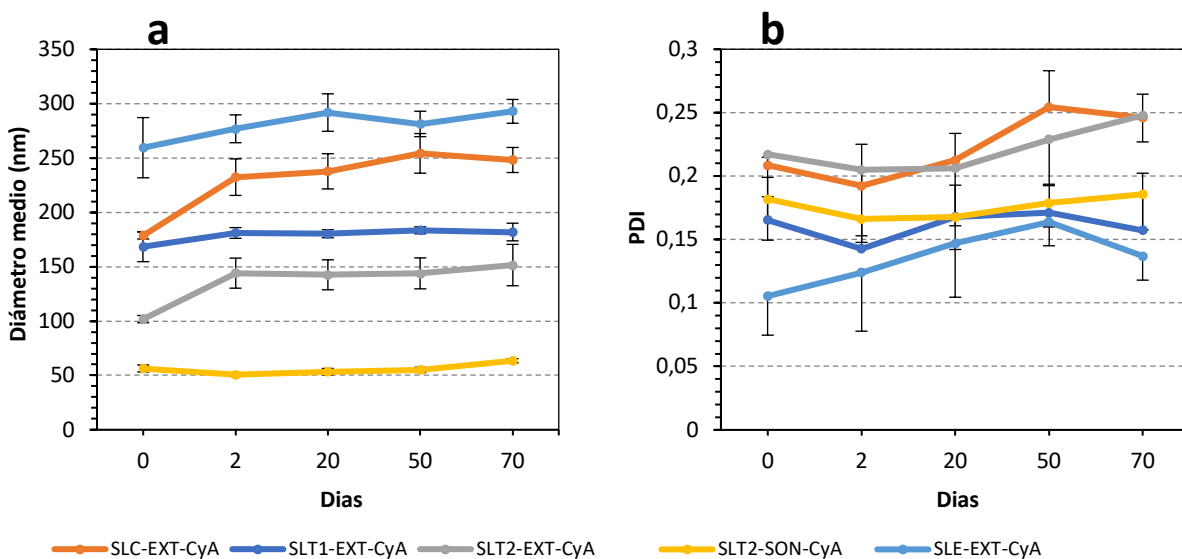


Figura 25. Estabilidad de las formulaciones liposomales almacenadas a 4°C durante 70 días, (a) efecto sobre el tamaño de partícula (diámetro medio) y (b) sobre el PDI, (media \pm desviación estándar).

En la Figura 25 se muestra que, en general, no se observaron cambios significativos en el tamaño de las partículas en función del tiempo cuando las vesículas se almacenaron a 4°C, aunque es común una tendencia de un ligero aumento en el tamaño de las partículas con el tiempo (195). Solo se observó un cambio significativo dos días después de la preparación de una muestra de SLC. Esta diferencia se puede atribuir al tiempo que necesita la formulación para alcanzar su conformación más estable. Las medidas de tamaño de las alícuotas almacenadas a 25°C, 30°C, 45°C y 60°C no mostraron diferencias significativas respecto al tamaño inicial de las vesículas ($\alpha = 0,05$), pero los SLE y SLC almacenados a 60°C, no pudieron analizarse después de 2 horas debido a la degradación de las vesículas. Esta degradación se puede atribuir a la mayor inestabilidad de las bicapas de estos dos

tipos de vesículas, en comparación con las que contienen tensioactivos en su composición. El núcleo etanólico de los etosomas probablemente se evaporaría a la temperatura seleccionada, contribuyendo a la inestabilidad de las vesículas. Finalmente, no se encontraron cambios en el contenido de CyA después de 21 días a las temperaturas mencionadas. Por otro lado, en la Fig. 1b se observó un ligero aumento de PDI en algunas formulaciones a lo largo del tiempo, aunque los valores se mantuvieron por debajo de 0,3, lo que significa que mantuvieron su homogeneidad. Estos resultados se pueden atribuir a la estructura tubular del PC que permite una adecuada disposición para formar la bicapa, así como a la incorporación de moléculas lipofílicas, como CyA, que aumenta la rigidez vesicular evitando la inestabilidad estructural (199). La conformación termodinámicamente más estable es en forma de vesícula bicapa, ya que pliega los bordes de la bicapa entre sí, al proporcionar una cantidad suficiente de energía a los fosfolípidos agregados (200). Entre los productos disponibles comercialmente, seleccionamos Phospholipon 90G, porque un estudio previo de Kaleh y Bajaj demostró que las vesículas preparadas con Phospholipon 90G eran más estables que Phospholipon 90H o Lecitina (201). En términos de estabilidad, estas vesículas tienen la ventaja adicional de contener colesterol, D-limoneno, los dos tipos de polisorbato y el fármaco entre los fosfolípidos (188). El estudio de estabilidad en condiciones aceleradas demostró que la presencia de los tensioactivos y D-limoneno puede aumentar la estabilidad de las vesículas frente a la temperatura.

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

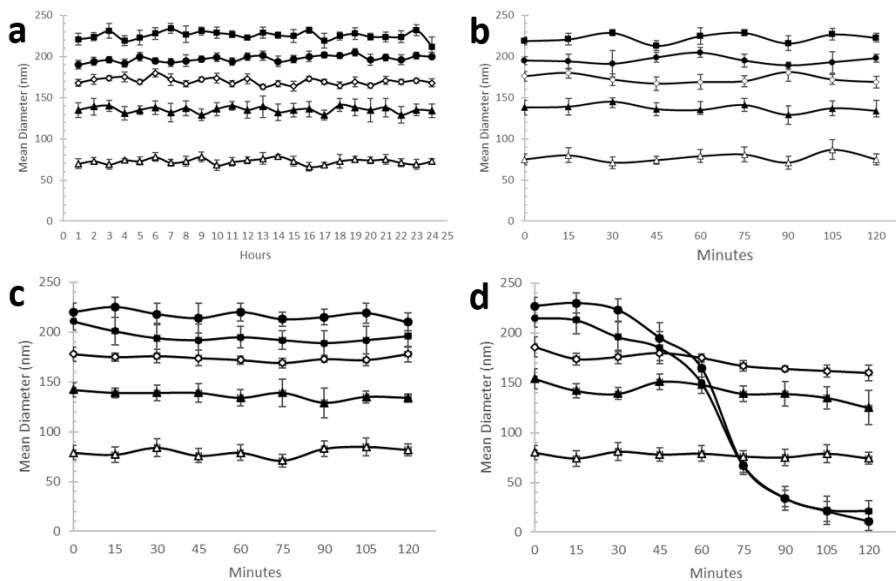


Figura 26. Efecto sobre el tamaño de las vesículas. a) Estudio de estabilidad a 25°C durante 1 día. b) Estudio de estabilidad a 30°C durante 2 horas. c) Estudio de estabilidad a 45°C durante 2 horas. d) Estudio de estabilidad a 60°C durante 2 horas (Media \pm DS). Circulo negro: SLC; Triangulo negro: SLT2-EXT; Triangulo blanco: SLT2-SON; Diamante blanco: SLT1; Cuadrado negro: SLE.

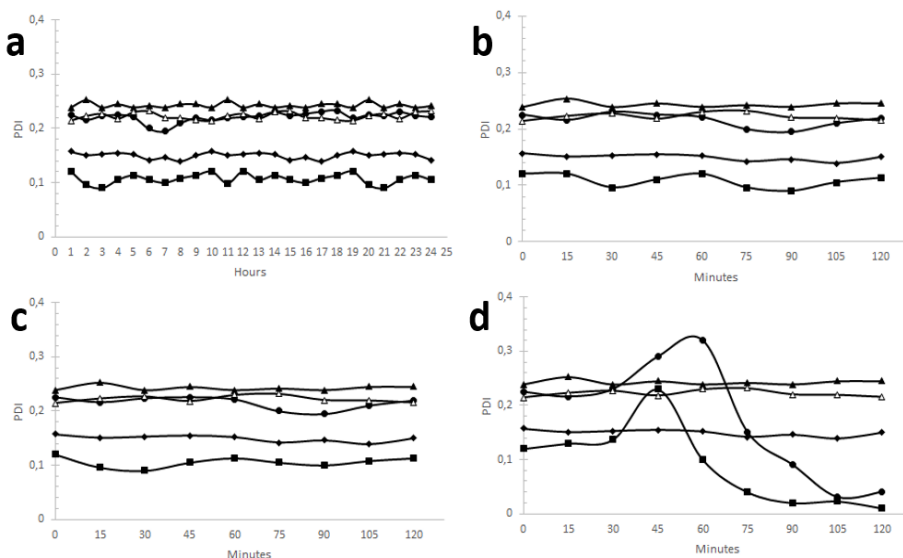


Figura 27. Efecto sobre el PDI. a) Estudio de estabilidad a 25°C durante 1 día. b) Estudio de estabilidad a 30°C durante 2 horas. c) Estudio de estabilidad a 45°C durante 2 horas. d)

Estudio de estabilidad a 60°C durante 2 horas. Círculo negro: SLC; Triángulo negro: SLT2-EXT; Triángulo blanco: SLT2-SON; Diamante blanco: SLT1; Cuadrado negro: SLE.

2.6. Efecto de la liofilización sobre las formulaciones

Teniendo en cuenta que las partículas a base de lípidos se pueden oxidar fácilmente, especialmente después de someterse a sonicación (187), se evaluó la posibilidad de aumentar la estabilidad de la vesícula cargada mediante la liofilización. Se midió el efecto de los agentes crioprotectores sobre el DM después de haber sido expuestos a liofilización. Los agentes crioprotectores se seleccionaron en base al trabajo de Stark y colaboradores (173), quienes obtuvieron resultados similares a los presentados en este trabajo. En la Figura 28 se observa que la ausencia de un agente crioprotector dio lugar a un aumento significativo del tamaño de partícula, como era de esperar. Se investigaron varios azúcares por su capacidad para proteger las vesículas lipídicas contra la fusión durante los procesos de liofilización (202), como resultado del estrés mecánico causado por la cristalización de las vesículas durante la congelación. Este efecto indujo el daño de las membranas de las vesículas y la pérdida de la estructura de las vesículas (173). Entre los distintos crioprotectores, los mejores resultados se obtuvieron cuando se incorporó lactosa y sorbitol para SLC; glucosa y la combinación de glucosa, sorbitol y lactosa (combo) para SLT1 y glucosa-lactosa para SLT2-EXT. Las moléculas de azúcar actuarían en estos casos como estabilizadores de la membrana, ya que ayudan a mantener el espacio lateral entre los grupos funcionales de las partes hidrofílicas de los fosfolípidos (203).

Sin embargo, no se encontró ningún agente crioprotector adecuado para SLT2-SON entre los cuatro ensayados, resultado que podría atribuirse a la inestabilidad de sus bicapas debido a la curvatura más pronunciada, condicionada por su menor tamaño.

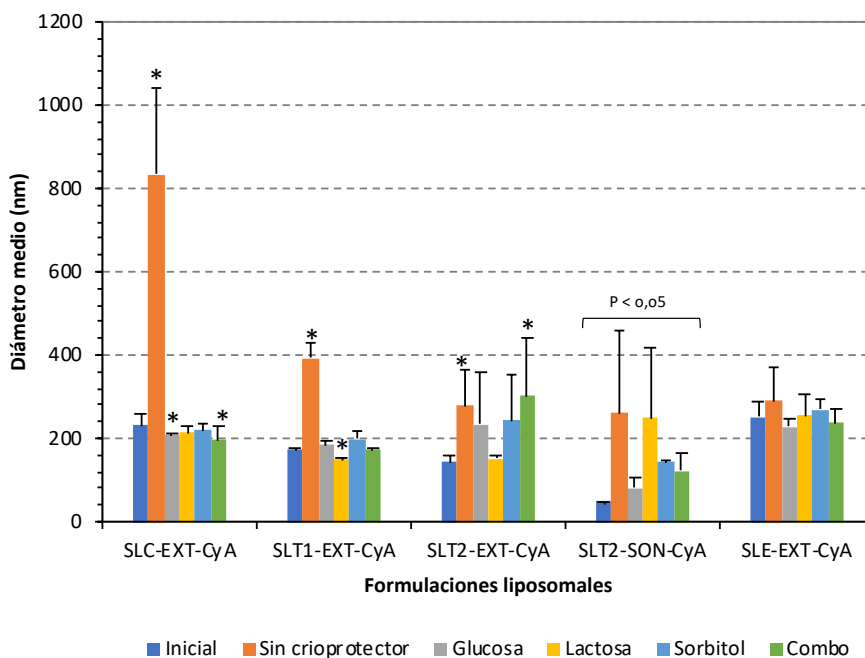


Figura 28. Efecto de los crioprotectores sobre el tamaño de las vesículas de las formulaciones liposomales, tras la congelación a -80°C durante 3 h; comparado con el tamaño inicial, * $p < 0.05$; $n = 6$ (Media \pm DS).

2.6.1. Morfología de las vesículas liposomales tras de la liofilización

Las vesículas de las formulaciones SLC, SLT, SLT2-EXT y SLE-EXT se liofilizaron con los crioprotectores seleccionados en el apartado anterior.

Las imágenes de las formulaciones redispersadas se muestran en la Figura 29, donde se observa que los crioprotectores que no tuvieron un efecto significativo sobre la morfología de las vesículas fueron: lactosa para SLC, combo para SLT1, glucosa para SLT2-EXT y lactosa para SLE-EXT.

Estos crioprotectores actuarían impidiendo tanto la fusión de las vesículas como la formación de cristales durante la congelación. Además, las moléculas de azúcar actúan como estabilizadores de membrana, ya que ayudan a preservar la separación lateral entre los grupos de cabeza de fosfolípidos, que se traduce en una disminución de las fuerzas de Van der Waals, que estarían amplificadas entre las cadenas de acilo (173).

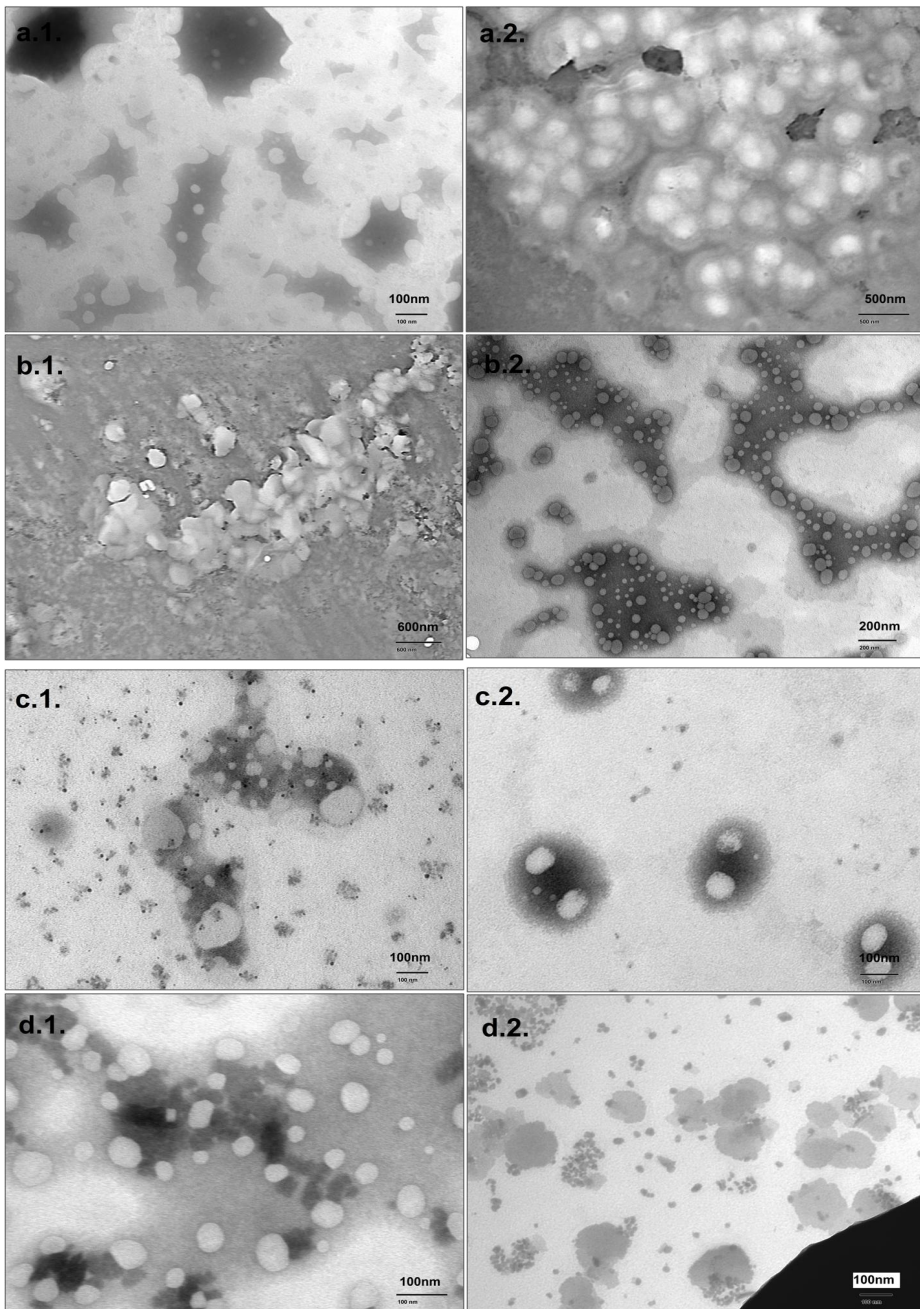


Figura 29. Vesículas liposomales con CyA resuspendidas después de la liofilización, observadas en TEM. SLC con (a.1.) lactosa y (a.2.) sorbitol; SLT1 con (b.1.) glucosa y (b.2.) combo; SLT2-EXT con (c.1.) glucosa y (c.2.) lactosa; SLE con (d.1.) lactosa y (d.2.) combo.

2.7. Estudio de biocompatibilidad: toxicidad de los sistemas liposomales en cultivos celulares

La biocompatibilidad de las formulaciones liposomales ya ha sido probada anteriormente en la línea celular RAW 264.7 (120,121). En la Figura 30, la Figura 31 y la Figura 32 se muestra la viabilidad celular, expresada en porcentaje. Los porcentajes superiores al 80% se consideraron no tóxicos y los inferiores al 40% se consideraron citotóxicos. Entre 80 y 40% se considera toxicidad leve o moderada (125).

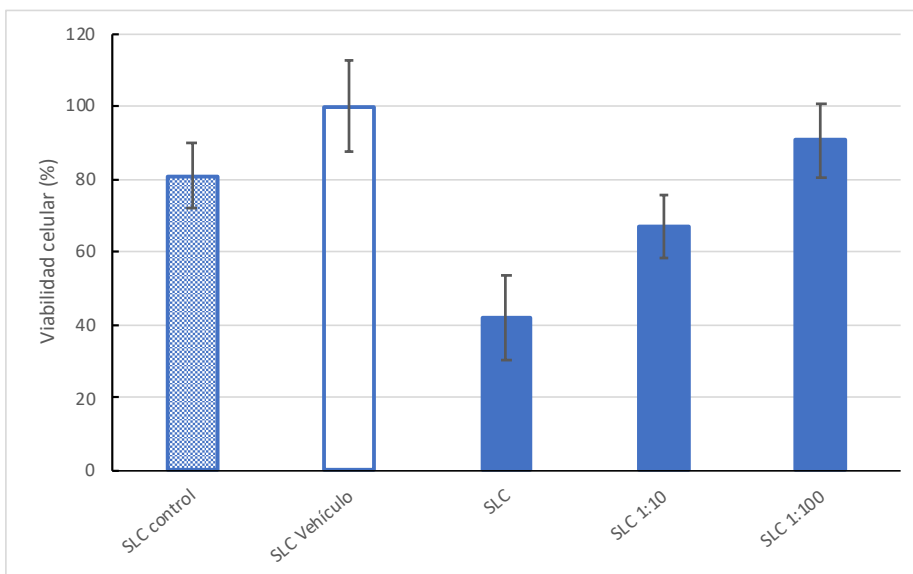


Figura 30. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales convencionales.

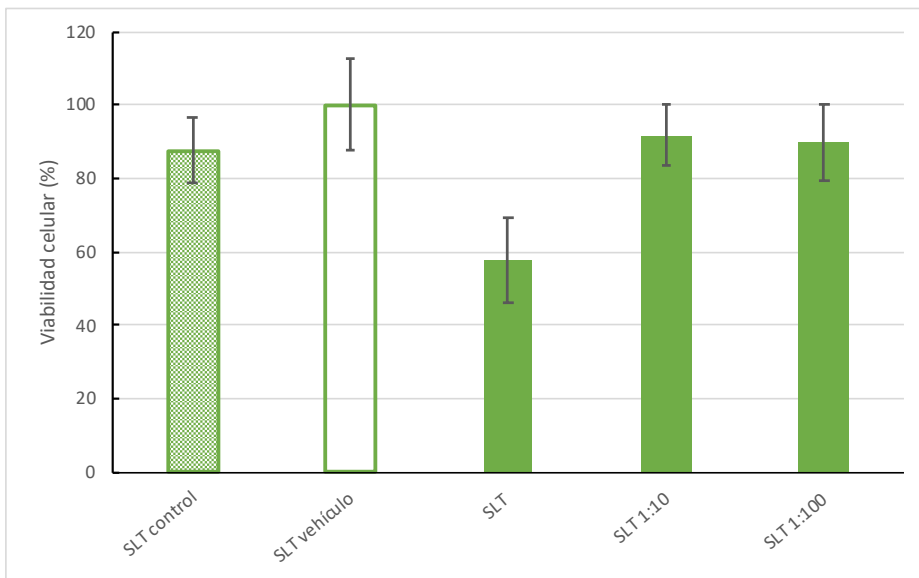


Figura 31. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales transfersomas.

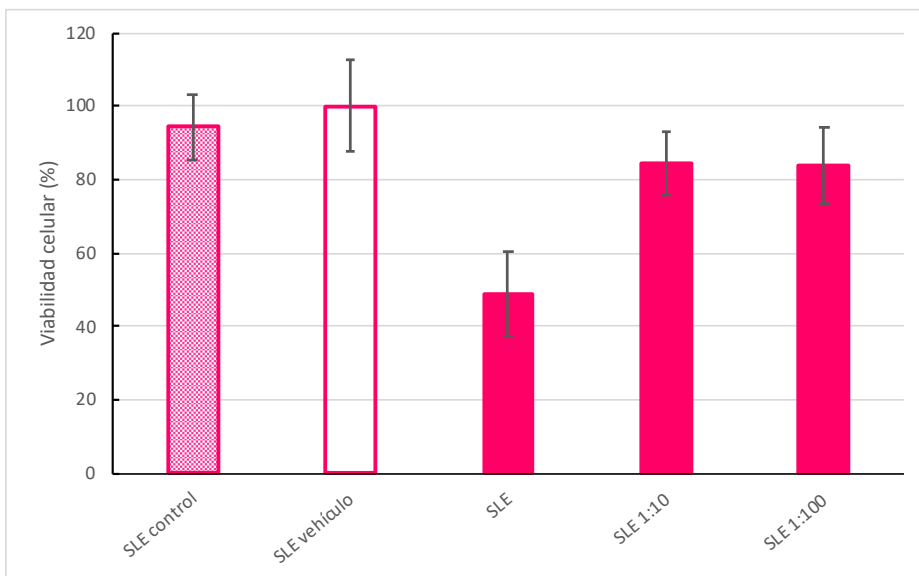


Figura 32. Viabilidad de células RAW 267.4 mediante el ensayo MTT tras el tratamiento con los sistemas liposomales etosomas.

Los resultados obtenidos muestran una relación directa entre la viabilidad celular y la dosis de los sistemas liposomales testados. Las formulaciones sin fármaco (vehículo) no diluidas mostraron un efecto proliferativo celular. Este efecto es uno de los principales inconvenientes de este método para analizar vesículas lipídicas, ya que ciertos componentes de las vesículas pueden estimular el crecimiento celular (126). Por este motivo, para el cálculo se utilizó como referencia el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con sistemas liposomales sin fármaco, en lugar del crecimiento de las células sin tratar.

Los SLC sin diluir mostraron una toxicidad celular leve o moderada, que disminuye con la primera dilución (1:10) y desaparece con una dilución mayor (1:100). Los transfersomas y etosomas mostraron una toxicidad débil o moderada con el tratamiento sin diluir, 57,6% y 48,9% respectivamente. En cambio, si se diluyen las muestras, las formulaciones no muestran toxicidad celular, con un porcentaje de viabilidad celular, con dilución 1:10, del 92% para los transfersomas y de 84% para los etosomas.

Teniendo en cuenta que las vesículas liposomales con alta carga de fármaco podrían provocar efectos citotóxicos en las células (612,613), y que las formulaciones vacías son completamente biocompatibles, parece claro que un aumento de la dosis de CyA es la principal responsable del leve aumento de la muerte celular observada. Sin embargo, la pérdida de viabilidad celular también podría verse afectada por el portador lipídico, ya que proporcionan un

patrón y unas propiedades de liberación del fármaco completamente diferentes.

Como muestra la Figura 30, las formulaciones menos biocompatibles fueron los liposomas convencionales, mientras que los transfersomas y los etosomas fueron altamente biocompatibles (Figura 31 y Figura 32). Mönkkönen et al. (1994) afirmaron que las vesículas cargadas negativamente proporcionaban un suministro eficaz del fármaco a las células, mientras que las neutras eran incapaces de suministrar su contenido (204). Por último, además debe tenerse en cuenta que las concentraciones cutáneas de CyA serían presumiblemente inferiores a las estudiadas en este ensayo de viabilidad celular y, por tanto, no se esperarían problemas de biocompatibilidad con las formulaciones de sistemas liposomas de CyA en la práctica clínica.

2.8. Tape-stripping

2.8.1. Tape-stripping diferencial

Tras la incubación de los diferentes liposomas de CyA en piel porcina durante 2 horas, se obtienen los resultados de la distribución del fármaco en los diferentes estratos de la piel. Los ensayos se realizaron a tiempos de incubación superiores, pero en estos casos se producía una hiper-hidratación de la piel que imposibilitaba la

posterior realización de la técnica de tape-stripping. Los resultados se muestran en la Figura 33, donde se representa el fármaco que se ha extraído de las diferentes capas del SC (S1, S2, S 3-5 y S 6-10), del FP y del resto de piel total tras una incubación de 2 horas.

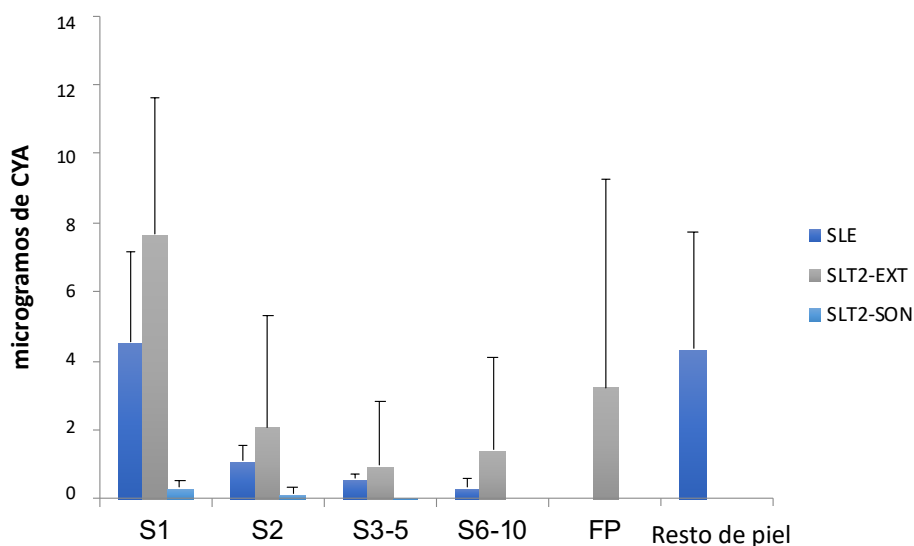


Figura 33. Resultados del tape stripping diferencial.

En este ensayo, el SLT1 no se ha probado, en base a los estudios preliminares (205).

De las tres formulaciones ensayadas, ha sido SLT2-EXT la única encontrada en FP, es decir, la única capaz de acumularse en esta estructura. Posiblemente debido a que su tamaño y rigidez sean los más adecuados para depositarse en el espacio del FP, donde pueden actuar como reservorio de CyA.

La formulación SLE, el etosoma, se ha distribuido hasta las capas más profundas de la piel, a pesar de no acumularse en FP. Son los únicos liposomas que difunden hasta la dermis tras 2 horas de incubación. Probablemente por el efecto promotor del Etanol (206), la alta concentración de CyA, que permite absorciones superiores en cantidad y análisis por encima del LD, y/o a la mayor flexibilidad de estas estructuras (207).

La formulación SLT2-SON, como se observó en los estudios de permeabilidad, es la que peor difunde a través de la piel, aunque se detectan muy bajas concentraciones en las muestras de las capas más superficiales. También parece que no se distribuye bien por el SC ni difunden a capas más profundas, lo que resulta sorprendente, ya que presenta el menor tamaño de todos. El posible efecto promotor del tensioactivo incorporado debería observarse en ambas formulaciones, si este fuera el efecto promotor de la difusión más importante. Sin embargo, teniendo en cuenta los trabajos de Dreier et al (208), es probable que el efecto promotor de las vesículas no se deba a que estas se absorban de forma intacta a través del SC, sino que las vesículas se fusionan con los lípidos del cemento intercelular haciéndolos más fluidos y permeables, gracias a la presencia de los tensioactivos incorporados en la bicapa. Esta fluidificación favorece el paso del fármaco a través de la piel. El menor tamaño de estas vesículas implica también que la concentración de los agentes promotores y de los fosfolípidos sea menor, y que el efecto no se pueda observar de forma tan marcada. Por otro lado, la dosis administrada con esta formulación es menor, debido al menor tamaño

de las vesículas. Este hecho también puede tener un efecto negativo en la promoción de la absorción y dificultar la detección y cuantificación del fármaco, ya que suele estar muy por debajo de la dosis en este tipo de muestras. Por otro lado, también podría deberse a la rigidez de la estructura, ya que no se dispone de datos de flexibilidad, por motivos técnicos, como se ha explicado anteriormente.

Debido a la gran variabilidad de los resultados y a la limitación de 2 horas de incubación que solo permite obtener cantidades recuperadas muy bajas, con una concentración detectada cercana al LD, se decidió realizar los estudios de permeabilidad obteniendo resultados más representativos y acordes al resultado esperado.

2.9. Estudio *in vitro* de permeabilidad, a través de piel separada por calor

Las cantidades acumuladas de CyA difundida por área de difusión de HSE en función del tiempo se presentan en la Figura 34. Los parámetros de permeabilidad calculados, así como la concentración inicial de CyA de cada muestra se recogen en la Tabla 13. Además, en esta tabla, se ha añadido de nuevo el tamaño y la disminución de tamaño, como indicador de la flexibilidad, con fines comparativos.

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

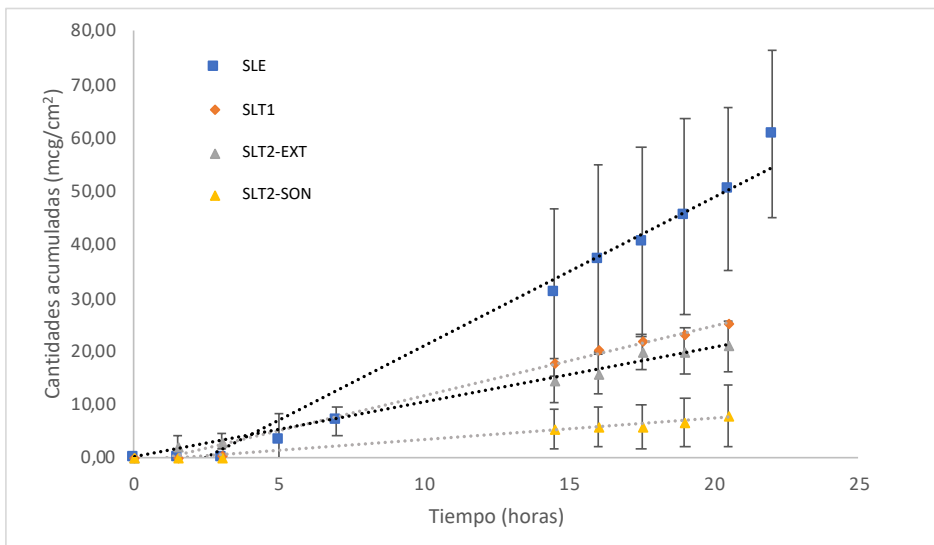


Figura 34. Perfiles de difusión *in vitro* de CyA a partir de las diferentes formulaciones liposomales, a través de epidermis humana en células de difusión tipo Franz. Los resultados se representan cantidad acumulada de fármaco por superficie por hora (n ≥ 4).

Tabla 13. Parámetros de difusión a través de la piel *In vitro* skin de CyA en diferentes formulaciones de liposomas (Media ± DS). (*) Diferencias estadísticas P < 0.001.

Formulación	Flujo máximo (µg/cm²/h)	Flujo/Dosis*10 ⁶ (cm/s)	Concentración de CyA (µg/mL)	Tamaño (nm)	Disminución de tamaño tras extrusión (%)
SLC	Absorción no detectable		952±53	229±2	44
SLT1	1.16±0.2	0.38±0.44	498±54	179±2	28
SLT2-EXT	0.70 ±0.08	0.72±0.12	445±39	139±3	35
SLT2-SON	0.37±0.26	0.29±0.20	351±26	52±1	-
SLE	3.78±1.7	0.56±0.23(*)	1675±72	257±1	14

La difusión de CyA a través de piel separada por calor durante 24 h no se pudo detectar cuando se formuló como una solución hidroalcohólica, o disuelta en medio acuoso incorporando las distintas mezclas de componentes que conforman las diferentes vesículas, ni incorporada en los SLC (Figura 34). Sin embargo, todas las vesículas flexibles facilitaron la penetración de CyA a través de la epidermis, como se muestra en la Tabla 13. El flujo calculado fue el siguiente: SLE > SLT1 > SLT2-EXT > SLT2-SON. La capacidad de difusión aumenta con el tamaño del vehículo y la eficiencia de encapsulación. Cabe señalar en este punto, que no se espera que las vesículas lipídicas difundan intactas a través de la piel porque su tamaño de partícula es demasiado alto para permitirlo (209). Nuestros resultados están de acuerdo con los hallazgos de Dreier et al. (208), quienes estudiaron las interacciones de diferentes tipos de vesículas lipídicas con la piel humana mediante dinámicas de superresolución y fluorescencia. Concluyeron que no se puede afirmar que los liposomas actúen como portadores que transportan sus cargas a través del SC de la piel, sino que interactúan con los lípidos cutáneos alterando la función barrera, facilitando así la liberación del fármaco encapsulado. Tampoco en este trabajo se ha evaluado si la vesícula difunde a través de la piel, ya que es el fármaco el elemento analizado. Sin embargo, estos resultados si que demuestran su capacidad para permitir la difusión de CyA a través de la piel.

Kumar y col. (210) probaron liposomas multilaminares de 950 nm cargados con CyA para el tratamiento de placa crónica limitada. Como sugerimos que hay una mejora dependiente del tamaño, este

hallazgo está de acuerdo con nuestros resultados de no difusión de SLC, ya que nuestras vesículas eran más pequeñas que las presentadas por estos autores, que, además, no presentan detalles en las composiciones, EE o estabilidad de los liposomas preparados. Teniendo en cuenta los flujos máximos obtenidos, las formulaciones de SLE, SLT1, SLT2-EXT y SLT2-SON merecen ser investigadas más a fondo en futuros estudios de eficacia para comparar estos resultados con los encontrados para la formulación de Kumar (210).

Estudios previos que compararon etosomas con transferosomas y liposomas convencionales que contienen celecoxib (211), prosalen (112) y vitamina E (24) mostraron la misma tendencia encontrada en este estudio. Guo y col. estudiaron la influencia de la flexibilidad de las vesículas en la administración tópica de CyA utilizando piel de ratón. Tampoco encontraron permeabilidad en el caso de CyA usando liposomas convencionales. Sin embargo, sus micelas flexibles de colato al 40% tampoco pudieron administrar CyA a través de la piel intacta y solo pudieron administrar CyA después de la eliminación del SC, donde se logró una mejor permeabilidad con las vesículas flexibles (212).

El mayor flujo se obtuvo con las vesículas preparadas con etanol, como se esperaba, ya que varios autores han demostrado que la mejora de la permeación con vesículas que contienen etanol es mucho mayor que con etanol en solución (31), lo que sugiere un mecanismo sinérgico entre el etanol, las vesículas y los lípidos de la piel (212). Los posibles mecanismos para esta mejora de la

permeación incluyen: el etanol puede aumentar la solubilidad del fármaco en la vesícula, también puede alterar la organización de las bicapas lipídicas entre los corneocitos, mejorando así la fluidez de los lípidos de la piel, y el etanol podría extraer parcialmente la fracción lipídica del SC, mejorando el flujo de fármacos (213). Estas vesículas también contenían la mayor concentración de fármaco, que era aproximadamente 3 veces mayor que la de los transfersomas extruidos y 4,8 veces mayor que la de los sonicados. Se esperaba este efecto, ya que también se ha observado que el etanol tiene un efecto significativo en la eficiencia de encapsulación en vesículas, independientemente de la lipofilia (214).

Al correlacionar el flujo logrado con la dosis aplicada, las vesículas más efectivas fueron las SLT2-EXT, seguidas de SLE y SLT1. De nuevo, la formulación menos eficaz fue SLT2-SON. La comparación de SLT2-EXT con SLT2-SON sugiere que no solo se reduce la carga útil del fármaco, sino probablemente también la cantidad de tensioactivo y limoneno presentes dentro de las bicapas lipídicas, que son parámetros críticos para definir la flexibilidad de las vesículas y la actividad de mejora del fármaco. La flexibilidad de las vesículas también puede ser un parámetro determinante, ya que el orden es similar. Sin embargo, la flexibilidad de SLT2-SON no se pudo medir porque su tamaño es inferior al tamaño de poro de los filtros comercializados disponibles.

En cuanto a los promotores químicos presentes en las formulaciones (etanol, Tween 20, Tween 80 y D-limoneno), todos han demostrado su potencial actividad química en la administración tópica

de fármacos. Su actividad depende en gran medida del fármaco probado y del vehículo utilizado (3,206). Liu y col. estudiaron el efecto de diferentes promotores químicos en la permeabilidad de CyA en piel de rata. Descubrieron que la eficiencia de los vehículos probados para mejorar la administración tópica de CyA fue la siguiente: etanol al 40% > oleato de etilo > miristato de isopropilo > propilenglicol > lauroglicol, lo que confirma que la presencia de etanol juega un papel importante en la permeabilidad de CyA (215). En este caso, no se pudo detectar ninguna mejora para ninguna de las mezclas químicas, por lo que no fue posible evaluar el efecto específico de cada molécula. Verma y Fahr, demostraron la capacidad de las vesículas lipídicas que contienen etanol para aumentar la deposición de CyA en el SC, así como el efecto sinérgico entre el etanol y los fosfolípidos NAT 8539, en la mejora de la penetración de CyA, confirmando así nuestros resultados, aunque su trabajo se centró en las cantidades recuperadas en cada capa de la piel, en lugar de las cantidades impregnadas (216).

La eficiencia obtenida por la formulación SLT2-EXT (refiriéndose a la relación Flujo/Dosis más alta obtenida) sugiere que la presencia de Tween 80 y D-limoneno juega un papel importante en el proceso de absorción. La relación Flujo/dosis correspondiente a los transferosomas (SLT1, SLT2-EXT y SLT2-SON), aumentó significativamente en comparación con el etosoma. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Benigni et al., quienes demostraron que CyA es capaz de acumularse en la piel de oreja porcina, cuando se formula como una microemulsión a base de Tween®80 de baja viscosidad. Aunque sus resultados son difíciles de comparar

directamente con los nuestros, porque utilizaron piel porcina en lugar de humana y estudiaron la acumulación de CyA en la piel, en lugar de la permeabilidad (217).

Además, el efecto de estos compuestos dispuestos en vesículas muestra que la estructura de las vesículas juega un papel clave en sus propiedades. Estos potenciadores alteran las propiedades de la bicapa no solo en términos de elasticidad (198), sino también de su capacidad para fusionarse dentro de los lípidos del SC y mejorar la permeabilidad del fármaco a través de la barrera cutánea. Esto también está de acuerdo con los hallazgos de Dreier et al. (208), discutido anteriormente, y con el trabajo de Alvarez-Figueroa et al., quien diseñó una nanoemulsión de cáscara de protamina como vehículo para la administración cutánea de CyA y encontró también un marcado efecto de mejora cuando CyA se incorporó en partículas cargadas negativamente, como es el caso aquí, y también que la disposición de protamina en la cáscara influyó en la retención cutánea de CyA (218). Según esta hipótesis, las vesículas preparadas podrían considerarse potenciadoras químicas en sí mismas, debido a la combinación específica de sus componentes (210,219,220).

Los efectos observados en los ensayos de permeabilidad se correlacionan con los resultados de distribución de fármaco en la piel obtenidos por la técnica de tape-stripping. Pero además parece ser que existe una compleja interacción vector-componentes-piel que no se puede comprender completamente a partir de los ensayos previstos y es necesario seguir investigando sobre estos factores que afectan a la permeabilidad/distribución de fármaco en la piel.

3. Formulación liposomal en hidrogeles

3.1 Formulación hidrogeles liposomales

Se realizaron diferentes lotes con HPMC a 0,5%, 1%, 2% y 2,5% (p/v), siendo los hidrogeles con HPMC al 2% los que presentaban mejores características fisicoquímicas, por lo que fue la concentración escogida para realizar los lotes finales de hidrogeles.

Posteriormente, se disolvieron los diferentes lotes de hidrogeles preparados y se analizaron las muestras mediante HPLC. Se comprobó que la concentración de CyA se mantuvo estable y era homogénea entre los diferentes lotes de hidrogeles.

3.2 Caracterización reológica de los hidrogeles liposomales

La reología consiste en el estudio del flujo o deformación de un material cuando se somete a una tensión. El método es aplicable a la caracterización de sistemas semisólidos, ya que el comportamiento del fluido está relacionado con el tipo, organización del sistema e interacciones entre sus componentes, siendo posible verificar signos de inestabilidad expresados en función del tiempo, temperatura y variación en el área de histéresis (221,222).

Las propiedades reológicas de los semisólidos son parámetros físicos importantes en términos técnicos y visuales. La evaluación

estructural y la coherencia son esenciales para determinar, ajustar y predecir el comportamiento de nuevas formulaciones. También se pueden utilizar para verificar la calidad durante el proceso de producción, además de permitir un estudio del efecto de los aditivos en la formulación y la estabilidad (223).

Según Lucero et al. (224), el esfuerzo de cizallamiento, la velocidad de cizallamiento y el tiempo son parámetros que describen las propiedades reológicas y son importantes para evaluar los cambios físicos en la formulación. La viscosidad es un parámetro importante porque su valor puede alterarse en función de la presencia o no de diferentes materiales, por lo que puede considerarse como uno de los parámetros de referencia para evaluar la estabilidad de sistemas semisólidos (46).

El reograma que se muestra en la Figura 35 demuestra que las formulaciones estudiadas se comportan como sistemas no newtonianos, ya que, a diferencia de los newtonianos, los no newtonianos tienen una relación no lineal entre el esfuerzo de cizallamiento y la velocidad de cizallamiento (225).

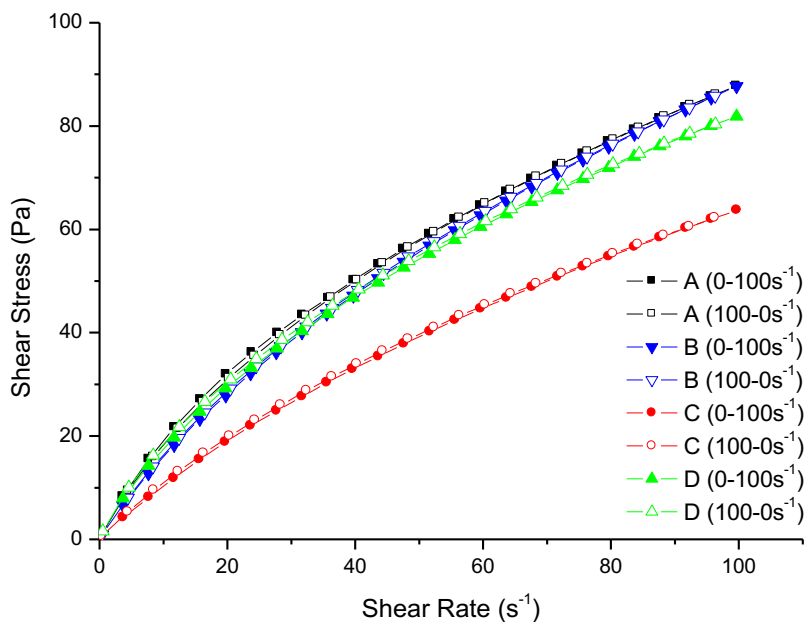


Figura 35. Curva de flujo. Representa la fuerza o presión aplicada frente a la deformación. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE.

Además, estos sistemas tienen las características de los fluidos pseudoplásticos. Este comportamiento resulta de la alineación de las gotas coloidales en el sistema en la dirección del flujo. Según Tokumoto (226), a medida que aumenta la tensión o la velocidad de cizallamiento y se acentúa esta preferencia de orientación, se reduce la resistencia interna del sistema y se produce la consiguiente reducción de la viscosidad.

Las formulaciones con perfil de flujo pseudoplástico producen una película protectora que permite cubrir la superficie de la piel, promoviendo una mejor protección. Las preparaciones

pseudoplásticas típicas contienen moléculas entrelazadas o agregadas, que se rompen bajo esfuerzo cortante y se alinean bajo la dirección del flujo, lo que promueve un deslizamiento fácil con una velocidad de cizallamiento creciente y, en consecuencia, una reducción de la viscosidad (227). La recuperación de la viscosidad es generalmente reversible y puede depender del tiempo, cuya reconstrucción posterior puede deberse al movimiento browniano (228).

Además, todas las formulaciones también son no tixotrópicas, ya que no presentaron un área entre las curvas ascendente y descendente del reograma, es decir, después de haber sufrido un cizallamiento creciente (0-100 s⁻¹), con la reducción gradual de este cizallamiento hasta que cesó, se observó una completa recuperación de la estructura.

El carácter tixotrópico es el resultado de la progresiva destrucción de la estructura construida por las gotitas de la fase dispersa, cuya fuerza de unión no resiste la acción impuesta por el esfuerzo de cizallamiento. El fenómeno se considera reversible, ya que, tras la retirada del esfuerzo externo, las conexiones rotas se reconstituyen reorganizando la estructura interna (229,230).

Es interesante obtener productos no tixotrópicos, por lo que el producto no fluye sobre la piel después de la aplicación debido a una recuperación muy lenta de su estructura (228).

También se pudo observar que las formulaciones de hidrogel con los liposomas SLT1 (A) y SLT2-SON (B) son las más viscosas, seguidas de los que contienen SLE (D) y la menos viscosa es la que

contiene SLT2-SON (C) (Figura 36). La viscosidad aparente mínima (valor de viscosidad a la velocidad máxima de cizallamiento) de la muestra A fue $0,88 \pm 0,009$, B fue $0,88 \pm 0,043$, C fue $0,64 \pm 0,057$ y D fue $0,82 \pm 0,013$. Esto también se observa fácilmente por la tangente del ángulo formado entre el eje x del reograma que se muestra en la Figura 35 anterior.

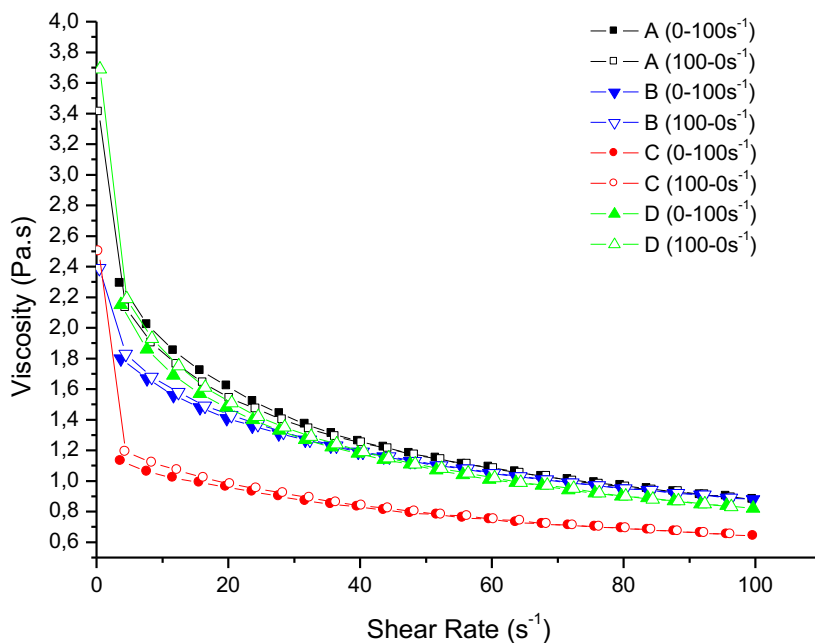


Figura 36. Curva de viscosidad frente a la velocidad de corte. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; C) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE.

La prueba de barrido de frecuencia, que se muestra en la Figura 37, es útil en la caracterización de productos con características viscoelásticas. De acuerdo con este resultado, las formulaciones se pueden caracterizar como viscoelásticas, teniendo un módulo viscoso o de pérdida (G'') superior al módulo de almacenamiento o elástico (G'). Para la muestra de hidrogel con SLE (D) (Figura 37), los valores de G' y G'' son mayores que los demás, y para la muestra de hidrogel con SLT2-EXT (C) son menores, lo que demuestra una característica menos viscoelástica.

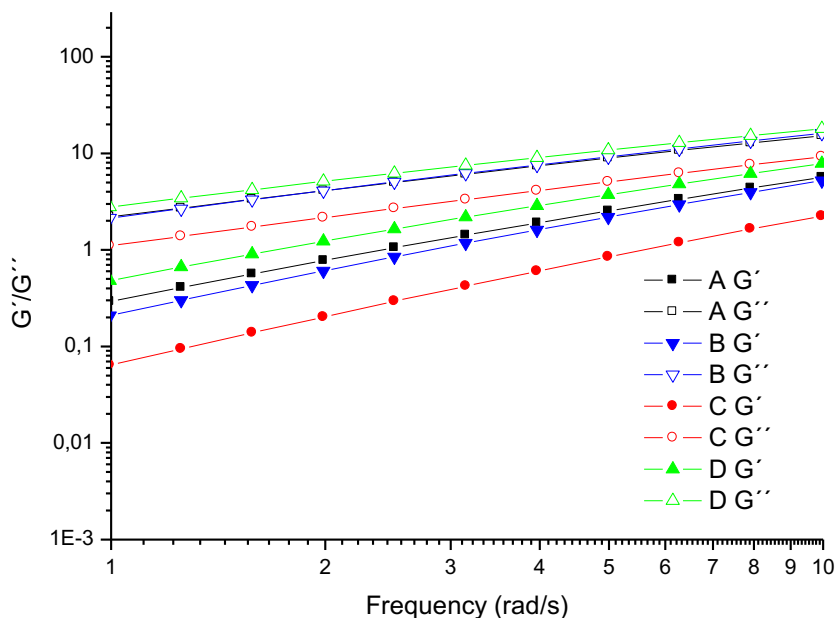


Figura 37. Prueba de barrido de frecuencia. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; B) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE.

Después del ensayo de barrido de frecuencia, las formulaciones se evaluaron en la prueba de fluencia y recuperación. Se trata de un ensayo que permite diferenciar, de forma bastante satisfactoria, las respuestas elásticas o viscosas (222).

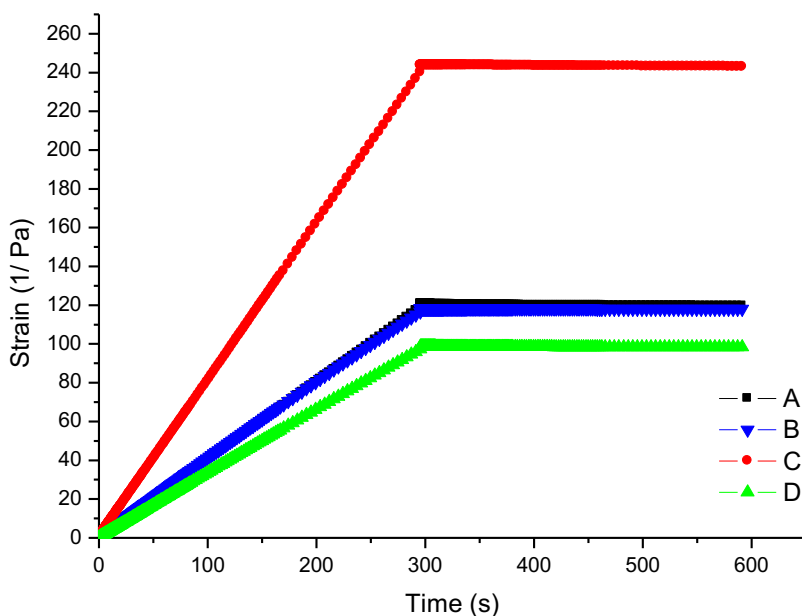


Figura 38. Prueba de fluencia y recuperación. A) Hidrogel con SLT1; B) Hidrogel con SLT2-SON; C) Hidrogel con SLT2-EXT; D) Hidrogel con SLE.

El perfil presentado en fluencia y recuperación en la Figura 38 confirma lo encontrado en la prueba de barrido de frecuencia, ya que las formulaciones presentan características poco elásticas y más viscosas. Se caracterizan por un comportamiento que correlaciona

linealmente la fuerza aplicada y la tasa de deformación. Las muestras sometidas a esfuerzo de cizalla permanente presentan un aumento lineal de la deformación con el tiempo y no presentan recuperación después de la remoción de la tensión aplicada (222).

Los valores de cumplimiento ($1/\text{Pa}$) obtenidos en este ensayo fueron para la muestra de hidrogeles con $\text{SLT1} = 120,74$; $\text{SLT2-SON} = 118,36$; $\text{SLT2-EXT} = 243,76$; $\text{SLE} = 98,74$. El cumplimiento es una variable que demuestra lo complaciente que es una muestra, es decir, cuanto mayor es el cumplimiento, más fácil será deformarse por un esfuerzo aplicado y menor será su viscosidad. Los resultados están de acuerdo con el ensayo de la curva de flujo ya que la formulación C menos viscosa fue, en la presente prueba, la más compatible (222).

Por todo ello, se concluye que la reología es una herramienta importante en el estudio del flujo o deformación de los materiales cuando se someten a esfuerzos. Es útil en la caracterización de sistemas semisólidos, ya que el comportamiento del fluido está relacionado con el tipo, grado de organización del sistema e interacciones entre sus componentes.

3.3 Estudio de liberación de CyA a partir de formulaciones hidrogel liposomal

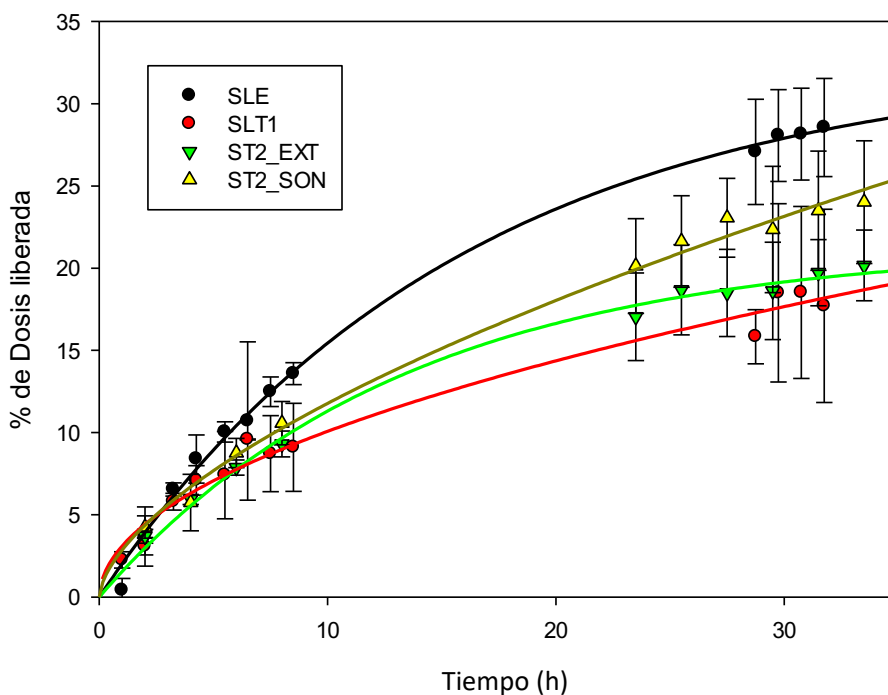


Figura 39. Perfil de liberación de CyA a partir de las diferentes formulaciones liposomales en hidrogel en células de difusión tipo Franz. Los resultados se presentan por porcentaje de la dosis liberada ($n \geq 4$).

Los datos demuestran una liberación controlada del fármaco a partir de las formulaciones. Los datos se ajustan a una ecuación de primer orden ($R^2 > 0.993$), por lo que se puede decir que la liberación se produce de forma pasiva a través de la matriz polimérica, sin efectos de esponjamiento-ensanchamiento de la matriz (231). No obstante, es importante destacar que estos datos son una aproximación, ya que el uso de etanol, necesario para mantener las condiciones sink, puede

influir en la estructura de la matriz polimérica, dando lugar a una liberación más rápida de la que tendría lugar en la práctica clínica.

El gel que contiene los SLT1 es el que controla la liberación en mayor medida, seguido por SLT2-EXT, SLT2-SON y SLE. Tras 36 horas de análisis, ninguno de los geles liberó más del 30% del fármaco, lo que puede atribuirse tanto al control por parte de las vesículas, del gel y a la baja solubilidad del fármaco en el medio acuoso. En general, la incorporación de liposomas en hidrogeles se presenta como una estrategia útil para prolongar la liberación del fármaco encapsulado en los sistemas liposomales (107,108).

4. Resumen e implicaciones de los resultados obtenidos en este capítulo

Han sido desarrolladas cuatro formulaciones de sistemas liposomales ultraflexibles cargados con CyA, con unas características óptimas para su administración. Las vesículas mostraron una estructura multilamelar con una forma esférica regular y un tamaño de partícula adecuado con distribución uniforme de tamaño. Mostraron un potencial Z negativo > 30 mV, como indicador de estabilidad a largo plazo.

El fármaco ha sido incorporado a la bicapa con un porcentaje de encapsulación entre 90-95%, excepto para SLT2 que fue del 60%. Todas las formulaciones aumentaron la solubilidad de CyA en medio acuoso respecto al fármaco libre.

Estos sistemas, resultaron ser estables en el tiempo ya que no se observó cambios significativos en el tamaño de las partículas en función del tiempo al almacenarse a 4°C, 25°C, 30°C, 45°C y 60°C, excepto a 60°C para los etosomas y liposomas convencionales que se degradaron. No se encontraron cambios en el contenido de CyA después de 21 días a estas temperaturas. Se probaron diferentes crioprotectores y se obtuvieron óptimos resultados con alguno de ellos para cada una de las formulaciones, excepto para SLT2-SON. Las vesículas se liofilizaron con el agente crioprotector adecuado y se observó que estos no tuvieron un efecto significativo sobre la morfología de las vesículas.

Los diferentes sistemas liposomales demostraron ser biocompatibles, mostrando resultados de porcentaje de viabilidad celular correspondientes a una toxicidad leve o moderada con el tratamiento sin diluir en células *in vitro* y con resultados de no toxicidad al diluir las formulaciones antes del tratamiento. Esto demuestra una relación directa entre la viabilidad celular y la dosis de los sistemas liposomales probados.

Se evaluó la distribución de la CyA por las diferentes capas de la piel y se observó que se producía una distribución de esta, siendo el etosoma el que difunde hasta capas más profundas en tan solo dos horas. La formulación liposomal de menor tamaño (SLT2-SON) fue la única que se encontró acumulada en el FP, desde donde puede actuar como reservorio del fármaco.

Todas las vesículas flexibles facilitaron la penetración de CyA a través de la epidermis. El flujo calculado fue el siguiente: SLE> SLT1> SLT2-EXT> SLT2-SON. La capacidad de difusión aumenta con la dosis, el tamaño del vehículo y la eficiencia de encapsulación. Al correlacionar el flujo logrado con la dosis aplicada, las vesículas más efectivas fueron las SLT2-EXT, seguidas de SLE y SLT1. La formulación menos eficaz fue SLT2-SON.

Posteriormente, a partir de las dispersiones coloidales de las diferentes formulaciones liposomales se formularon hidrogeles de HPMC al 2%. Estos hidrogeles presentaron unas características fisicoquímicas óptimas y mantuvieron una concentración de CyA estable. El estudio reológico de los mismos mostró un

comportamiento de sistema no newtoniano, ya que mostraron una relación no lineal entre el esfuerzo de cizallamiento y la velocidad de cizallamiento, con características de fluidos pseudoplásticos. Este tipo de formulaciones produce una película protectora que permite cubrir la superficie de la piel, promoviendo una mejor protección. Se promueve un deslizamiento fácil con una velocidad de cizallamiento creciente y, en consecuencia, una reducción de la viscosidad. Todas las formulaciones son no tixotrópicas, es decir, después de haber sufrido un cizallamiento creciente, con la reducción gradual de este cizallamiento, se observó una completa recuperación de la estructura. Las formulaciones se pueden caracterizar como viscoelásticas, siendo menos elásticas y más viscosas. Se caracterizan por un comportamiento que correlaciona linealmente la fuerza aplicada y la tasa de deformación.

Los estudios de liberación de CyA a partir de los sistemas liposomales formulados en hidrogel muestran que la liberación se produce de forma controlada mediante difusión pasiva a través de la matriz polimérica, sin efectos de esponjamiento-ensanchamiento de la matriz.

La administración tópica de CyA es posible utilizando cuatro de las formulaciones diseñadas para este proyecto, lo que abre la posibilidad de usar este fármaco por vía tópica, como alternativa a las vías oral o parenteral actuales (19). La administración tópica evitaría efectos secundarios sistémicos y, por tanto, podría escogerse como tratamiento de primera línea para las enfermedades inflamatorias de

la piel con componente inmunológico, como es el caso de la psoriasis o la DA. El mecanismo de administración del fármaco subrayado debe investigarse más a fondo, pero la sola presencia de los promotores químicos en medio acuoso con el fármaco puede descartarse como la causa de estos resultados. Por lo tanto, el ensamblaje fosfolípidos-promotores químicos-fármaco es el parámetro clave para comprender este mecanismo de mejora. Además, el tamaño de partícula, la carga útil del fármaco y la flexibilidad de las vesículas también revelaron ser parámetros relevantes para comprender la eficiencia de la potenciación de la permeabilidad.

V.- CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de CyA por HPLC. El método desarrollado es válido, lineal, preciso, exacto, robusto y reproducible.
2. Se ha desarrollado cuatro formulaciones de sistemas liposomales ultraflexibles cargados con CyA, con unas características óptimas para su administración. Las formulaciones consiguen aumentar la solubilidad de CyA en medio acuoso respecto al fármaco libre. Mostraron una distribución del tamaño uniforme, con un tamaño de partícula dentro del intervalo esperado para vesículas lipídicas de este tipo y con una óptima incorporación del fármaco en la bicapa. Presentaron valores de potencial Z negativos como índice predictivo de estabilidad a largo plazo. Mostraron una estructura multilamelar con una forma esférica regular. El porcentaje de encapsulación de CyA dentro de las vesículas lipídicas fue elevado en todas las formulaciones (90-95%) excepto para una de ellas. El etosoma resultó ser el más flexible de las preparaciones, seguido de los transfersomas que presentaron una flexibilidad mayor que los liposomas convencionales.

3. Los sistemas liposomales han resultado ser estables en el tiempo al almacenarse a diferentes temperaturas (desde 4°C hasta 60°C). Los etosomas y liposomas convencionales se degradaron a 60 °C. Se ha seleccionado un crioprotector óptimo para cada formulación y se ha conseguido liofilizar sin mostrar efecto significativo sobre la morfología de las vesículas.
4. Los sistemas liposomales han mostrado ser biocompatibles, mostrando resultados de porcentaje de viabilidad celular correspondientes a una toxicidad leve o moderada con el tratamiento sin diluir en células *in vitro* y con resultados de no toxicidad al diluir las formulaciones antes del tratamiento.
5. La CyA se distribuye en las diferentes capas de la piel y el folículo piloso cuando es administrada mediante los nuevos sistemas liposomales. Siendo la formulación SLT2-SON la única capaz de acumularse en el folículo piloso, pudiendo actuar como reservorio del fármaco. Los etosomas difunden hasta las capas más profundas de la piel en tan solo dos horas.
6. Todos los sistemas liposomales flexibles facilitaron la difusión de CyA a través de la epidermis humana, siendo el acceso tamaño dependiente: SLE>SLT1>SLT2-EXT>SLT2-SON. Al correlacionar el flujo logrado con la dosis aplicada, las

vesículas más efectivas fueron las SLT2-EXT, seguidas de SLE y SLT1. La formulación menos eficaz fue SLT2-SON.

7. Se han formulado hidrogeles de HPMC al 2% a partir de las dispersiones coloidales de las diferentes formulaciones de liposomas, presentando unas características fisicoquímicas óptimas y manteniendo una concentración de ciclosporina estable. El estudio reológico de los hidrogeles muestra que se comportan como sistemas no newtonianos, con perfil de flujo pseudoplástico, permitiendo crear una película protectora cubriendo la piel. Los estudios de liberación de CyA a partir de los sistemas liposomales formulados en hidrogel muestran que la liberación se produce de forma pasiva a través de la matriz polimérica, sin efectos de esponjamiento-ensanchamiento de la matriz.

Capítulo 2.

Nanopartículas y micropartículas de PLGA con ciclosporina para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

Resumen

La EII es una patología prevalente que afecta cada vez a un mayor número de personas en la población mundial. Engloba dos enfermedades, la EC y la CU. La etiología de la enfermedad es desconocida, lo que dificulta su tratamiento farmacológico, siendo éste muy inespecífico. Los tratamientos de primera línea para estas enfermedades son los inmunomoduladores y corticoides, que presentan gran cantidad de efectos adversos en tratamientos sistémicos. Debido a ello, las dosis requeridas de corticosteroides e inmunosupresores no pueden administrarse durante largos períodos de tiempo.

En tratamientos con administraciones por vía oral, gran cantidad de la dosis administrada es absorbida a través de la mucosa intestinal, llegando a la circulación sistémica. Esto es un problema si la finalidad es el tratamiento local en el tubo digestivo, ya que la cantidad disponible de fármaco en la zona es reducida y obliga a administrar dosis superiores, dando lugar a efectos sistémicos y tóxicos indeseados. Para lograr un tratamiento óptimo de la EII, el medicamento debe aplicarse idealmente de forma local ofreciendo un efecto inmediato en la zona a tratar. Este es un desafío difícil cuando el tejido objetivo es un tejido absorbente en sí mismo, ya que el fármaco se elimina rápidamente de la luz intestinal hacia el torrente sanguíneo.

Por todo ello, se presenta la necesidad de mejorar el diseño de las formas de administración disponibles para el tratamiento de estas

patologías. En este contexto, los sistemas nano- y micro-estructurados de tipo polimérico permiten liberar el fármaco de forma gradual en el lumen intestinal, debido a su perfil de liberación sostenida y gracias a sus propiedades mucoadhesivas, que aumentan el tiempo de contacto, producen una acción farmacológica más selectiva, localizada y duradera, al tiempo que reducen la cantidad de fármaco que accede a circulación sistémica y, por tanto, sus posibles efectos adversos.

En base a esta hipótesis, surge el Proyecto “Nanopartículas-PLGA-ciclosporina en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal”, financiado por la Generalitat Valenciana (GV720I3/086), llevado a cabo en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia y por el proyecto precompetitivo de la Universitat de València UV-INV-PRECOMP12-80750. Estos proyectos colaborativos, entre la Universitat de Valencia y la Universidad de Saarland, tienen como objetivo principal el diseño de partículas de PLGA-CyA (poli(láctico-co-glicólico)-ciclosporina para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

El fármaco inmunosupresor CyA se formuló en NP preparadas por el método de nanoprecipitación y en MP fabricadas por nano spray-drying. El polímero biodegradable utilizado en las formulaciones fue el ácido poli(láctico-co-glicólico). La CyA es efectiva para el tratamiento de la enfermedad intestinal, pero también causa varios efectos adversos graves que podrían ser minimizados mediante la utilización de tecnología avanzada de administración de medicamentos.

A través de estos sistemas de liberación se pretende conseguir una acumulación de las partículas en el lumen intestinal desde donde se consiga una liberación sostenida en el tiempo de dosis bajas, de forma que se concentre el activo en el lugar de acción y se reduzca el acceso a la circulación sistémica, disminuyendo en gran medida los efectos sistémicos asociados a su uso.

En este trabajo, se estudió el perfil cinético de absorción intestinal de CyA liberada de las NP y MP en un modelo *in vitro* con células representativas de la mucosa intestinal, y un modelo *in situ* en rata Wistar. De esta forma se evaluó si los sistemas de encapsulación eran eficaces para liberar la CyA de una forma sostenida y aumentar su tiempo de permanencia en el lumen intestinal. Los resultados obtenidos en el marco de este proyecto podrían aportar una mejora sustancial al tratamiento actual, repercutiendo directamente en la calidad de vida de las personas afectadas.

I.- ANTECEDENTES

1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII es un conjunto de patologías que afectan al tracto intestinal y se caracterizan por la presencia de un componente autoinmune, inflamación y cronicidad (232). Estas enfermedades, que causan inflamación del colon y/o del intestino delgado, cursan con brotes de actividad, durante los cuales aparecen síntomas característicos de esta fase, como diarrea, fiebre y fatiga, dolor y cólicos abdominales, disminución del apetito y/o adelgazamiento no intencionado (233). Estos síntomas tienen una duración e intensidad variable y, aunque generalmente reaparecen a lo largo del tiempo, los pacientes suelen alternar esta fase con periodos asintomáticos de mayor o menor duración (232,234).

La EII es más frecuente en países desarrollados y afecta por igual a hombres y mujeres (234). También afecta a individuos de todas las edades, pero en general comienza antes de los 30 años, con incidencia pico entre los 14 y los 24 años. A pesar de ello, puede haber un segundo pico de incidencia más pequeño entre los 50 y los 70 años; sin embargo, este pico más tardío puede ser más grave, incluyendo en algunos casos, colitis isquémica (232).

La causa concreta de las variantes de la EII es desconocida (35,232). No es una patología hereditaria, pero aparece en personas con predisposición genética. En estos casos, distintos factores como tener una infección o el tabaco pueden provocar una respuesta alterada del sistema inmune que se mantiene a lo largo del tiempo (234).

Las investigaciones actuales apuntan a que la enfermedad puede surgir como resultado de una compleja interacción entre la predisposición genética (susceptibilidad) de una persona a padecer la enfermedad, la exposición a factores ambientales y la microbiota intestinal, con la posible participación de agentes infecciosos (35). La combinación de estos factores puede acabar desencadenando una respuesta inflamatoria intestinal, que puede terminar cronicándose.

Signos y síntomas

El diagnóstico de las EII es complicado y puede retrasarse, debido a que sus síntomas son poco específicos, y pueden dar lugar a confusión con otras enfermedades gastrointestinales, como la celiaquía o el colon irritable. Los síntomas de la EII suelen ser crónicos, alternando épocas donde hay actividad inflamatoria, lo que conocemos como “**brotos**”, y periodos sin síntomas, denominados “**remisión**”. El número de brotes es distinto en cada persona y puede oscilar desde uno cada varios años hasta numerosos brotes anuales (234).

Entre los síntomas más característicos y comunes a ambos tipos de EII se pueden citar: diarrea, dolor abdominal, hemorragia rectal, fiebre, anemia, pérdida de peso, fatiga, alteraciones psicológicas, retraso en el crecimiento y maduración sexual en niños y, otras manifestaciones extraintestinales (dermatológicas, oftalmológicas, reumatológicas, etc.) (232,233).

1.1 Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa

Las dos variantes de la EII mejor conocidas son la EC y la CU. La CU afecta de forma exclusiva a la capa más superficial del colon o intestino grueso. En cambio, la EC puede afectar a todo el intestino, alternándose zonas sanas con tramos inflamados (234).

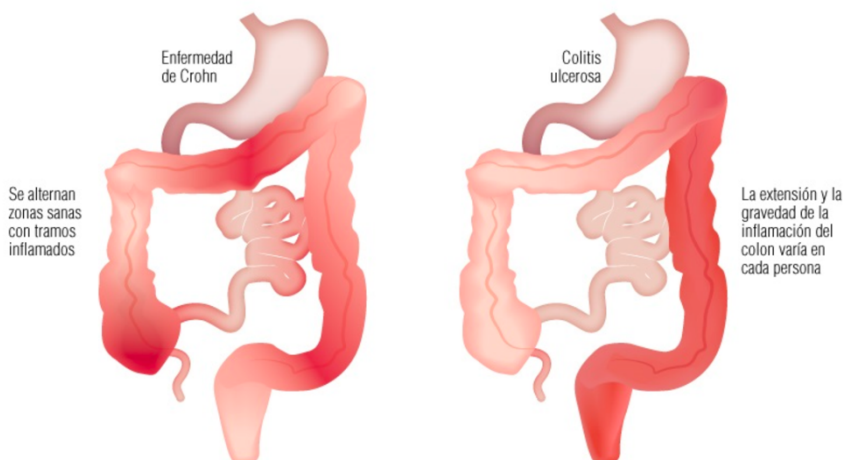


Figura 40. Afectación del intestino por la EC y CU (234).

Estas dos variantes se describen a continuación (35,233,235,236):

a) Colitis ulcerosa

La CU es una enfermedad crónica en la que se produce una inflamación difusa en forma de úlceras más o menos profundas en función de la gravedad de la enfermedad, afectando únicamente a la capa más interna del tracto digestivo, la mucosa. Estas ulceraciones se localizan preferentemente en el colon. No obstante, hasta en el 95% de los casos afecta también al recto y con frecuencia se extiende hacia las zonas proximales del colon (237).

Su prevalencia varía según áreas geográficas, siendo más prevalente en países desarrollados. En estos países, la prevalencia se estima entre 0,49-50,5 casos cada 100.000 habitante (237).

Su etiología se ha relacionado con factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Se ha demostrado que existen polimorfismos en los genes STAT4 (Signal Transduce and Activator of Transcription) que aumenta el riesgo, en la población caucásica, de padecer CU (238).

La CU puede ser clasificada en tres tipos, dependiendo de la extensión de las lesiones: proctitis (mucosa del resto afectada), colitis izquierda (afectación hasta el ángulo esplénico) o colitis extensa o pancolitis (afectación más allá del ángulo esplénico) (239).

La inflamación causada por la CU compromete la mucosa y la submucosa, y hay un límite definido entre el tejido normal y el afectado. Sólo en la enfermedad grave compromete la capa muscular de la mucosa. En estadios tempranos de la enfermedad, se observa una mucosa eritematosa, finamente granulosa y friable, con pérdida del patrón vascular normal y, a menudo, con zonas hemorrágicas dispersas. La enfermedad grave se caracteriza por grandes úlceras mucosas, con exudado purulento abundante. No hay fístulas ni abscesos.

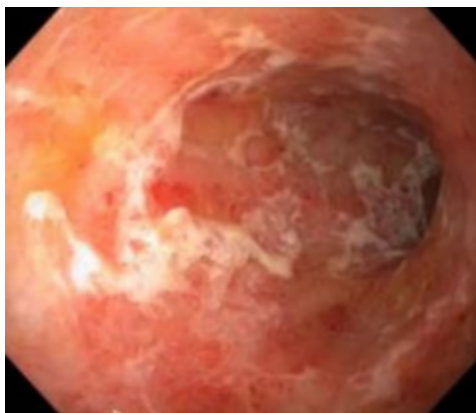


Figura 41. Hallazgos colonoscópicos de paciente con CU (235).

Además de las manifestaciones intestinales, hasta el 30% de los pacientes presentan manifestaciones extraintestinales siendo más frecuentes en el sexo femenino. Pueden manifestarse en correlación con la inflamación intestinal o de manera independiente y las más frecuentes son: manifestaciones musculoesqueléticas como artralgias, artritis, espondilitis anquilosante, osteoporosis; manifestaciones dermatológicas como pioderma gangrenoso y eritema nodoso; manifestaciones oculares como uveítis; trastornos psiquiátricos como

ansiedad o depresión o la colangitis esclerosante primaria, relacionada con mayor riesgo de colangiocarcinoma y cáncer colorrectar (237).

En cuanto al diagnóstico, no existe una prueba definitiva pero puede establecerse mediante la combinación de una correcta anamnesis, exploración física y pruebas complementarias que ayudarán a confirmarlo o a excluir otras causas (237).

El tratamiento se centra en mantener el mayor tiempo de remisión posible, es decir, que exista una remisión completa de los síntomas y cicatrización de la mucosa, evitando así al máximo el uso de corticoides y el desarrollo de cáncer colorrectal (237).

Las rectorragias profusas por el sangrado de las úlceras son las complicaciones más frecuentes, seguido de la perforación intestinal y las estenosis del colon. El megacolon tóxico, aunque es una complicación rara, es más frecuente que en la EC. Se ha observado mayor riesgo de colectomía y peor pronóstico en pacientes ingresados con enfermedad grave que han tenido una respuesta incompleta al tratamiento intensivo de corticoides y/o CyA a la semana del ingreso (237).

b) Enfermedad de Crohn

La EC es un proceso inflamatorio crónico con afectación multisistémica que cursa con brotes intermitentes de inflamación y remisión. Principalmente afecta al íleon distal y colon, pero hasta en un 10-15% de los casos se asocian lesiones en el tracto digestivo

superior (240). No obstante, puede producir inflamación de cualquier zona del tubo digestivo desde la boca hasta el ano.

Su prevalencia está en aumento, aunque varía en función de las zonas geográficas, siendo más frecuente en países desarrollados, en zonas urbanas y en clases sociales altas. En países occidentales, la incidencia varía entre 0,5-15,4 casos cada 100.000 personas/año (241). Es ligeramente más frecuente en mujeres y se puede presentar a cualquier edad, siendo un tercio de los casos diagnosticados antes de los 21 años. Aun así, entre el 10 y el 15% de los casos se diagnostican pasados los 60 años (242).

Como en el caso de la CU, su etiología se ha relacionado con factores genéticos, inmunológicos y ambientales, a pesar de ser desconocida (242).

La inflamación es típicamente transmural y comienza con la aparición de llagas, que con el tiempo pueden ulcerarse y evolucionar a estrecheces de la pared del tubo digestivo o a fístulas. Llegado a este punto, las lesiones pueden llegar a atravesar todas las capas del tejido y alcanzar otras estructuras contiguas, como asas intestinales, vejiga o músculo psoas.

Los síntomas son de inicio insidioso y variados, dependiendo de la localización de la enfermedad, la edad y la gravedad. Los síntomas son más graves con lesiones más extensas, con sintomatología inflamatoria sistémica o si existen complicaciones como estenosis, abscesos o fístulas. El síntoma más frecuente es la diarrea dolorosa crónica de más de 6 semanas con tenesmo o incontinencia y que no

respeto el sueño. En comparación con la CU, solo en la mitad de los casos vendrá acompañada de sangre o moco. Los otros síntomas más frecuentes son el dolor abdominal y la pérdida de peso. Más frecuentemente que en la CU aparecen náuseas y vómitos. Como distinción de la CU están las manifestaciones perianales, que están ya presentes en el momento del diagnóstico en el 10% de los casos. A pesar de ello, el diagnóstico diferencial con la CU es complejo y hasta un 3% de los pacientes con EC cólica pueden ser clasificados como CU erróneamente. La afectación parcheada, la inflamación del íleon y la presencia de granulomas en la anatomía patológica son sugestivas de EC (242).

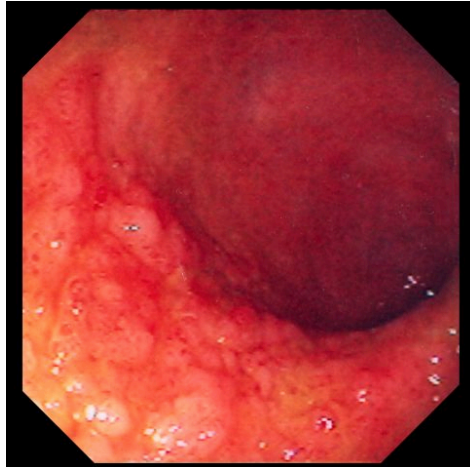


Figura 42. Hallazgos colonoscópicos de paciente con EC (236).

Al igual que la CU, la EC afecta principalmente a diferentes partes del intestino, pero, no obstante, se consideran enfermedades de carácter sistémico, ya que pueden afectar en algunos casos a otras partes del cuerpo. Esto ocurre con mayor frecuencia en la EC que en la CU y afecta al 35% de los pacientes (232,233). Algunas como la artritis, eritema nodoso, aftas orales y epiescleritis, están relacionadas con la actividad de la enfermedad, pero otras siguen un curso independiente, como el pioderma gangrenoso, uveítis, sacroileítis, espondilitis y, menos frecuente que en la CU, colangitis esclerosante primaria (242).

La actividad de la EC se establece en leve a moderada, moderada a grave o grave, en función de diferentes factores como si hay hospitalización, variaciones en la consistencia de la dieta, respuesta al tratamiento, síntomas, pérdida de peso, niveles de proteína C reactiva (242).

En cuanto al diagnóstico, no existe una prueba única y definitiva, por lo tanto, se basa en la clínica, los hallazgos de la exploración física y las pruebas de laboratorio y procedimientos endoscópicos (242).

El objetivo del tratamiento farmacológico consiste en conseguir la remisión del brote de actividad y lograr que se mantenga un estado asintomático. El tratamiento se debe realizar empleando dosis escalonadas de fármacos en función de la actividad, la localización de la inflamación y el tipo de enfermedad y complicaciones. En ocasiones es más complicado de precisar que en la CU (242).

Las complicaciones intestinales como estenosis, masas inflamatorias en el abdomen, fístulas, abscesos o perforaciones, con las complicaciones más frecuentes ya que las sufre la mitad de los pacientes en los 20 años siguientes al diagnóstico y cerca del 20% de los pacientes presentan úlceras gástricas o duodenales. En cambio, el megacolon tóxico y las hemorragias con menos frecuentes que en la CU (242).

Cuando la enfermedad afecta de forma extensa al colon, el riesgo de cáncer colorrectal es similar al de la CU. Este riesgo aumenta si hay mayor inflamación o duración de la enfermedad, en función de la gravedad de esta, inicio en personas jóvenes o con antecedentes familiares. La mortalidad de los pacientes con EC es ligeramente mayor que en la población general, en parte, por este tipo de cáncer, ya que está relacionado con la mayoría de muertes, además de con la malnutrición o las complicaciones quirúrgicas (242).

1.2 Fármacos utilizados en el tratamiento de la EII

Hasta el momento no se ha logrado desarrollar un tratamiento que permita el restablecimiento completo del paciente y la cura definitiva de la EII. Debido a ello, se prescriben tratamientos sintomáticos en las fases agudas de la enfermedad y tratamientos de mantenimiento que eviten la aparición de estos síntomas durante las fases asintomáticas. El tratamiento es complejo y variable de un paciente a otro por lo que requiere un enfoque individualizado en base a los síntomas que presenta el paciente y los resultados de las pruebas.

Los tratamientos sintomáticos utilizados para mejorar algunas de las manifestaciones de la enfermedad son principalmente analgésicos para el dolor abdominal y astringentes para la diarrea, acompañados de vitamina D y calcio en pacientes tratados con corticoides (232,233,237).

Dentro del segundo grupo, se puede utilizar distintos tipos de fármacos específicos, entre los que destacan los siguientes (233,243,244):

- **Aminosalicilatos:** Mesalazina, Sulfasalazina.
Fármacos antiinflamatorios que actúan disminuyendo la inflamación intestinal al bloquear la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Se emplean tanto en el tratamiento de los brotes leves-moderados como para la prevención de recaídas, sobre todo en CU.
- **Corticoides:** Beclometasona, Budesonida, Deflazacort, Prednisona.
Fármacos con efecto antiinflamatorio e inmunosupresor que actúan regulando la respuesta del sistema inmunitario y disminuyendo la producción celular de sustancias que provocan la inflamación intestinal. Son útiles para disminuir la inflamación del intestino durante los brotes moderados y graves, en cambio, no son apropiados para el mantenimiento ya que se evita la utilización durante largos periodos de tiempo por sus efectos adversos.

- **Inmunomoduladores:** Azatioprina, Mercaptopurina, CyA, Metotrexato.

Fármacos que modulan la respuesta exacerbada del sistema inmunitario disminuyendo la inflamación. Son eficaces para mantener la enfermedad inactiva, aunque suelen reservarse para determinadas situaciones de la enfermedad, sobre todo cuando no responde a otros tratamientos, cuando hay resistencia o dependencia a los corticoides y en los casos en los que la enfermedad es de manejo problemático. En algunos casos, también se combinan con terapia biológica.

- **Terapia biológica:** Infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab, vengolizumab o ustekinumab. Estos nuevos fármacos actúan bloqueando mediadores inmunológicos e inflamatorios, liberados principalmente por linfocitos T activados, como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa). Estos fármacos, denominados anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral (anti-TNF), fueron los primeros fármacos biológicos utilizados en el tratamiento de la EII. El infliximab, el certolizumab, el adalimumab y el golimumab son útiles en la EC para prevenir o retrasar la recurrencia posoperatoria. El infliximab, el adalimumab y el golimumab son beneficiosos en la CU cuando la enfermedad es resistente al tratamiento o dependiente de corticosteroides. Ante brotes moderados-graves, el anticuerpo monoclonal anti-integrina α 1804B7 Vedolizumab ha demostrado ser eficaz en la

inducción de la remisión.¹⁸¹ En pacientes con brote moderado-grave sin respuesta a anti-TNF podría ser eficaz la administración de tofacitinib, un inhibidor de la Jak-quinasa administrado por vía oral.

- **Antibióticos:** Metronidazol, Ciprofloxacino.

Se usan para tratar las infecciones causadas por agentes bacterianos o para controlar situaciones de la enfermedad que condicionen un sobrecrecimiento bacteriano patológico. Los antibióticos pueden ser útiles en la EC, pero son de limitada utilidad en la CU, excepto en la colitis tóxica.

CICLOSPORINA

Para el proyecto desarrollado se seleccionó como fármaco la CyA, formulada en NP y en MP de PLGA de tipo matricial. La CyA, como ya se ha descrito anteriormente, es un fármaco inmunosupresor que actúa reduciendo la actividad del sistema inmunológico. Tanto en la EC como en la CU, se sabe que hay una respuesta inmune aumentada, por lo que este tipo de fármacos pueden resultar útiles en el tratamiento al bloquear la activación de los linfocitos (232,243). Además, este fármaco produce numerosos y graves efectos secundarios derivados de la depresión del sistema inmune a nivel sistémico, como son las infecciones oportunistas u otros efectos sistémicos como la nefrotoxicidad, hipertensión y neuropatía, por lo

que a pesar de los beneficios que presenta para este tipo de pacientes, no se propone como tratamiento salvo en casos de CU grave que no responde a corticoesteroides ni a terapia biológica.

Por lo tanto, la CyA es efectiva para el tratamiento de la EII, pero también causa varios efectos adversos graves (43–45), que podrían minimizarse utilizando un sistema avanzado que se retenga en la mucosa donde module la liberación del fármaco proporcionando dosis bajas y sostenidas directamente en el tejido diana, de tal forma que las cantidades de fármaco que pasen a circulación sanguínea sean insuficientes para dar lugar a efectos sistémicos. Es, por tanto, un candidato ideal para el desarrollo de un sistema de administración de fármaco con actividad local a nivel intestinal.

2. Nanopartículas y micropartículas

Los sistemas nanoestructurados poliméricos de tipo matricial son los sistemas de liberación controlada más estudiados. Han demostrado una alta eficacia para encapsular y liberar de forma controlada diversas moléculas de gran tamaño, incluyendo proteínas, antimicrobianos, analgésicos y antitumorales (245). Estos sistemas abren nuevas posibilidades en el tratamiento de enfermedades como la EII (38), ya que ofrecen ventajas respecto a las formulaciones empleadas tradicionalmente, entre ellas, su perfil de liberación sostenida y su acumulación selectiva y local en el lumen intestinal (35).

Estudios anteriores han revelado las ventajas de las NP y las MP para la terapia de la EII. Por un lado, NP y MP habían demostrado ser capaces de acumularse en las áreas ulceradas del colon durante períodos prolongados de tiempo, por lo que pueden proporcionar una liberación sostenida del fármaco *in situ* (246–249). Los mecanismos subyacentes a esta retención aún no se conocen completamente, pero lo más probable es que estén relacionados con los cambios morfológicos y fisiopatológicos del tejido mucoso en estado de inflamación, como la relajación de las uniones intercelulares estrechas, la activación de las células inmunes y el aumento de la producción de moco (250–252). Este mecanismo fisiopatológico de retención de partículas permite dirigir pasivamente el fármaco si se incluye encapsulado en NP y MP lo cual produce una absorción más lenta y eficiente en la mucosa inflamada (252) y transporta la carga del fármaco directamente a las células inmunes y mucosas afectadas (253,254). También se han ensayado con éxito estrategias de direccionamiento activo, por ejemplo, mediante la inserción en la superficie de la NP de anticuerpos CD98 de cadena única (253) y NP-PLGA insertadas con manosa (254). Sin embargo, tales formulaciones son mucho más complicadas de desarrollar y trasladar a la práctica clínica que la focalización pasiva mencionada anteriormente.

Las NP y MP poliméricas se clasifican en función de su tamaño. El diámetro de las MP oscila entre 1 y 250 μm , mientras que el tamaño de las NP oscila entre 10 y 1000 nm (245). Se ha demostrado en varios estudios que hay una relación entre el tamaño de la partícula y su acumulación en el tejido inflamado (247,255). Los datos sobre el

tamaño óptimo de dicho sistema de administración de medicamentos aún no son del todo concluyentes, pero sin duda el tamaño es un aspecto importante que considerar. Así, se observa una mayor acumulación de partículas en el tejido con la reducción del tamaño de partícula, siendo en un principio, las NP más adecuadas que las MP, aunque ambos sistemas presentan características similares. Las NP han demostrado su eficacia en modelos de roedores (246,247), mientras que estudios con partículas en pacientes humanos sugirieron que MP era más favorable en comparación con NP del mismo material (248). No se puede descartar que, debido a su menor tamaño, las NP puedan atravesar el tejido ulcerado con mayor facilidad, dando lugar a los efectos sistémicos que se pretende evitar.

Las MP y NP poliméricas utilizadas en este estudio difieren en tamaño y en tecnología de fabricación, lo que también influye en la liberación de la CyA encapsulada y muestran una propiedad que puede jugar un papel importante en el tratamiento de estas enfermedades, la mucoadhesión (256,257). La presencia de la capa mucosa en el intestino proporciona la oportunidad de prolongar el tiempo de contacto del fármaco y localizarlo (258,259) en la zona a tratar gracias a esta propiedad.

Se ha observado también, que los sistemas nanoestructurados poliméricos tienden a acumularse de forma pasiva en el tejido intestinal inflamado formando depósitos desde los que el fármaco se libera durante un tiempo más prolongado, incrementando aún más la concentración de fármaco disponible en la zona a tratar (260).

2.1 Nanopartículas y micropartículas formuladas con CyA y PLGA

Las formulaciones utilizadas en este estudio consisten en un sistema transportador nanoestructurado y otro microestructurado, matricial de PLGA que contiene CyA, cuyo fin es conseguir una administración local de CyA en el foco inflamatorio del lumen intestinal.

El PLGA, ácido poli(láctico-co-glicólico), es un copolímero formado por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (Figura 43). Se trata de un excipiente muy utilizado en numerosos sistemas micro y nanoestructurados por ser un polímero seguro, biocompatible, biodegradable y mucoadhesivo. Tras un proceso de hidrólisis de los enlaces tipo éster que unen los monómeros, sus productos de degradación, el ácido láctico y el ácido glicólico, son perfectamente metabolizados por el organismo, mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs, dando como resultado CO_2 y H_2O . Por esa razón, el PLGA tiene la aprobación de la EMA y la FDA para su utilización en seres humanos (35,42,259,261).

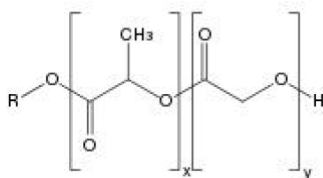


Figura 43. Estructura química del PLGA ácido poli(láctico-co-glicólico) (261)

Los nano/micro sistemas matriciales de PLGA pueden degradarse durante días, semanas o meses, tiempo durante el cual se estará liberando las sustancia activa de su interior. El mecanismo de degradación/liberación se podría simplificar en tres etapas (262):

1. Administración y adhesión de los sistemas.
2. Contacto del sistema con el líquido circulante.
3. Degradación y consecuente liberación controlada del fármaco.

Respecto a la liberación, los sistemas compuestos por PLGA suelen mostrar un patrón característico de liberación trifásica de fármacos que consiste en un efecto de estallido relativamente alto al inicio, una fase de retardo y una fase de liberación final, dictada por la erosión del polímero (263).

Los sistemas nano- y micro-transportadores de fármacos constituidos por PLGA se pueden fabricar mediante diferentes métodos (261). En este caso, las NP se sintetizaron mediante el método de nanoprecipitación y las MP por el método nano spray-drying.

El método de nanoprecipitación, o método de desplazamiento del disolvente, mediante el que se formularon las NP, consigue partículas de tamaño inferior a 100 nm. Este método consiste en la disolución tanto del polímero como del fármaco en un disolvente orgánico miscible en agua (generalmente acetona). Con la ayuda de un autoinyector, esta disolución se va añadiendo de forma controlada

sobre una fase acuosa en la cual el polímero no es soluble. La difusión de la disolución del polímero en la fase acuosa provoca su precipitación, encapsulando al fármaco y formándose así las NP. El disolvente se evapora a temperatura y presión controladas para facilitar la precipitación. Las NP se purifican, se lavan y se liofilizan (35,264).

El método de nano spray-drying, mediante el que se formularon las MP, es un método de encapsulación de fármacos utilizado con el fin de mejorar la formulación y la administración de fármacos. Este método consiste en generar gotículas a pequeña escala de una mezcla que contiene tanto el fármaco como el polímero. Estas gotículas se ponen en contacto con una corriente de aire a elevada temperatura de forma que el disolvente se evapora y provoca la precipitación de las MP. Este proceso de secado rápido permite obtener partículas ultra finas a microescala con un elevado rendimiento (265).

3. Absorción intestinal

La administración oral de medicamentos representa la forma más común y conveniente para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades, ya que es la vía fisiológica de absorción. Es, por tanto, útil y necesario estimar la absorción de los fármacos a nivel intestinal para poder predecir el perfil farmacocinético del fármaco tras su administración oral. Estos estudios son necesarios para decidir o

proponer mejoras en la formulación farmacéutica o en el régimen de dosificación (266).

La absorción de los fármacos administrados por vía oral es un proceso complejo, que se ve afectado por diversas variables: la fisiología del tracto gastrointestinal, el tiempo de tránsito, la interacción con alimentos u otros fármacos, características propias del paciente, estados patológicos, propiedades del fármaco, incluyendo la disolución del fármaco desde la forma de dosificación, la interacción del fármaco con el entorno, la permeabilidad a través de la membrana o los efectos de primer paso que sufre en intestino e hígado (32). Todos estos factores deben tenerse en cuenta al estimar la absorción intestinal, lo cual dificulta considerablemente su estudio.

La absorción de fármacos se puede estimar mediante estudios *in vivo* y estudios *in situ*. La información que se puede obtener a partir de ellos se resume generalmente en una constante de absorción (**K_a**) característica del proceso y que proporciona información acerca de la velocidad de absorción del fármaco (266).

4. Influencia del mucus intestinal

La mucosa cubre numerosas superficies epiteliales del cuerpo humano. Sus funciones son diversas, destacando su función protectora de los tejidos subyacentes de diversas agresiones ambientales, de agentes químicos y patógenos y de efectos enzimáticos. También

juega un papel en los mecanismos de señalización celular y en las interacciones célula-célula (267,268).

En el caso del moco gastrointestinal, este actúa también como lubricante para facilitar el paso de la comida a través del tubo digestivo (33,34,269). En el desempeño de sus funciones el moco puede afectar negativamente a la absorción o a la acción de fármacos administrados por vía oral, pulmonar, vaginal, nasal o por otras rutas, aunque particularmente en este estudio, la presencia del mucus puede ofrecer beneficios para el tratamiento (33,34).

La composición del moco puede variar mucho en función del lugar de secreción, de su papel fisiológico y de los estados patológicos.

Los componentes principales, independientemente de su origen son glicoproteínas, lípidos, agua, células epiteliales descamadas, electrolitos y bacterias (33,258). La proporción de estos elementos que la componen es aproximadamente de: 95% agua, 0,5-5% glicoproteínas y lípidos, 0,5-1% sales minerales y 1% de proteínas libres (258).

Mucina: la glicoproteína del moco

La mucina es una macromolécula compuesta por un esqueleto peptídico, que representa aproximadamente el 10-30% de su peso. Este esqueleto se une mediante enlaces o-glicosídicos a cadenas de oligosacáridos que constituyen entre un 70-80% del peso total restante de la glicoproteína (Figura 44) (258).

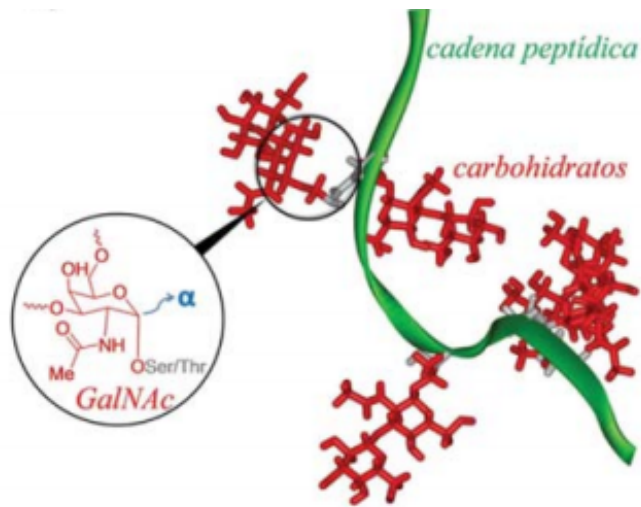


Figura 44. Estructura de las mucinas (270)

Aunque las moléculas de glicoproteína constituyen un porcentaje pequeño del moco, son consideradas las responsables de su viscosidad. Todas las mucosas segregan moco, y, por lo tanto, mucina, pero donde tiene una mayor importancia es en el tubo gastrointestinal, como elemento protector de su mucosa. Además de la viscosidad de la capa, la mucina forma una estructura con un entramado que puede retener y albergar sustancias, a pesar de no ser mucoadhesivas, como es el caso del PLGA (33,258).



Figura 45. Mucina de membrana (teñida en verde) en las células epiteliales intestinales (271).

Se pueden encontrar dos tipos de mucina: mucina unida a membrana o mucina secretora (33,258). Ambas tienen una estructura similar y trabajan juntas formando la capa mucosa protectora. El moco de las células caliciformes y los enterocitos proporcionan la primera línea de defensa del tracto gastrointestinal e interactúan con el sistema inmunitario (272).

Como se ha comentado, las propiedades mucoadhesivas de las partículas juegan un papel crucial en la interacción entre el fármaco y la mucosa intestinal. Estas propiedades proporcionan una oportunidad única para la administración de fármacos de forma prolongada a través del desarrollo de formas farmacéuticas mucoadhesivas (258).

Además, en el caso del tratamiento de la EII, esta propiedad supone una ventaja extra ya que, el lugar donde la formulación bajo estudio queda retenida es la zona a tratar, ejerciendo su acción de forma localizada y sostenida en el tiempo.

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

II.- OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo de la tesis doctoral que se presenta es estudiar el perfil de absorción intestinal de CyA formulada tanto en MP como en NP, utilizando métodos *in vitro* e *in situ*.

Para el cumplimiento de este objetivo general se han planteado los siguientes subobjetivos:

1. Estudios de absorción *in vitro*.

El objetivo es estudiar la absorción de las formulaciones de NP y MP de PLGA-CyA mediante un modelo *in vitro* con células representativas de la mucosa intestinal, como son las Caco-2.

2. Desarrollo de un método de extracción de fármaco del moco intestinal.

Conocidas las potenciales interacciones de las NP y MP de PLGA con el moco intestinal surge la necesidad de desarrollar un método de extracción de fármaco de este. De este modo, se puede recuperar todo el fármaco del lumen intestinal de las ratas Wistar estudiadas, asumiéndose que el fármaco no detectado se ha absorbido hacia circulación sistémica. Para ello, se utilizó mucus artificial con el que se incubaron las

partículas para realizar un balance de masas.

3. Estudio *in situ* de la cinética de absorción intestinal.

Para estudiar *in situ* la absorción intestinal de CyA liberada por las NP y MP en el intestino de rata Wistar, se recurre a la técnica de perfusión desarrollada por Doluisio (1969) (273) y se evalúa si la nueva formulación modifica los perfiles de absorción, minimizando el acceso de fármaco a circulación sistémica, a través de sus propiedades de liberación modificada. A título comparativo, se estudia la cinética de absorción intestinal de dos formulaciones comerciales de CyA.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 CyA Y FORMULACIONES DE CyA

Se adquirió CyA (pureza >99%) del laboratorio Sigma Aldrich. Es un polvo sólido, blanco, utilizado para preparar los estándares para la validación del método analítico por HPLC.

La CyA es un polipéptido de 11 aminoácidos, con fórmula molecular $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ y cuya estructura química está representada en la Figura 46. Las propiedades físicas y químicas del compuesto se detallan en la Tabla 14.

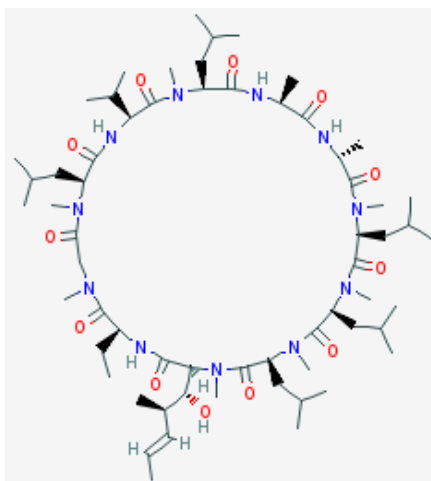


Figura 46. Estructura de la ciclosporina A (274).

Tabla 14. Propiedades físicas y químicas de la ciclosporina (274).

Estado físico	Sólido
Color	Blanco
Masa molecular	1202,61 (g/mol)
Punto de fusión	148-151 °C
Solubilidad en agua (20°C)	Ligeramente soluble
Solubilidad en etanol	Soluble

El resto de las formulaciones utilizadas fueron las siguientes:

- **SandimmunNeoral® 50 mg cápsulas blandas (Novartis).** Cada cápsula blanda de gelatina contiene 50 mg de CyA, 50 mg de etanol anhidro y 50 mg de propilenglicol (275). El contenido de la cápsula blanda se extrajo mediante la perforación de la cápsula con una aguja y una jeringuilla desechable
- **Sandimmun® 250 mg/5 ml concentrado para solución para perfusión (Novartis).** Son ampollas de 5 ml, que contienen un total de 250 mg de CyA, además de 278 mg de etanol/ml y 650 mg de ricinoleato de macroglicerol/aceite de ricino polioxilo 35 mg/ml. La suspensión de CyA forma un concentrado oleaginoso transparente, de color amarillo-amarronado (276).



Figura 47. A) SandimmunNeoral®. B) Sandimmun® inyectable (275,276)

1.2 NANOPARTÍCULAS Y MICROPARTÍCULAS

Las NP-PLGA y MP-PLGA han sido preparadas y caracterizadas por la Dra. Christina Draheim, integrante del proyecto, en el Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland (Saarland, Alemania).

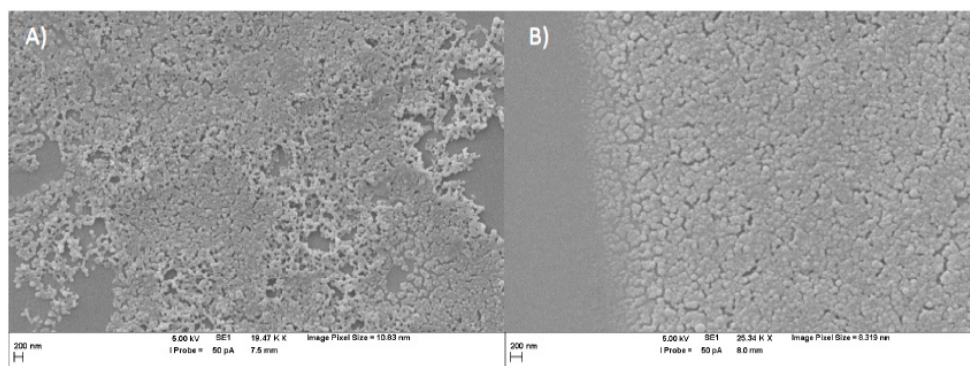


Figura 48. Imágenes obtenidas por SEM. A) NP-PLGA. B) NP-PLGA-CyA.

1.2.1 Preparación de las nanopartícula por nanoprecipitación

Las NP se prepararon mediante el método de nanoprecipitación (40). Para ello, se pesaron con precisión el PLGA (1,3%, p/v) y la CyA (0,52%, p/v) y se disolvieron en una mezcla de acetona/etanol (16/3 v/v). La solución se inyectó con una jeringa de vidrio Hamilton® (1005 TTL 5 ml, servicio de cromatografía, GmbH, Alemania) a 500 rpm y un flujo de 4,55 ml/min en agua doblemente destilada que contenía 1% de poloxamer 407 (p/v) como estabilizador, formando la fase acuosa. La relación fase orgánica/fase acuosa se mantuvo a 1/2. La precisión de la velocidad de inyección estaba garantizada por medio de una bomba HARVARD® Ultra PHD de alta precisión (Hugo Sachs Elektronik, Alemania), con un motor de ángulo de paso pequeño controlado por microprocesador, que acciona el bloque que realiza la presión sobre el émbolo. La jeringa de vidrio Hamilton® se instaló en dirección vertical. Después de la preparación, el disolvente orgánico se evaporó mediante agitación durante una noche a 400 rpm.

El contenido de CyA libre se separó de las NP por diálisis (membrana de diálisis Spectra/Por®, MWCO 300 kDa, Carl Roth GmbH & Co. KG, Alemania) en 1 litro de agua purificada. Posteriormente, las NP se desecaron por liofilización usando D-(+)-trehalosa en una proporción de 1/1 (p/p), en referencia a la cantidad inicial de PLGA y 0.3% de alcohol polivinílico (PVA) para permitir una fácil dispersión.

1.2.2 Preparación de las micropartículas por el método nano spray-drying

Las MP se prepararon mediante el método de nano spray-drying, siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 49 (40). Para ello, se utilizó un equipo Büchi Nano Spray B-90 (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Alemania) con una cámara de secado total de 150 cm de altura (configuración larga), según lo dispuesto por el fabricante. Para permitir un uso seguro del disolvente orgánico, el aparato de secado por pulverización se hizo funcionar en el modo cerrado con gas inerte (N₂ y CO₂ a 0,8 bar). Por lo tanto, el nano spray-dryer se conectó a un Inert-Loop B-295, una unidad de enfriamiento, que separa el solvente orgánico del gas de secado. Como parámetros del proceso, se monitorizaron la temperatura de salida y el flujo de gas de secado, que se fijó a 115 l/min. Las partículas se formaron por secado de las gotículas pulverizadas y se recogieron en el colector que retiene las partículas electrostáticamente, gracias a un alto voltaje producido entre un electrodo conectado a tierra y un electrodo colector. Para la preparación de la solución de alimentación, se suspendieron en acetona 1,1% de PLGA (p/v) junto con 1,6% de Span 60 (p/v), utilizado como estabilizador y 0,44% de CyA (p/v). Posteriormente, la solución de alimentación se roció usando una malla de 4 µm y se enfrió con hielo de la dispersión suministrada, para evitar el calentamiento de la solución circulante. Las partículas se recogieron con un rascador de plástico.

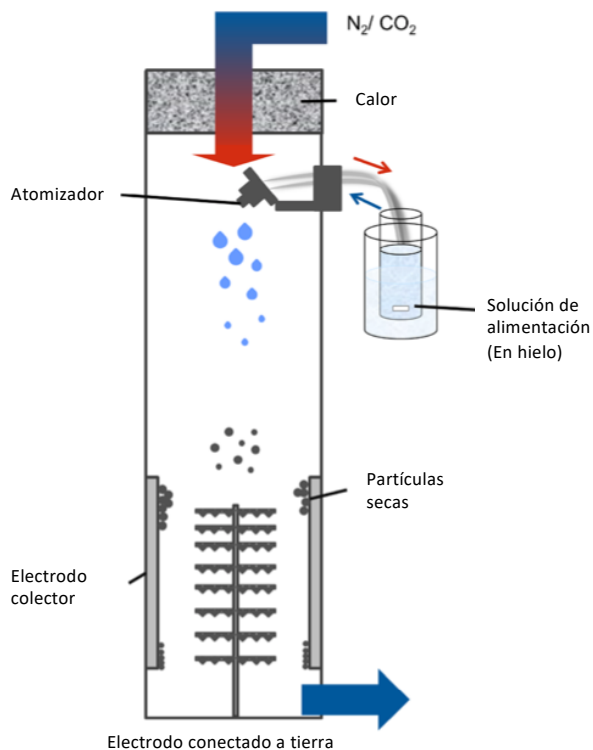


Figura 49. Esquema del Nano Spray Dryer. Adaptación (40).

1.2.3 Determinación del tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta

El diámetro hidrodinámico (d) y el PDI de las NP se midieron por dispersión dinámica de la luz (Zetasizer® Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) en agua doblemente destilada a 25°C y un ángulo fijo de 173°. Las medidas se realizaron para cada lote por triplicado y se calculó el valor medio y la DS.

Las MP se caracterizaron por difracción láser usando un Mastersizer® 2000 equipado con un módulo de dispersión

Mastersizer® 2000 μ P (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania). Las partículas se redispersaron en agua doblemente destilada. Todos los lotes se midieron por triplicado y se calculó el valor medio y la DS. El software Mastersizer® proporciona el diámetro medio de masa ($d_{0,5}$) así como los valores de percentil $d_{0,1}$ y $d_{0,9}$. Ambos parámetros describen el valor para el que el 10% o 90% de las partículas son más pequeñas que el diámetro medido, respectivamente. La distribución de tamaño (width, o ancho, en español) se define en la Ecuación 11. Una distribución de tamaño estrecha se indica mediante un ancho pequeño.

$$\text{Ancho (width)} = (d_{0.9} - d_{0.1}) / (d_{0.5})$$

Ecuación 12

1.2.4 Determinación de la eficacia de encapsulación y la carga

La EE describe el porcentaje de fármaco encapsulado en relación con la cantidad inicial. La EE se calcula a partir de la Ecuación 2, donde $m_{(CyA_{inicial})}$ corresponde a la cantidad inicial pesada y $m_{(CyA_{encapsulada})}$ a la cantidad de CyA encapsulada en la formulación final.

$$EE [\%] = m_{(CyA_{encapsulada})} / m_{(CyA_{inicial})} * 100$$

Ecuación 13

La EE se determinó por un método directo. Una cantidad conocida de NP o MP cargado con CyA se disolvió en acetato de etilo y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente para dispersar el PLGA, desintegrando la partícula. Después, se dejó evaporar el acetato de etilo y el residuo se disolvió en una mezcla de tampón acetonitrilo/fosfato pH 3 (1/1, v/v), que se agitó durante 2 horas para extraer la CyA. La solución se filtró a través de un filtro acoplado a una jeringa desechable, con un tamaño de poro de 0,45 μm (CHROMAFIL G/PET 45/25). El filtrado se recogió y se analizó por HPLC.

La carga real se define como el peso (m) de CyA en μg que se refiere a 1 mg de formulación final.

1.2.5 Perfil de liberación in vitro de las partículas cargadas con CyA

El perfil de liberación de las NP y MP cargadas con CyA se obtuvo en fluido gástrico simulado (SGF) pH 3.0 que contenía Tween[®] 80 al 0,05%, para aumentar la solubilidad de CyA y alcanzar condiciones sumidero. Las condiciones sumidero se definieron como toda concentración inferior al 30% de la concentración de saturación en el medio. Este valor se midió experimentalmente como 41,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En resumen, para llevar a cabo el estudio de cesión, las NP o MP cargadas con CyA se suspendieron en 30 ml del medio. El experimento de liberación se realizó en un recipiente de reserva cerrado con parafilm para evitar la evaporación. La suspensión se agitó a 400 rpm y

se trabajó a temperatura ambiente. A tiempos definidos, se fue retirando 1,5 ml de la suspensión y posteriormente se centrifugó en un eppendorf a 15000x g 20°C durante 15 minutos. Se cuantificó 1 ml del sobrenadante por HPLC. Se añadió 1 ml de SFG al resto del sobrenadante para volver a dispersar el sedimento antes de devolverlo al medio de liberación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La liberación se calculó de forma acumulativa y se normalizó a la EE determinada de las partículas de PLGA.

1.3 Otros materiales

Disolventes (calidad HPLC)	Distribuidor
Acetonitrilo	J.T.Baker
Ácido ortofosfórico (97% riqueza)	Scharlau
Etanol 96%	VWR Prolobo
Metanol	J.T.Baker
Agua HPLC (Mi1iQ)	

Sales	Distribuidor
Cloruro Sódico (NaCl)	Scharlau
Hidrógeno fosfato disódico (Na₂HPO₄)	Scharlau
Dihidrógeno fosfato monosódico (NaH₂PO₄)	Scharlau
Dihidrógeno fosfato monopotásico (KH₂PO₄)	Scharlau
Cloruro potásico (KCl)	Prolabo

Mucina	Distribuidor
Mucine porcine stomach type III	Sigma Aldrich

Anestésicos	Distribuidor
Ketolar® 50mg/ml (Ketamina Clorhidrato)	Pfizer
Domtor® 1mg/ml (Medetomidina Clorhidrato)	Esteve

2. MÉTODOS

En el presente estudio, una vez recibidas las partículas del Instituto Helmholtz, se llevaron a cabo los estudios de absorción *in vitro* mediante un modelo de células Caco-2, intentando evitar el uso de animales en cumplimiento de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) en experimentación animal. El principal inconveniente que surge de este modelo es que las líneas celulares Caco-2 no presentan la capacidad de producir mucus. Para simular la presencia de esta capa, se aplicó mucus intestinal porcino sobre la mitad de las placas de Caco-2.

Debido a que el mucus juega un papel determinante en la absorción de la formulación de NP, se propuso posteriormente el estudio de absorción mediante una técnica *in situ* en rata Wistar. Esta técnica sí que se tiene en cuenta la influencia del mucus intestinal de forma fisiológica, además de otros procesos importantes como la motilidad y la reabsorción de agua. Para este trabajo los modelos utilizados han debido ser adaptados, respecto al modelo habitual, para poder tener en cuenta la cantidad de fármaco depositado en el mucus formulado en las NP y MP.

2.1 Estudios de permeabilidad *in vitro* con células CaCo-2

El objetivo de estudiar la permeabilidad *in vitro* de las formulaciones de NP y MP de PLGA-CyA es obtener perfiles de absorción a través de un epitelio intestinal humano sin necesidad de utilizar animales. Para ello se escogió un modelo *in vitro* de líneas celulares de carcinoma humano de colon, células CaCo-2, que forman monocapas confluentes, dando lugar a una barrera de absorción, que permite evaluar el paso de fármacos a través del epitelio intestinal y que está ampliamente aceptada en la literatura científica.

Este método evita la utilización de animales de experimentación y, por tanto, los inconvenientes éticos. Permite determinar la permeabilidad directamente sobre células humanas, con una reducción de tiempo y coste (277). Por ello, la técnica está ampliamente aceptada en la comunidad científica. Sin embargo, presenta deficiencias como la ausencia de la capa mucosa y la motilidad intestinal, que pueden influir especialmente en el comportamiento de las partículas y el proceso de absorción a partir de las mismas.

El estudio fue diseñado de forma que se evaluaba la permeabilidad de las diferentes formulaciones: solución de CyA (**Sandimmun® 250 mg/5 ml concentrado para solución para perfusión**), emulsión de CyA (**SandimmunNeoral®50 mg cápsulas blandas**), dispersión de NP y dispersión de MP.

Las células forman un epitelio monocapa sobre una membrana Transwell®, que separa dos compartimientos: dador y receptor. Las diferentes muestras se colocan en el compartimiento dador y, a tiempos prefijados, se toman muestras del compartimiento receptor para evaluar la cantidad de fármaco que atraviesa el epitelio en el tiempo de ensayo. A partir de estos resultados se puede calcular la cinética de absorción de fármaco a través del epitelio intestinal.

Se utilizaron clones ATCC de la línea celular CaCo-2. Las células se descongelaron y se sembraron en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's Media* en botellas de 50 ml, según el protocolo descrito por Hu et al. 1994 (278). Las monocapas celulares se consiguieron mediante la siembra de 400.000 células por inserto (MILLICEL1-PCF, de 4.2 cm² de área de difusión y 3 µm de diámetro de poro). El cultivo se mantuvo a 37°C bajo condiciones de 90% de humedad y 5% de CO₂. La confluencia de las monocapas se alcanzó a los 19 días, con reposición del medio de cultivo en días alternos. Antes del experimento se comprobó la integridad de las monocapas mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) (279) que oscilaba entre 500-750 Ω cm², como parámetro control, con el fin de comprobar la integridad de la monocapa. Para preparar la solución a colocar en cada compartimiento dador del inserto, se utilizó como vehículo una solución *Hank's balanced salt solution* (HBSS 9.8 g/l), suplementada con NaHCO₃ (0.37 g/l), HEPES (5.65 g/l) y glucosa (3.5 g/l), ajustada a pH 7.4. Las soluciones problema se prepararon como sigue:

- A) Se extrajo un volumen concreto de la emulsión contenida en Sandimmun® cápsulas blandas 50 mg y se ajustó a 5 µg/ml con el vehículo.
- B) Se tomó un volumen de la solución Sandimmun® concentrado para perfusión i.v. 50 mg/ml y se diluyó hasta 5 µg/ml con el vehículo.
- C) Se diluyó la cantidad de NP necesaria para constituir una suspensión de 5 µg/ml en el vehículo.
- D) Se diluyó la cantidad de MP necesaria para constituir una suspensión de 5 µg/ml en el vehículo.
- E) Como blanco se utilizó una solución con la misma cantidad de muestra de partículas, pero sin cargar con CyA.

En el compartimento receptor se colocó una solución tamponada HEPES pH 7.4. El sistema se mantuvo en agitación en un agitador orbital (Heideolph Unimax 1010®) atemperado a 37°C con una velocidad de agitación de 0.0167 rev/s. Se tomaron cuatro muestras de 200 µl de cada pocillo (6 por placa) y tiempo seleccionado. El volumen se reemplazó con el mismo volumen de solución tamponada.

A partir del contenido en CyA de las mismas se calculó el coeficiente de permeabilidad (P_{app} , cm/s). Este parámetro caracteriza la velocidad de absorción de fármaco a través de la membrana celular y permite comparar las distintas formulaciones entre sí. Se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{dQ / dt}{AC}$$

Ecuación 14

Donde A es la superficie de absorción o área del Transwell®, C la concentración inicial de fármaco, y dQ/dt la pendiente de la recta formada al representar las cantidades acumuladas de fármaco en el receptor frente al tiempo.

2.2 Desarrollo de un método de extracción de fármaco del moco intestinal

A. Preparación de mucus artificial

Para desarrollar un método de extracción de fármaco del mucus intestinal en primer lugar fue necesario fabricar un producto artificial lo más similar posible al moco intestinal para realizar pruebas experimentales con diferentes métodos de extracción.

El mucus artificial se elaboró tomando como referencia trabajos previamente publicados (260,280), sobre los que se realizaron una serie de modificaciones para ajustarlo a las necesidades de este trabajo.

Se preparó un tampón fosfato salino (PBS) que contiene: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄. Estas cantidades se disolvieron en 1 litro de agua calidad HPLC y el pH se

ajustó a 7,4 mediante la adición de HCl. En esta solución, se disolvió mucina comercial al 5%.

B. Simulación de la mucoadhesión tras la administración oral

Una vez preparado el mucus artificial, se incubaron varias alícuotas (n=3) con dos soluciones diferentes: una solución de NP problema (4 mg de NP en 2 ml de agua calidad HPLC) y otra solución de CyA como control (0,5 mg de CyA (Sigma Aldrich) en polvo sólido en 1 ml de etanol).

Ambas soluciones se incubaron con el mucus en una proporción 1:1 (v/v) de mucus y solución y se mantuvo durante una hora bajo agitación continua a 37°C para asegurar una distribución homogénea, a semejanza de lo que ocurre *in situ* en el intestino de las ratas durante el experimento del estudio de absorción.

Se ensayaron cuatro métodos de extracción diferentes, que se describen a continuación, si bien solo el Método 4 proporcionó resultados reproducibles y, por tanto, fue seleccionado.

C. Métodos de extracción ensayados

La eficacia de los métodos de extracción se comprobó mediante un balance de masas sobre la CyA previamente incorporada, comprobando, si la recuperación del fármaco de partida tras la aplicación del método es de 100 ± 10 %.

Método (1). Etanol- Sonicación

Este método consiste en la adición de 200 μL de etanol a cada una de las muestras, que se mantienen posteriormente durante 15 minutos en el baño de ultrasonidos. Finalmente se centrifugan las muestras a 5000 rpm durante 8 minutos.

Método (2). Etanol-Agitación

Cada una de las réplicas se trata con 200 μL de etanol y se mantiene bajo agitación orbital suave durante 24 horas. Finalmente se centrifugan a 500 rpm durante 8 min.

Método (3). Etanol- Agitación vórtex

A cada replicado se añade 200 μL de etanol y se mantienen bajo agitación en vórtex durante 3 minutos.

En los tres primeros métodos se probó el uso de etanol debido a su capacidad de precipitación de proteínas. El disolvente provoca la precipitación de las glicoproteínas del moco con el fin de disolverlo y liberar así las NP adheridas (281–283).

Método (4). Acetonitrilo-Ácido ortofosfórico

Cada replicado se trata con 200 μL de una solución de acetonitrilo y ácido ortofosfórico pH3 (50:50) v/v. Se mantiene bajo agitación vórtex durante 3 minutos y se deja 15 minutos bajo acción de ultrasonidos. Finalmente, las muestras se centrifugan a 5000 rpm durante 8 min.

Se eligió el acetonitrilo por su capacidad de disolver el PLGA (284), desestructurando las partículas y liberando así la CyA. Además, se decidió usar el ácido ortofosfórico a pH 3 para proporcionar un pH ácido y así evitar la precipitación de la CyA, que en este medio se mantiene ionizada.

Por último, se recogió el sobrenadante de cada una de las muestras obtenidas a partir de cada uno de los métodos y se analizaron mediante HPLC.

2.3 Estudio de absorción intestinal *in situ* en rata Wistar

Se estudió la cinética de absorción intestinal de las diferentes formulaciones en intestino de rata Wistar mediante la técnica de perfusión *in situ* propuesta por Doluisio (273). Esta técnica simula eficazmente las condiciones fisiológicas, ya que permite incluir factores como la presencia de moco, motilidad intestinal y el fenómeno de reabsorción de agua.

El estudio cuenta con la autorización del Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad de Valencia, con el número A1360059439693. Los animales se obtuvieron del estabulario situado en la Facultad de Farmacia, dependiente del SCSIE de la Universidad de Valencia. Los animales fueron tratados en todo momento por personal cualificado en el manejo de animales de experimentación.

2.3.1 Soluciones de trabajo

Solución de lavado

Esta solución isotónica se utiliza para arrastrar los residuos que puedan quedar en el intestino después del periodo de ayuno y acondicionar así la mucosa intestinal antes de los ensayos de absorción. El pH de la solución debe de ser de 7,4 y, en el caso de ser necesario, este pH es ajustado con NaOH 1 N o con HCl 1 N.

La composición cuantitativa de la solución es:

NaCl.....	9.00 g
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O 1/15 M.....	3.9 ml
Na ₂ HPO ₄ 1/15 M.....	6.1 ml
H ₂ O bidestilada.....	c.s.p.1 L

Solución anestésica

La anestesia se consiguió por inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y medetomidina, anestésicos de uso veterinario. La dosis que se administró a cada animal se calculó según su peso en base a la Tabla 15 que se expone a continuación.

Tabla 15. Dosis y volúmenes de anestesia según peso del animal

Anestésico	Ketamina	Medetomidina
Dosis en rata	75 mg/kg	0,5 mg/kg
Concentración del anestésico	50 mg/ml	1 mg/ml
Peso de la rata (kg)	Volumen (ml)	Volumen (ml)
0,25	0,36	0,12
0,30	0,45	0,15

Preparados para perfusión

Las preparaciones para perfundir se prepararon extemporáneamente con un volumen final de 10 ml. Para ello se añadió la cantidad necesaria para administrar una dosis total de CyA de 322 µg/rata y se ajustó el volumen con agua calidad HPLC. En concreto, se utilizó:

Tabla 16. Preparaciones utilizadas en el estudio de absorción intestinal *in situ* en rata Wistar

Preparación 1	Solución IV	Formulación comercial intravenosa hospitalaria de CyA (Sandimmun® 250mg/5ml, ampollas)	
Preparación 2	Emulsión	Formulación comercial oral de CyA (SandimmunNeoral® 50mg)	Para su preparación se extrajo la microemulsión del interior de la cápsula
Preparación 3	NP	Nanopartículas de PLGA con CyA	Para la preparación se resuspendieron 29 mg de NP para cada rata, en el disolvente y volumen seleccionados.
Preparación 4	MP	Micropartículas de PLGA con CyA	Para la preparación se resuspendieron 17,4 mg de MP para cada rata, en el disolvente y volumen seleccionados.

2.3.2 *Técnica experimental*

Se seleccionaron ratas Wistar hembras, con un peso comprendido entre 250-300 g. Los animales se sometieron a un periodo de ayuno de 8 horas, durante el cual se permite el libre acceso al agua para garantizar su hidratación. La jaula debe ser de doble fondo para evitar la coprofagia.

La técnica experimental consiste en la perfusión *in situ* de la formulación problema en el intestino del animal (273,285). En este caso, se ha probado una suspensión de las NP cargadas con CyA y una suspensión de las MP cargadas con CyA. A título comparativo, también se han probado dos formulaciones comerciales: una suspensión intravenosa de CyA hospitalaria y una microemulsión extraída de las cápsulas blandas en las que es comercializada. La extracción se realizó perforando la cápsula con una aguja y extrayendo el contenido oleoso mediante una jeringuilla desechable.

Se llevó a cabo una distribución aleatoria de los animales en los cuatro grupos de estudio, como muestra la Figura 50.

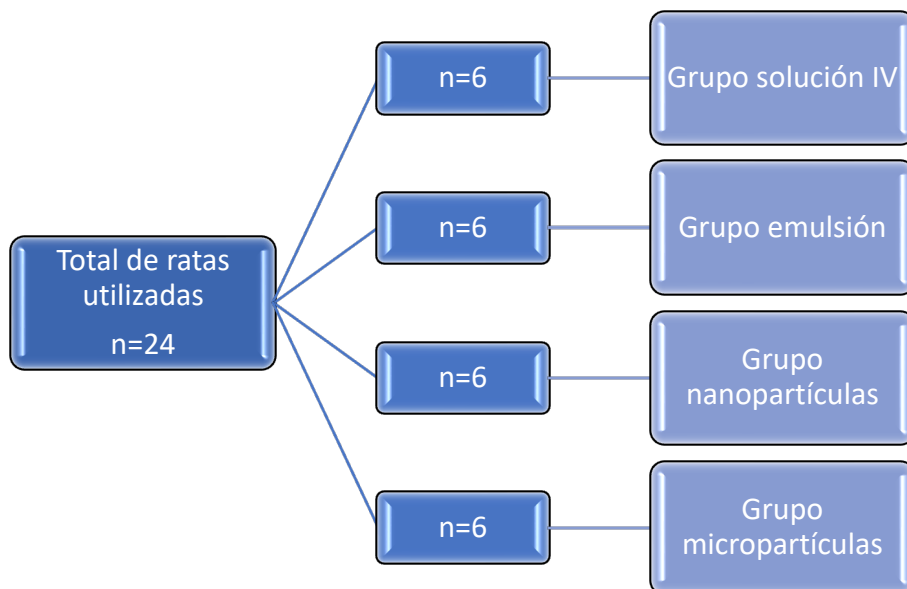


Figura 50. Distribución de los animales en cada grupo de estudio

Al comienzo del estudio se procedió a la anestesia del animal por inyección intraperitoneal con la dosis correspondiente a su peso. El animal se coloca bajo una lámpara que proporciona calor, ya que la anestesia provoca relajación muscular generalizada que puede conducir a un estado de hipotermia. Aproximadamente, después de 10 minutos de administrar el anestésico, el animal alcanza el grado de anestesia profunda y carece del reflejo palpebral. Se coloca en posición decúbito supino sobre un tablero quirúrgico y se inmoviliza por las extremidades con cinta adhesiva, de forma que no adquiera una posición forzada. El grado de anestesia se comprueba cada 10 minutos a lo largo de toda la cirugía y el periodo de toma de las muestras.

Una vez anestesiado el animal, primero se descubre la cavidad abdominal mediante sección de la piel, desde 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides. Se localiza el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar. Este conducto debe ligarse con ayuda de un hilo de seda, para evitar el paso de la secreción biliar al intestino y la aparición de un posible ciclo enterohepático. Se practica un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal. Se introduce el extremo de una cánula de vidrio acodada, la cual se fija al intestino con hilo de seda. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo Stopcock. A su vez, esta encaja a rosca con una jeringa de 10 ml de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte vertical. Se localiza el otro extremo (íleocecal) y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa con la solución de lavado. Una vez finalizado el lavado, se conecta otra cánula en el extremo final. Esta cánula se une a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujeta a un soporte vertical, con la ayuda de pinzas. Por último, se bombea aire a través del intestino en ambas direcciones con objeto de eliminar los restos de la solución de lavado, aunque siempre queda un volumen residual de aproximadamente 0.7 ml. El procedimiento se esquematiza en la Figura 51. La toma de muestras se realiza alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recoge un total de seis muestras de 200 µl a tiempos prefijados (10, 15, 20, 25, 30, 40 minutos).

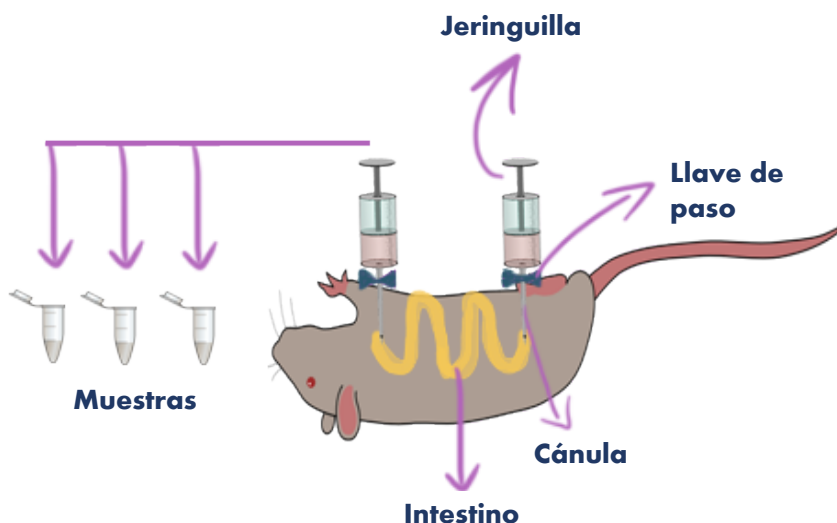


Figura 51. Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio. (Elaboración propia).

Para mantener una correcta hidratación de la cavidad abdominal durante el estudio se vierte, cada cierto tiempo, pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada con el mismo suero.

Una vez finalizado el estudio, los animales son sacrificados por sangrado, mediante punción intracardiaca bajo anestesia. Parte de la sangre extraída se centrifuga y se trata para análisis por HPLC. Este dato de concentraciones sanguíneas confirmará o descartará la absorción sistémica de fármaco en cantidades identificables durante el ensayo.

Una vez sacrificado el animal, se desconecta el intestino de la cánula de la jeringa ileocecal, se corta el mesenterio y se separa el asa intestinal. La cánula se coloca en un tubo falcon y se extrae el volumen remanente por presión sobre el intestino; finalmente se mide el volumen, pues permitirá estimar la velocidad del proceso de reabsorción de agua que ocurre en el intestino y puede falsear el cálculo de las cantidades de absorción.

Como se ha explicado anteriormente, las NP y MP pueden ser mucoadhesivas o al menos, quedar retenidas en el moco intestinal, lo que dificulta el estudio cinético de la absorción. Para ello, se ha diseñado el método de extracción anteriormente citado que nos permite liberar el fármaco de las NP y MP adheridas a la mucosa, para poderlo cuantificar.

A continuación, en el caso de experimentación con MP y NP que pueden sufrir bioadhesión, el intestino se segmenta en cinco tramos, para facilitar la extracción de CyA que haya podido quedar atrapada por el mucus. Para ello, cada uno de estos tramos se limpia rigurosamente con pequeños volúmenes de la mezcla de Acetonitrilo-ác. ortofosfórico pH 3 (50:50, v/v) hasta completar 25 ml. Se presiona y escurre bien para extraer todo el contenido con la ayuda de una rasqueta que arrastra el moco y con ello las NP y MP adheridas a él.

2.3.3 Tratamiento de las muestras

I. CONTROLES

Las muestras obtenidas con la solución de CyA y la formulación oral comerciales se centrifugaron (5000 rpm, 8 min) para eliminar restos de mucosa, que pueden provocar errores en la valoración por obstrucción del sistema cromatográfico. Se analizó el sobrenadante, en el que se encuentra el fármaco disuelto, mediante la técnica descrita en el epígrafe “1. Desarrollo y validación del método analítico por HPLC”, del capítulo 1.

El volumen extraído del intestino se medirá igualmente para poder realizar los cálculos de las constantes de velocidad de absorción, teniendo en cuenta el proceso de reabsorción que tiene lugar en el intestino.

II. FORMULACIÓN CON NANOPARTÍCULAS Y FORMULACIÓN CON MICROPARTÍCULAS

Muestras intestinales:

Las muestras extraídas a cada tiempo se dividieron en dos partes (100 µl cada una), que se trataron según se describe a continuación:

1. Una alícuota se centrifuga para eliminar restos, principalmente mucosa, se recoge el sobrenadante y se analiza por HPLC. El valor obtenido corresponde al fármaco que se encuentra libre en el lumen intestinal.
2. A otra alícuota se adiciona 100 μ l de solución acetonitrilo-ác.ortofosfórico pH 3 (50:50, v/v), se somete a agitación vórtex y se centrifuga (5000 rpm, 8 min). Con ello se provoca la disolución de las partículas y se libera el fármaco contenido en las mismas. El sobrenadante es analizado por HPLC. Esta fracción corresponde al fármaco que se encuentra encapsulado en las NP/MP.

Muestra intestinal final:

Tras la extracción del volumen intestinal y lavado de los cinco segmentos, se toma 1 ml del volumen extraído, al que se le aplica el método de extracción diseñado: Agitación vórtex, sonicación, centrifugación (5000 rpm, 8 min) y finalmente análisis del sobrenadante por HPLC.

Conocidos los datos de concentración de la muestra y el volumen final (volumen medido del intestino anteriormente + 25 ml de solución extractora) se calcula la cantidad de fármaco obtenida a partir de la extracción.

2.3.4 Tratamiento matemático

Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de modo que la solución remanente en lumen se concentra (273,285). Este proceso puede falsear por exceso el valor de la concentración remanente en lumen.

Con el objetivo de tener en cuenta este efecto, se ha estimado la variación de volumen a cada tiempo. Dado que el proceso sigue una cinética aparente de orden 0, la ecuación representativa en su forma integrada es:

$$V_t = V_0 - K_0 * t$$

Ecuación 15

En la que V_t es el volumen luminal en intestino a cada tiempo, V_0 es el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 representa la constante de velocidad de reabsorción de agua en ml/min.

La concentración en la muestra (concentración corregida) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$C = E * V_t / V_0$$

Ecuación 16

Donde C representa la concentración remanente en el intestino que existiría si no existiera el proceso de absorción para cada tiempo t y E representa la concentración medida en la muestra experimental.

2.3.5 Cálculo de la constante aparente de velocidad de absorción, K_a

Los valores de C calculados mediante la ecuación 5, se utilizan para calcular las constantes de velocidad de absorción K_a por regresión no lineal frente al tiempo (t). La ecuación integrada que rige este proceso es la siguiente:

$$C = C_0 * e^{-K_a * t}$$

Ecuación 17

Donde C corresponde a la concentración de fármaco a cada tiempo, C_0 a la concentración inicial de fármaco, K_a es la constante de absorción que queremos hallar, y t a cada tiempo de muestreo.

El tratamiento matemático de las cinéticas se realizó con el software Microsoft Office Excel 2007® y la gráfica se obtuvo con el software SigmaPlot 12.0®.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica de las NP y MP de PLGA

Las propiedades fisicoquímicas para las NP y MP se resumen en la Tabla 17 y Tabla 18 respectivamente.

Tabla 17. Caracterización fisicoquímica de las NP.

Formulación	Tamaño [nm]	PDI	Potencial Zeta [mV]	EE [%]	Carga [µg/mg]
NP sin CyA	160.5 ± 2.1	0.03 ± 0.02	-27.8 ± 0.5	-	-
CyA-NP	158.1 ± 2.0	0.04 ± 0.04	-31.0 ± 6.1	61.4 ± 2.8	85.3

Tabla 18. Caracterización fisicoquímica de las MP.

Formulación	Tamaño [µm]	Width	EE [%]	Carga [µg/mg]
MP sin CyA	2.8 ± 0.06	1.8 ± 0.06	-	-
CyA-MP	2.7 ± 0.02	1.2 ± 0.02	100.5 ± 2.2	142.4

De acuerdo con los estudios de Mc Connel et al. (286–288) la liberación se estudió a un pH de 6,8 en fluido intestinal simulado preparado según la USP garantizando condiciones sink en todo momento. Ninguna de las partículas mostró liberación rápida inicial seguida de una liberación más lenta (efecto burst) lo que indica que, en este caso, la mayor parte del fármaco se encuentra dentro de la matriz y por tanto, el proceso de lavado por diálisis seguido de liofilización, es adecuado para mantener el fármaco encapsulado

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

durante el almacenamiento. Las CyA-NP liberaron el 67.1 (\pm 8.8) % después de 24 h, mientras que los CyA-MP liberaron el 89.0 (\pm 9.3) % en 24 h. Como se aprecia en la Figura 52, las partículas formuladas con CyA presentan un perfil de liberación controlado.

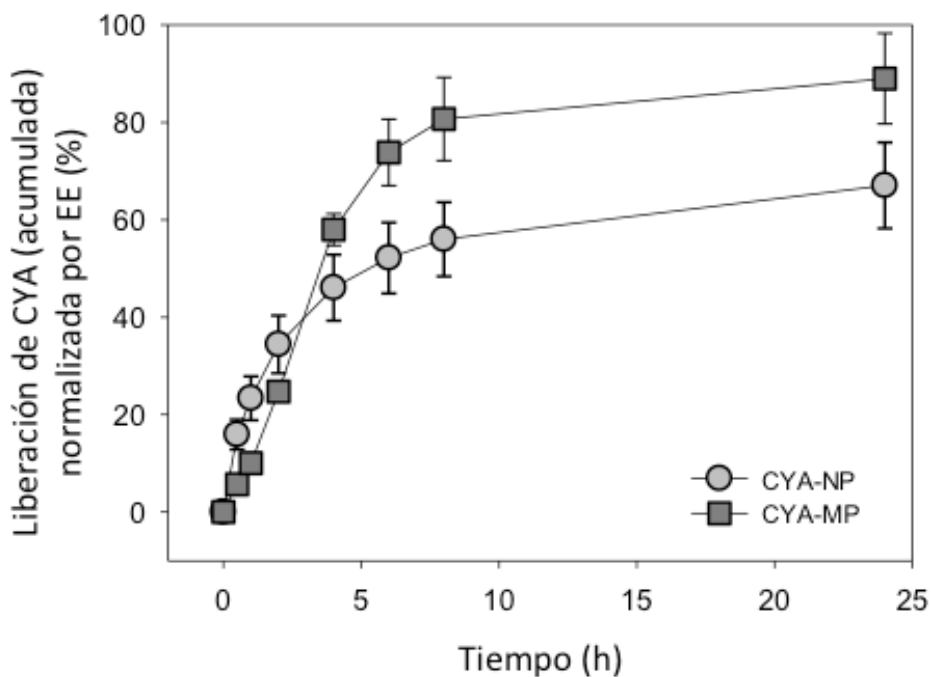


Figura 52. Perfil de liberación de las NP y MP de CyA en SGF pH 6.8 (media \pm SD) (n=3).

2. Estudios de absorción *in vitro* con células CaCo-2

Una vez finalizado el estudio de permeabilidad con células CaCo-2, se procedió al tratamiento y análisis de las muestras. En el caso de las muestras de las formulaciones de solución IV de CyA y las muestras en emulsión, se pudo determinar las concentraciones de las muestras y calcular la permeabilidad, pero en el caso de las muestras obtenidas a partir de los experimentos desarrollados con las NP y MP, la CyA fue detectable pero no pudo ser cuantificada, encontrándose las concentraciones de CyA en las muestras por debajo del LQ.

Para mejorar el LQ del método analítico de CyA mediante HPLC y poder analizar estas muestras, se recurrió al servicio de espectrometría de masas del SCSIE de la Universidad de Valencia, pero los resultados obtenidos con los métodos analíticos ensayados tampoco fueron satisfactorios (Figura 53 y Figura 54).

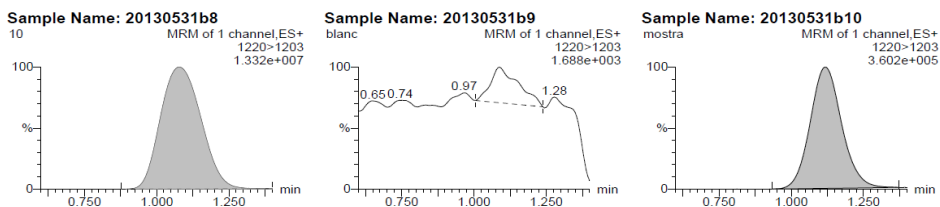


Figura 53. Cromatogramas obtenidos para distintos patrones de CyA por espectroscopía de masas

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

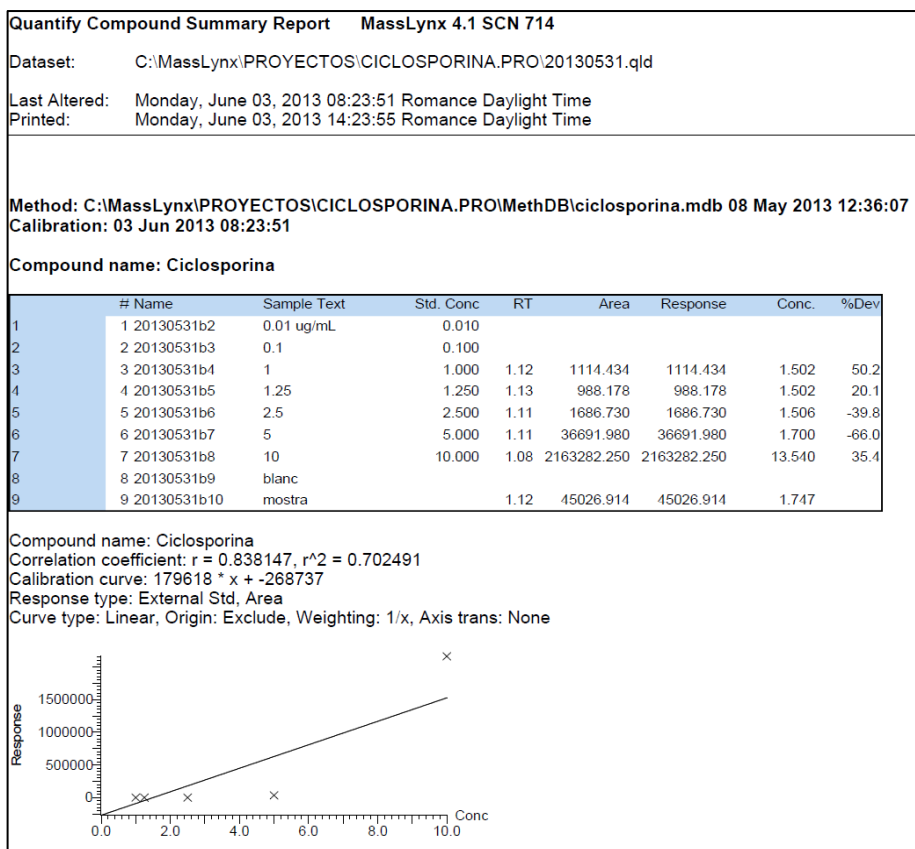


Figura 54. Recta patrón obtenida para CyA mediante espectrometría de masas

En el caso de las muestras con el fármaco libre en solución sí que se obtuvo un perfil de permeabilidad sin observarse diferencias significativas entre la presencia o ausencia de moco. A pesar de que la fracción de fármaco permeada a partir de las NP y MP no pudo ser cuantificada, un porcentaje mayor al 90% de la dosis aplicada pudo ser recuperada del dador al finalizar el experimento, evidenciando que las NP y MP ejercen un control importante de la liberación de fármaco, incluso en presencia de las células intestinales y el moco porcino. Lo

que permite predecir que su comportamiento en medio fisiológico será estable y, conforme a lo esperado, controlando la liberación con efecto terapéutico local.

A pesar de las ventajas que presenta para evaluar la absorción, en nuestro caso, surge el inconveniente de que estas líneas celulares Caco-2 no presentan la capacidad de producir mucus y junto con que la permeabilidad de CyA en el caso de las NP y MP no ha podido ser cuantificada, estas limitaciones nos llevan a la utilización de otros métodos en los que podamos estudiar el efecto del mucus intestinal de forma fisiológica y la posible adsorción a él de las NP y MP.

3. Método de extracción

En la Tabla 19 se presentan los resultados obtenidos mediante el método de extracción seleccionado. El proceso de extracción que finalizó con mejores resultados fue el método 4, descrito en el apartado “Materiales y Métodos”, basado en el uso de acetonitrilo y ácido fosfórico pH3.

Como control se utilizó una mezcla de mucus y solución de CyA, siendo equivalente con las muestras con NP-CyA con mucus. Se analizaron un total de cuatro muestras por grupo:

Tabla 19. Recuperación (%) de CyA mediante el método de extracción.

	% Recuperación de CyA	% Recuperación (Media \pm DS)
Control 1	92,29	96,99 \pm 5,62
Control 2	94,73	
Control 3	105,13	
Control 4	95,82	
NP 1	104,33	104,20 \pm 0,68
NP 2	104,44	
NP 3	104,82	
NP 4	103,23	

La recuperación obtenida tras la aplicación del método de extracción fue satisfactoria, ya que la recuperación media de CyA resultó del 104 \pm 0,68%, encontrándose entre los valores aceptados para un método de extracción, 100 \pm 10 % (289).

4. Estudio cinético de absorción intestinal en rata Wistar

Una vez tratadas las muestras con método de extracción seleccionado, en cada una de las muestras, se analizó el contenido de CyA por HPLC y, mediante el correspondiente análisis matemático, detallado en el apartado 'Materiales y métodos', se calcularon las concentraciones de CyA.

En la Figura 55 se representan las concentraciones de CyA en el lumen intestinal obtenidas para cada uno de los grupos (n=6/grupo), en función del tiempo.

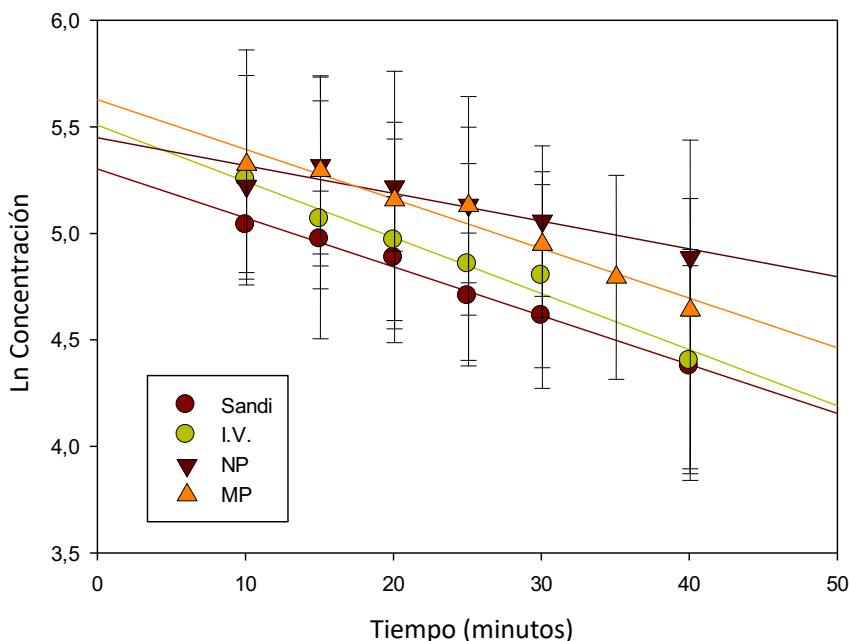


Figura 55. Concentraciones medias de CyA (n=6) en el lumen intestinal a cada tiempo. (Sandi = microemulsión; I.V. = solución; MP = micropartículas-CyA; NP = nanopartículas-CyA).

Como se puede observar, las concentraciones remanentes en lumen en las experiencias control a partir de formulaciones comerciales son siempre inferiores a las que existen cuando se utilizan partículas. Además, la pendiente de la recta es mayor, lo que indica un proceso de absorción más rápido, en consecuencia, con las hipótesis de partida.

Es necesario considerar que las partículas, se adhieren a la mucosa intestinal en función del tiempo y liberan el fármaco de forma paulatina, de tal forma que no todo el fármaco se encuentra

biodisponible. El análisis del contenido luminal, únicamente determina la CyA libre circulante y la que se encuentra en las partículas suspendidas en el lumen intestinal, pero no la de las adheridas a la mucosa. Por tanto, el perfil obtenido en este caso representa una **cinética mixta de adhesión-adsorción** a la mucosa intestinal y no una cinética de absorción al uso.

Una vez finalizado el experimento, a partir de los datos obtenidos con el estudio de absorción y de la extracción intestinal, es posible determinar la cantidad de CyA adherida a mucosa y, por tanto, calcular la cantidad total de fármaco remanente en el lumen intestinal a ese tiempo (datos expuestos en Tabla 20 y Tabla 21), y por diferencia con la dosis inicial, se puede conocer la cantidad de fármaco que ha sido absorbido.

Tabla 20. Valores medios de CyA recuperado en el intestino de rata Wistar tras la administración de nanopartículas (% de dosis inicial)

Muestras de Nanopartículas		Fármaco (%)
Tratamiento de extracción en intestino de rata		
Fármaco (%)	68,4 ± 1,2	
Tratamiento de muestras intestinales		78,81 ± 0,38
Fármaco libre (%)	no cuantificable	
Fármaco en nanopartículas (%)	10,4 ± 0,37	

En el caso de las NP, la liberación de fármaco se produce de forma más sostenida y la cantidad que se va liberando es muy baja y rápidamente absorbida por la mucosa intestinal, por lo tanto, se iguala

la liberación con la absorción y la cantidad libre de fármaco no es cuantificable, al estar por debajo del LQ.

Tabla 21. Valores medios de CyA recuperado en el intestino de rata Wistar tras la administración de micropartículas (% de dosis inicial)

Muestras de Micropartículas		Fármaco (%)
Tratamiento de extracción en intestino de rata		
Fármaco (%)	2,88 ± 1,58	
Tratamiento de muestras intestinales		26,78 ± 1,9
Fármaco libre (%)	11,02 ± 1,0	
Fármaco en micropartículas (%)	12,87 ± 1,2	

Para las dos formulaciones comerciales el cálculo de % dosis remanente en intestino es más sencillo, no es necesario proceso de extracción y los datos se obtienen únicamente a partir del estudio cinético, conocido el volumen intestinal remanente y las concentraciones de muestreo.

En la Tabla 22 se expone las constantes de velocidad de primer orden que caracterizan el proceso de disminución de la concentración luminal de las cuatro diferentes formulaciones.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones.

n=6	Ka (1/h) ±DS
Microemulsión de CyA	2,09 ± 0,88
Solución de CyA	1,85 ± 0,58
Micropartículas-CyA	1,39 ± 0,67
Nanopartículas-CyA	0,78 ± 0,35

Consecuentemente a lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la K_a obtenida para las formulaciones de NP y MP no representan realmente el valor de la constante de absorción de los procesos, sino la constante de adsorción al moco, K_{ads} .

Existen diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$; $p=0,024$) entre los valores de estos parámetros.

La prueba de Tukey, de comparación múltiple por pares, permite establecer que hay diferencias significativas cuando se compara la formulación de **nanopartículas** con **la solución comercial** ($\alpha=0,05$; $p=0,021$). Para el resto de las comparaciones no resultan diferencias significativas.

El estudio cinético revela que la concentración de CyA que permanece en el lumen intestinal en el caso de las NP es mayor en comparación a las otras formulaciones, transcurridos los primeros 10 minutos.

Además, la diferencia de concentración que se observa a cada tiempo entre los puntos de la formulación de NP y las otras formulaciones aumenta conforme pasa el tiempo, lo que indica que se consiguen mayores concentraciones de fármaco en el lugar de acción y mayor permanencia con la nueva formulación de NP.

Por otro lado, para las formulaciones comerciales, se puede suponer que la cantidad remanente de CyA está biodisponible y por tanto la cantidad restante ha sido absorbida a través de la mucosa intestinal, mientras que en el caso de las NP no puede asumirse esto,

pues la fracción biodisponible es menor, ya que parte del fármaco se encuentra incluido en las NP adheridas a la mucosa.

En el caso de las NP, después de la extracción de todas las muestras y del contenido intestinal, se ha determinado que aproximadamente el 79 % de la dosis permanecía en el lumen intestinal y, por tanto, sólo el 21% de la dosis de CyA ha podido ser absorbida.

Teniendo en cuenta que aproximadamente el 10 % de la dosis puede perderse en la extracción (289) se puede postular que el **11%** restante se ha liberado de las NP en 40 minutos y ha sido absorbido.

Sin embargo, para el caso de las dos formulaciones comerciales y las MP, la cantidad de dosis que permanecía en el lumen intestinal era muy inferior, tan sólo alrededor del 30%. Este hecho nos indica que la cantidad restante, aproximadamente un 70% de la dosis, ha sido absorbida, pudiendo acceder a circulación sistémica.

A partir de estos datos se puede concluir que la formulación NP es la que mejor controla la liberación de fármaco y que establece interacciones con el mucus intestinal, quedando adheridas durante periodos más largos que las MP y las formulaciones comerciales.

Este modelo *in situ* presenta ventajas respecto al método *in vitro* (CaCo-2) expuesto anteriormente, ya que permite obtener concentraciones mayores y permite observar mejor los efectos, incluyendo el efecto de la motilidad y la absorción de agua y la adhesión al mucus intestinal.

5. Eficacia farmacológica de la nueva formulación *in vivo*

Estudios posteriores publicados, y en los que he participado, han permitido valorar la eficacia de las partículas en un modelo inducido de inflamación aguda en ratón Balb-C (290).

Los ratones se dividieron en 15 grupos, como se muestra en la Tabla 23. El diseño del modelo experimental se esquematiza en la Figura 56.

Tabla 23. Resumen de los grupos experimentales del ensayo *in vivo*.

Grupos	Tratamiento	Nomenclatura
1	blank (animales sanos)	blank
2	DSS (animales enfermos)	control
3	Sandimmun (25 mg/kg)	Sandimmun (25 mg/kg) + DSS
4	Sandimmun (50 mg/kg)	Sandimmun (50 mg/kg) + DSS
5	NP sin fármaco	NP (50 mg/kg) + DSS
6	CyA-NP (50 mg/kg)	CyA-NP (50 mg/kg) + DSS
7	CyA-NP (25 mg/kg)	CyA-NP (25 mg/kg) + DSS
8	CyA-NP (12.5 mg/kg)	CyA-NP (12.5 mg/kg) + DSS
9	MP sin fármaco	MP (50 mg/kg) + DSS
10	CyA-MP (50 mg/kg)	CyA-MP (50 mg/kg) + DSS
11	Sandimmun (50 mg/kg)	Sandimmun (50 mg/kg)
12	NP-sin fármaco	NP (50 mg/kg)
13	CyA-NP (50 mg/kg)	CyA-NP (50 mg/kg)
14	MP-sin fármaco	MP (50 mg/kg)
15	CyA-MP (50 mg/kg)	CyA-MP (50 mg/kg)

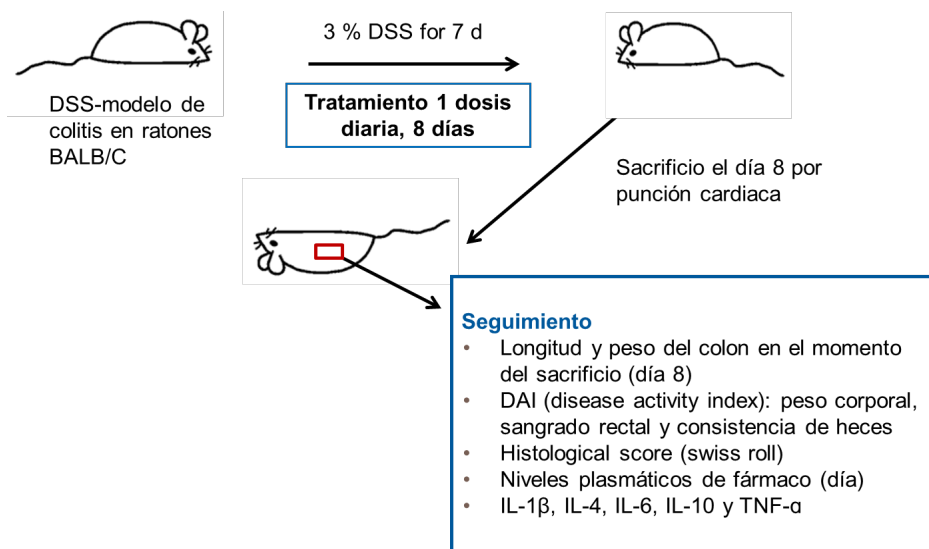


Figura 56. Esquema del modelo experimental del ensayo farmacológico.

Los animales se mantuvieron durante 8 días. A los grupos enfermos se les administró Dextrano sulfato sódico (DSS) durante 7 días *ad libitum*, es decir, en el agua de bebida. Los grupos sanos bebieron agua. Durante los 7 días se les trató con su tratamiento, ya fuera blanco, control (sandimun), NP o MP de excipiente o NP o MP con fármaco. Durante los 8 días se comprobó el agua de bebida que habían consumido, se pesaron los animales y se estudió la presencia de sangre en heces o el enrojecimiento de la región perianal. El octavo día, 1h después de la última dosis de tratamiento se sacrificaron los animales por punción cardíaca, para medir valores plasmáticos de CyA. Después se extrajo el colon de los animales y se midió su longitud y su peso. Además, se hizo un lisado del tejido para medir la presencia de interleuquinas marcadoras de la inflamación. Por último, se hizo un estudio histológico de la pared abdominal para observar los daños de la mucosa y el potencial efecto mucoprotector de la CyA en la formulación comercial y en las NP y MP.

La evolución del peso corporal de los animales durante 8 días se puede observar en la Figura 57. En la misma, se aprecian los grupos establecidos según el tratamiento: blanco, control, Sandimmun (solución de CyA), CyA-NP, NP, CyA-MP y MP.

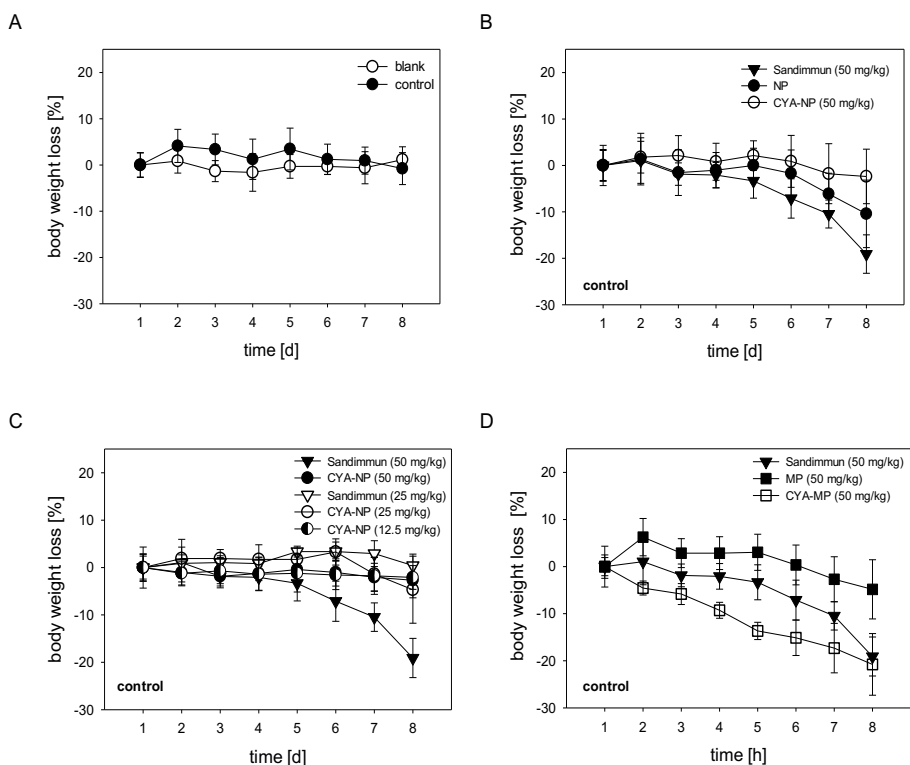


Figura 57. Peso corporal durante el tratamiento con DSS.

Tanto la formulación comercial como las MP redujeron el peso corporal de los animales tras el 4º día de administración, mientras que las NP no afectaron significativamente a este parámetro. Con la dosis de 50 mg/kg de peso, sí se observa una disminución de peso en los animales a partir del día 6 en todos los casos, demostrando una potencial toxicidad de fármaco a esta dosis.

El efecto de la CyA en la recuperación de tamaño de colon de los animales puede verse en las Figura 58 y Figura 59.



Figura 58. Fotografía de la longitud del colon de los animales.

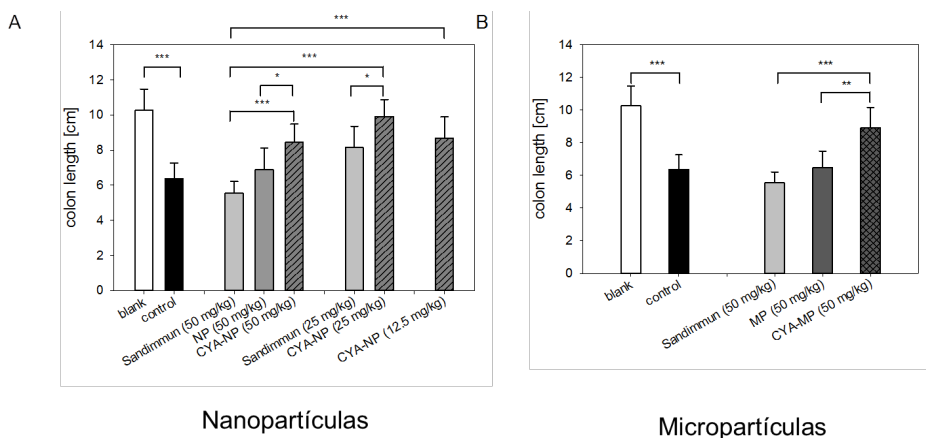


Figura 59. Longitud del colon de los animales.

Se puede observar en estos gráficos una recuperación mayor de la longitud intestinal en el caso de las NP frente a las MP y también al tratamiento de referencia. Esta recuperación es dosis dependiente, siendo la mejor la dosis intermedia.

Los estudios histológicos se presentan en la Figura 60.

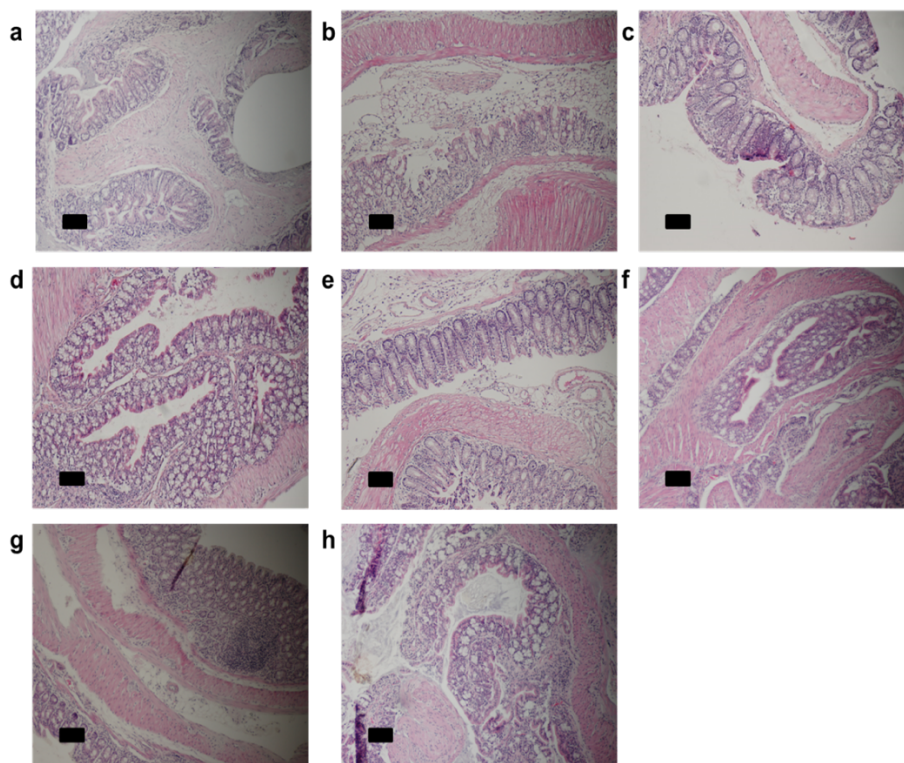


Figura 60. estudio histológico (10x, scale bar = 100 μ m). (a) blank, (b) DSS, (c) Sandimmun (50 mg/kg), (d) CyA-NP (50 mg/kg), (e) CyA-MP (50 mg/kg), (f) Sandimmun (25 mg/kg), (g) CyA-NP (25 mg/kg), (h) CyA-NP (12.5 mg/kg).

El control (Figura 60b) muestra los típicos cambios en la mucosa inducidos por DSS: pérdida total de la arquitectura anatómica del colon, incluyendo ulceraciones de la mucosa, daño de criptas, pérdida completa de vilis, edema e infiltración celular hacia el tejido mucoso. La parte más afectada es la distal, como es típico en este modelo. Estos cambios apoyan la selección de este modelo experimental. Como cabía esperar, las NP y MP sin fármaco muestran un daño mayor en la mucosa, similar al del control, que fue ligeramente superior para las MP.

Los resultados demuestran que todos los animales tratados con el fármaco, excepto CyA-MP, mostraron eficacia farmacológica en el estudio histológico. La solución comercial de CyA, en la Figura 60c, muestra un colon mejor conservado que CyA-NP (Figura 60d) y CyA-MP (Figura 60e), con la dosis 50 mg/kg. Los resultados son similares con la dosis 25mg/kg (Figura 60f). Las CyA-NP a 50 mg/kg y 25 mg/kg (Figura 60d y Figura 60g). Ambas, CyA-NP a 50 mg/kg y 25 mg/kg muestran una mejora sustancial respecto al control con DSS ($p=0.003$, $p=0.004$, respectivamente) y para NP sin fármaco ($p<0.001$, $p=p<0.001$, respectivamente)- CyA-NPs reduce significativamente los daños ~25% respecto a la solución comercial de CyA. Las CyA-NP con una dosis de 12.5 mg/kg (Figura 60h) muestran menor eficacia con una inflamación más severa. Las CyA-MP (Figura 60e) muestran una mucosa completamente destrozada y células inmunes con infiltraciones nodulares.

En resumen, el análisis histológico mostró una recuperación de la mucosa para todas las formulaciones en comparación con el control de la enfermedad, siendo mejor para las NP que para la solución comercial, y la peor actividad se registró para las MP. Por lo tanto, la mejor actividad terapéutica se consiguió con las NP.

Por último, el plasma obtenido de los ratones tratados con la solución comercial de CyA y con las MP, presentaron coloración amarilla, que es un signo clínico típico de liberación de bilirrubina debido a toxicidad hepática. Coloración que no estuvo presente en el caso de las NP. En los animales tratados con NP no se detectaron concentraciones plasmáticas de CyA. Se obtuvieron concentraciones

plasmáticas cuantificables en los animales tratados con MP y en el grupo tratado con la solución comercial, siendo estas de 45.77 ± 0.83 $\mu\text{g/ml}$ y 58.45 ± 0.17 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estas dos formulaciones proporcionarían una mayor biodisponibilidad del fármaco debido a una liberación y absorción más rápidas, lo que provoca toxicidad a una dosis elevada. Las NP, en cambio, liberan el fármaco a un ritmo más lento, proporcionando actividad farmacológica *in situ* y reduciendo la toxicidad, ya que ninguna de las formulaciones de NP mostró perfil plasmático del fármaco. Probablemente las partículas se adhieren a las zonas ulceradas y liberan la CYA encapsulada a un ritmo controlado. Además, como la formulación no se eliminaría del tejido diana por diarrea o por absorción intestinal, debería mostrar una actividad más prolongada que la solución comercial.

Estudios recientes han demostrado que las NP y MP pueden depositarse durante periodos prolongados en las zonas ulceradas del colon resultantes de la destrucción de la pared intestinal. Aquí puede observarse un efecto de depósito, ya que estos sistemas matriciales pueden liberar el fármaco que contienen, de forma controlada, *in situ* (246–249,291). La NP también puede sedimentar y adherirse a la capa mucosa del lumen (248). Esta capa es más gruesa en los pacientes que presentan este tipo de patologías, ya que la producción de moco aumenta dentro del proceso inflamatorio, especialmente en las zonas ulceradas (250–252). Otros estudios con NP han observado una acumulación dependiente del tamaño en la mucosa intestinal y en los tejidos inflamados. La acumulación de NP de $0,1 \mu\text{m}$ fue la mayor

entre los tipos estudiados, debido a su mayor capacidad para penetrar y adherirse a la mucosa y depositarse en las zonas ulceradas (248,291).

En resumen, el efecto protector de la CYA en la mucosa intestinal de los animales se observó en todas las formulaciones ensayadas. Sin embargo, hubo una mejora en casi todos los parámetros evaluados en el modelo cuando el fármaco se encapsuló en las NP. Estos resultados eran de esperar, ya que se había informado anteriormente de que las NP proporcionan mejores efectos en modelos de roedores. No obstante, las MP podrían ser más eficaces cuando se utilizan en seres humanos si las NP se absorbieran enteras a través de las alteraciones de la pared mucosa. Estos resultados, en combinación con las cuantificaciones de los niveles plasmáticos, confirman que el efecto del fármaco se localiza principalmente en la mucosa intestinal y no se debe a la absorción sistémica del fármaco. Sin embargo, son necesarios más estudios en un modelo crónico para imitar mejor la situación del paciente o incluso un ensayo clínico en el que las dosis puedan ajustarse para humanos, con formulaciones optimizadas preseleccionadas. También debería estudiarse la toxicidad a largo plazo.

6. Resumen e implicaciones de los resultados obtenidos en este capítulo

El método de extracción de CyA desarrollado para el moco intestinal resultó ser adecuado y eficaz para el propósito de este trabajo. La recuperación de fármaco se encuentra dentro de los límites aceptados, $100 \pm 10\%$.

El método *in vitro* de permeabilidad con células Caco-2, permitió únicamente determinar las concentraciones de las muestras y calcular la permeabilidad en las formulaciones con fármaco libre en solución, sin observarse diferencias significativas entre las muestras en presencia o ausencia de moco. En cambio, la fracción de fármaco permeada a partir de las NP y MP no pudo ser cuantificada debido a un muy eficiente control de la liberación. A pesar de ello, un porcentaje mayor al 90% de la dosis aplicada pudo ser recuperada del dador al finalizar el experimento, evidenciando que las NP y MP ejercen un control importante de la liberación de fármaco.

El modelo *in situ* llevado a cabo presenta limitaciones experimentales para calcular la cinética de absorción de fármaco formulado en NP y MP debido a la adhesión de éstas al mucus intestinal. A pesar de ello, se ha podido completar el estudio previsto, que proporciona suficientes resultados evidenciando la mejora de la formulación respecto a las alternativas comerciales estudiadas en este trabajo.

La formulación de CyA con el sistema nanoestructurado presenta un perfil de liberación controlada que proporciona mayor permanencia del fármaco en la zona a tratar permitiendo prever un efecto tópico, minimizando efectos sistémicos y, por consiguiente, efectos secundarios indeseables.

A su vez, se ha comprobado que, administrando la misma dosis de CyA para las cuatro formulaciones estudiadas, en el caso de la formulación de NP se consiguieron concentraciones más altas de fármaco en la zona a tratar, el intestino, y menor absorción de fármaco, minimizando el acceso a circulación sistémica.

En el caso de las MP, se ha observado que permiten una liberación sostenida de CyA. No obstante, la cinética obtenida tras la realización de los estudios con ratas Wistar, no presenta diferencias significativas con respecto a las otras formulaciones.

Estudios posteriores corroboran el potencial de las NP que permiten una mejor administración local de CyA a la mucosa intestinal inflamada después de la administración oral, produciendo la misma mejora de los parámetros de la enfermedad a sólo la mitad de la dosis en comparación con las MP y una formulación oral comercial, respectivamente, y al mismo tiempo minimizando la exposición sistémica y los efectos adversos asociados.

Por todos los estudios realizados se puede concluir que las NP de CyA son mucoadhesivas y ejercen un control en la liberación de fármaco que permite dar lugar a efectos locales en la mucosa intestinal disminuyendo la absorción sistémica y por tanto los efectos

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

secundarios de este fármaco, permitiendo así, abrir una nueva vía en la terapia de los pacientes que sufren enfermedad intestinal inflamatoria crónica.

V.- CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado la absorción de CyA a partir de NP y MP de PLGA en un modelo *in vitro* de células Caco-2. A pesar de ser un modelo representativo de la mucosa intestinal, la fracción de fármaco permeada a partir de las NP y MP no pudo ser cuantificada debido a un muy eficiente control de la liberación.
2. Se ha desarrollado un método adecuado y eficaz de extracción de CyA del moco intestinal, con una recuperación de fármaco dentro de los límites aceptados.
3. Se ha estudiado la absorción *in situ* de CyA a partir de las NP y MP en un modelo de perfusión controlada en rata Wistar. Los resultados evidencian que existe una mejora de la formulación respecto a las alternativas comerciales estudiadas en este trabajo. Las MP permiten una liberación sostenida de CyA sin presentar diferencias significativas con respecto a las otras formulaciones. Las NP presentan un perfil de liberación controlada que proporciona mayor permanencia del fármaco en la zona a tratar permitiendo prever un efecto local, consiguiendo concentraciones más altas de fármaco en el tejido diana, el intestino, y menor absorción de fármaco,

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

minimizando el acceso a circulación sistémica. Por lo que se puede asumir que las NP son mucoadhesivas.

Conclusiones generales

1. Se han desarrollado varios sistemas liposomales ultraflexibles cargados con CyA, con unas características óptimas para su administración, que han facilitado la difusión de CyA a través de la epidermis humana y su distribución en las diferentes capas de la piel. Además, con estos sistemas ultraflexibles se han creado formulaciones tipo hidrogel que muestran una liberación pasiva de la CyA a través de la matriz polimérica.
2. Se ha estudiado el perfil de absorción intestinal de CyA formulada tanto en MP como en NP de PLGA, utilizando métodos *in vitro* e *in situ*, comparando con dos formulaciones comerciales. Se ha comprobado que las MP permiten una liberación sostenida del fármaco sin presentar diferencias significativas respecto a las formulaciones comerciales. Las NP presentan un perfil de liberación controlada que facilita la permanencia de CyA en el intestino minimizando el acceso a circulación sistémica.

Rreferencias bibliográficas

Desarrollo de formulaciones de liberación controlada para enfermedades inflamatorias

1. Altman RD. Safety Advantages of Topical versus Oral Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *J Rheumatol*. 1 de marzo de 2011;38(3):572-572.
2. Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE J*. 1 de septiembre de 1975;21(5):985-96.
3. Melero A, Garrigues TM, Almudever P, Villodre AMN, Lehr CM, Schäfer U. Nortriptyline hydrochloride skin absorption: development of a transdermal patch. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. junio de 2008;69(2):588-96.
4. Ourique AF, Melero A, de Bona da Silva C, Schaefer UF, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. septiembre de 2011;79(1):95-101.
5. Mathes C, Melero A, Conrad P, Vogt T, Rigo L, Selzer D, et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 de febrero de 2016;223:207-14.
6. Melero A, Ferreira Ourique A, Stanisçuaski Guterres S, Raffin Pohlmann A, Lehr CM, Ruver Beck RC, et al. Nanoencapsulation in lipid-core nanocapsules controls mometasone furoate skin permeability rate and its penetration to the deeper skin layers. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(4):217.

7. Comunicación. Los síntomas de la psoriasis afectan la vida diaria del 70% de pacientes [Internet]. Acción Psoriasis - Asociación de Pacientes de Psoriasis y Familiares. [citado 4 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.accionpsoriasis.org/investigacion/estudios/510-los-sintomas-de-la-psoriasis-afectan-a-la-vida-diaria-del-70-de-pacientes-2.html>
8. Wang WM, Wu C, Jin HZ. Exosomes in chronic inflammatory skin diseases and skin tumors. *Exp Dermatol.* 2019;28(3):213-8.
9. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol.* abril de 2014;5(2):202.
10. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *The Lancet.* 1 de agosto de 2020;396(10247):345-60.
11. Carreras JJ, Tapia-Ramirez WE, Sala A, Guillot AJ, Garrigues TM, Melero A. Ultraflexible lipid vesicles allow topical absorption of cyclosporin A. *Drug Deliv Transl Res.* 1 de abril de 2020;10(2):486-97.
12. Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol.* diciembre de 2010;63(6):925-46; quiz 947-8.
13. Lee SS, Tan AWH, Giam YC. Cyclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis: a retrospective study. *Ann Acad Med Singapore.* mayo de 2004;33(3):311-3.
14. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM,

Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *J Am Acad Dermatol.* septiembre de 2009;61(3):451-85.

15. Ryan C, Amor KT, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part II. *J Am Acad Dermatol.* diciembre de 2010;63(6):949-72; quiz 973-4.

16. Choi HK, Flynn GL, Amidon GL. Percutaneous absorption and dermal delivery of cyclosporin A. *J Pharm Sci.* mayo de 1995;84(5):581-3.

17. Dragicevic N, Maibach HI, editores. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2016 [citado 27 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.springer.com/in/book/9783662478615>

18. Mitragotri S, Anissimov YG, Bunge AL, Frasch HF, Guy RH, Hadgraft J, et al. Mathematical models of skin permeability: An overview. *Int J Pharm.* 10 de octubre de 2011;418(1):115-29.

19. Brandl M. Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol Annu Rev.* 2001;7:59-85.

20. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev.* 27 de marzo de 2004;56(5):675-711.

21. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 7 de agosto de 2008;34(4-5):203-22.

22. Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta*. 19 de enero de 1998;1368(2):201-15.
23. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *J Pharm Pharmacol*. octubre de 2001;53(10):1311-22.
24. Ascenso A, Raposo S, Batista C, Cardoso P, Mendes T, Praça FG, et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5837-51.
25. Maheshwari RGS, Tekade RK, Sharma PA, Darwhekar G, Tyagi A, Patel RP, et al. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. *Saudi Pharm J*. abril de 2012;20(2):161-70.
26. Oyarzún P, Gallardo-Toledo E, Morales J, Arriagada F. Transfersomes as alternative topical nanodosage forms for the treatment of skin disorders. *Nanomed*. noviembre de 2021;16(27):2465-89.
27. Parashar T, Sachan R, Singh V, Singh G, Tyagi S, Patel C. ETHOSOMES: A RECENT VESICLE OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM. 2013;8.
28. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U,

- Vogt A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* febrero de 2009;71(2):173-80.
29. Kumar V, Banga AK. Intradermal and follicular delivery of adapalene liposomes. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(6):871-9.
30. Han I, Kim M, Kim J. Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. *Exp Dermatol.* febrero de 2004;13(2):86-92.
31. Tuitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Controlled Release.* 3 de abril de 2000;65(3):403-18.
32. Pang KS. Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* diciembre de 2003;31(12):1507-19.
33. MacAdam A. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de septiembre de 1993;11(3):201-20.
34. Boegh M, Baldursdóttir SG, Müllertz A, Nielsen HM. Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing in vitro model for assessment of intestinal drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* julio de 2014;87(2):227-35.
35. Wachsmann P, Lamprecht A. Chapter nineteen - Polymeric Nanoparticles for the Selective Therapy of Inflammatory Bowel

Disease. En: Düzgüneş N, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2012 [citado 30 de noviembre de 2022]. p. 377-97. (Nanomedicine; vol. 508). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123918604000197>

36. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut*. marzo de 2006;55(Suppl 1):i36-58.

37. Rabišková M, Bautzová T, Gajdziok J, Dvořáčková K, Lamprecht A, Pellequer Y, et al. Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: In vitro characteristics and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 17 de enero de 2012;422(1):151-9.

38. Beloqui A, Coco R, Alhouayek M, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Muccioli GG, et al. Budesonide-loaded nanostructured lipid carriers reduce inflammation in murine DSS-induced colitis. *Int J Pharm*. 1 de octubre de 2013;454(2):775-83.

39. Grimpén F, Pavli P. Advances in the management of inflammatory bowel disease. *Intern Med J*. abril de 2010;40(4):258-64.

40. Draheim C, de Crécy F, Hansen S, Collnot EM, Lehr CM. A Design of Experiment Study of Nanoprecipitation and Nano Spray Drying as Processes to Prepare PLGA Nano- and Microparticles with Defined Sizes and Size Distributions. *Pharm Res*. agosto de 2015;32(8):2609-24.

41. Collnot EM, Ali H, Lehr CM. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 20 de julio de 2012;161(2):235-46.
42. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 1 de septiembre de 2011;3(3):1377-97.
43. Herrlinger K, Wittig B, Stange EF. [Chronic inflammatory intestinal diseases. Pathophysiology and therapy]. *Internist.* octubre de 2009;50(10):1229-46; quiz 1247.
44. Kornbluth A. Cyclosporine in inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* diciembre de 1999;1(6):486-90.
45. Clark M, Colombel JF, Feagan BC, Fedorak RN, Hanauer SB, Kamm MA, et al. American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, June 21-23, 2006. *Gastroenterology.* julio de 2007;133(1):312-39.
46. Wilkinson JB, Moore RJ. *Cosmetología de Harry.* En: 1ª. Madrid: Ediciones Díaz de Santos SA; 1990. p. 1-18.
47. Hanau A, Stücker M, Gambichler T, Orlikov A, Hoffmann K, Altmeyer P, et al. [Noninvasive diagnosis of skin functions]. *Hautarzt Z Für Dermatol Venerol Verwandte Geb.* diciembre de 2003;54(12):1211-23.
48. King A, Balaji S, Keswani SG. Biology and Function of Fetal and Pediatric Skin. *Facial Plast Surg Clin N Am.* febrero de 2013;21(1):1-6.

49. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. junio de 2009;91(6):784-90.

50. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. mayo de 2012;30(3):257-62.

51. Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editores. *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011 [citado 27 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.springer.com/us/book/9783642197918>

52. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. abril de 2007;21(4):976-94.

53. Foldvari null. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm Sci Technol Today*. 1 de diciembre de 2000;3(12):417-25.

54. Contri RV, Fiel LA, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck CR. *Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and in vitro Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration*. 1ª. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. 3-35 p.

55. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*. 1 de octubre de 2012;435(1):3-9.

56. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol*

Immunol. julio de 2015;66(1):14-21.

57. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de noviembre de 2002;54 Suppl 1:S3-17.

58. McLean WHI. Filaggrin failure – from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *Br J Dermatol.* octubre de 2016;175(Suppl Suppl 2):4-7.

59. Pappas A, editor. *Lipids and Skin Health* [Internet]. Springer International Publishing; 2015 [citado 28 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.springer.com/in/book/9783319099422>

60. Garvie-Cook H. *Novel (Trans)dermal Drug Delivery Strategies: Micro- and Nano-scale Assessments* [Internet]. Springer International Publishing; 2016 [citado 28 de marzo de 2019]. (Springer Theses). Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9783319289007>

61. Benson HAE. Skin Structure, Function, and Permeation. En: *Topical and Transdermal Drug Delivery* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [citado 28 de marzo de 2019]. p. 1-22. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118140505.ch1>

62. Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de noviembre de 2002;54 Suppl 1:S31-40.

63. Vandersee S, Erdmenger U, Patzelt A, Beyer M, Meinke MC, Darvin ME, et al. Significance of the follicular pathway for dermal substance penetration quantified by laser Doppler flowmetry. *J Biophotonics.* marzo de 2016;9(3):276-81.

64. Kattou P, Lian G, Glavin S, Sorrell I, Chen T. Development of a Two-Dimensional Model for Predicting Transdermal Permeation with the Follicular Pathway: Demonstration with a Caffeine Study. *Pharm Res.* octubre de 2017;34(10):2036-48.
65. Lane ME, Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J. Passive Skin Permeation Enhancement. En: *Topical and Transdermal Drug Delivery* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [citado 28 de marzo de 2019]. p. 23-42. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118140505.ch2>
66. Williams AC. *Topical and transdermal drug delivery.* 4ª. London: Livingstone Churchill; 2013. 97-676 p.
67. Grice JE, Prow TW, Kendall MAF, Roberts MS. Electrical and Physical Methods of Skin Penetration Enhancement. En: *Topical and Transdermal Drug Delivery* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [citado 28 de marzo de 2019]. p. 43-65. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118140505.ch3>
68. Kalaria DR, Dubey S, Kalia YN. Clinical Applications of Transdermal Iontophoresis. En: *Topical and Transdermal Drug Delivery* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [citado 28 de marzo de 2019]. p. 67-83. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118140505.ch4>
69. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* febrero de 2005;4(2):145-60.
70. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation.

Chem Phys Lipids. enero de 2014;177:8-18.

71. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov Today Technol.* 2005;2(1):67-74.

72. Mozafari MR, editor. *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications* [Internet]. Springer Netherlands; 2007 [citado 9 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.springer.com/la/book/9781402062889>

73. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 7 de agosto de 2008;34(4-5):203-22.

74. Ganesan MG, Weiner ND, Flynn GL, Ho NFH. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. *Int J Pharm.* 1 de enero de 1984;20(1):139-54.

75. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J Pharm Pharmacol.* octubre de 1999;51(10):1123-34.

76. Kato A, Ishibashi Y, Miyake Y. Effect of egg yolk lecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. *J Pharm Pharmacol.* mayo de 1987;39(5):399-400.

77. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. *Int J Pharm.* 25 de agosto de 2000;204(1-2):159-69.

78. du Plessis J, Weiner N, Müller DG. The influence of in vivo

treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. *Int J Pharm.* 15 de marzo de 1994;103(2):R1-5.

79. Weiner N, Williams N, Birch G, Ramachandran C, Shipman C, Flynn G. Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 1989;33(8):1217-21.

80. Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J Pharm Pharmacol.* julio de 1982;34(7):473-4.

81. Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* 5 de mayo de 1980;26(18):1473-7.

82. Foldvari M, Gesztes A, Mezei M. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J Microencapsul.* diciembre de 1990;7(4):479-89.

83. Schramlová J, Blazek K, Bartácková M, Otová B, Mardesicová L, Zizkovský V, et al. Electron microscopic demonstration of the penetration of liposomes through skin. *Folia Biol (Praha).* 1997;43(4):165-9.

84. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm.* 6 de marzo de 2007;332(1-2):1-16.

85. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin

owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*. 17 de febrero de 1992;1104(1):226-32.

86. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int J Pharm*. 25 de febrero de 2000;196(1):63-74.

87. Abdulbaqi IM, Darwis Y, Khan NAK, Assi RA, Khan AA. Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *Int J Nanomedicine*. 25 de mayo de 2016;11:2279-304.

88. Walve JR, Bakliwal SR, Rane B, Pawar SP. Transfersomes: A surrogated carrier for transdermal drug delivery system. *Int J Appl Biol Pharm Technol*. 1 de enero de 2011;2:204-13.

89. S. Dua J, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: Methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*. 1 de enero de 2012;3:14-20.

90. Bagatolli L, Kumar PBS. Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques. *Soft Matter*. 1 de enero de 2009;5(17):3234-48.

91. Rosiak JM, Yoshii F. Hydrogels and their medical applications. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 1 de mayo de 1999;151:56-64.

92. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 14 de diciembre de 2008;60(15):1638-49.

93. Baroli B. Hydrogels for tissue engineering and delivery of

tissue-inducing substances. *J Pharm Sci.* septiembre de 2007;96(9):2197-223.

94. Kanzaki Z. *Handbook-of-Pharmaceutical-Excipients* 6th Edition. [citado 16 de diciembre de 2020]; Disponible en: https://www.academia.edu/16731682/Handbook_of_Pharmaceutical_Excipients_6th_Edition

95. Guiseppi-Elie A. Electroconductive hydrogels: synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials.* abril de 2010;31(10):2701-16.

96. Park H, Park K. Biocompatibility Issues of Implantable Drug Delivery Systems. *Pharm Res.* 1 de diciembre de 1996;13(12):1770-6.

97. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 17 de enero de 2002;54(1):3-12.

98. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res.* 1 de marzo de 2015;6(2):105-21.

99. Gibas I, Janik H. Review: Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chem Chem Technol.* 1 de enero de 2010;4:297-304.

100. Williams RO, Sykora MA, Mahaguna V. Method to recover a lipophilic drug from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. *AAPS PharmSciTech.* junio de 2001;2(2):29-37.

101. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 24832095, Hypromellose [Internet]. 2020 [citado 16 de diciembre de 2020]. Disponible en:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24832095>

102. Abdelmalak NS, El-Menshawe S. A NEW TOPICAL FLUCONAZOLE MICROSPONGE LOADED HYDROGEL: PREPARATION AND CHARACTERIZATION [Internet]. undefined. 2012 [citado 16 de diciembre de 2020]. Disponible en: /paper/A-NEW-TOPICAL-FLUCONAZOLE-MICROSPONGE-LOADED-AND-Abdelmalak-El-Menshawe/3754a183d6978e345c7f7bd026f051b7adedf4d2
103. Vila MMDC, Coelho SL, Chaud MV, Tubino M, Oliveira JM, Balcao VM. Development and characterization of a hydrogel containing nitrofurazone for antimicrobial topical applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014;15(2):182-90.
104. Jodar KSP, Balcão VM, Chaud MV, Tubino M, Yoshida VMH, Oliveira JM, et al. Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. *J Pharm Sci.* julio de 2015;104(7):2241-54.
105. Gao W, Vecchio D, Li J, Zhu J, Zhang Q, Fu V, et al. Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS Nano.* 25 de marzo de 2014;8(3):2900-7.
106. Kim MK, Chung SJ, Lee MH, Shim CK. Delivery of hydrocortisone from liposomal suspensions to the hairless mouse skin following topical application under non-occlusive and occlusive conditions. *J Microencapsul.* febrero de 1998;15(1):21-9.
107. Alinaghi A, Rouini MR, Johari Daha F, Moghimi HR. Hydrogel-embedded vesicles, as a novel approach for prolonged release

and delivery of liposome, in vitro and in vivo. *J Liposome Res.* 1 de septiembre de 2013;23(3):235-43.

108. Billard A, Pourchet L, Malaise S, Alcouffe P, Montembault A, Ladavière C. Liposome-loaded chitosan physical hydrogel: Toward a promising delayed-release biosystem. *Carbohydr Polym.* 22 de enero de 2015;115:651-7.

109. Baena Y, Dallos LJ, Manzo RH, D'León P, F L. Standardization of Franz cells to evaluate drugs release from drug-polyelectrolyte complexes. *Rev Colomb Cienc Quím - Farm.* diciembre de 2011;40(2):174-88.

110. Selzer D, Hahn T, Naegel A, Heisig M, Kostka KH, Lehr CM, et al. Finite dose skin mass balance including the lateral part: comparison between experiment, pharmacokinetic modeling and diffusion models. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 de enero de 2013;165(2):119-28.

111. Chourasia MK, Kang L, Chan SY. Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery. *Results Pharma Sci.* 1 de mayo de 2011;1(1):60-7.

112. Zhang YT, Shen LN, Wu ZH, Zhao JH, Feng NP. Comparison of ethosomes and liposomes for skin delivery of psoralen for psoriasis therapy. *Int J Pharm.* 25 de agosto de 2014;471(1-2):449-52.

113. van Hoogevest P, Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol.* septiembre de 2014;116(9):1088-107.

114. Inglut CT, Sorrin AJ, Kuruppu T, Vig S, Cicalo J, Ahmad H, et al. Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomaterials*. febrero de 2020;10(2):190.
115. Smistad G, Jacobsen J, Sande SA. Multivariate toxicity screening of liposomal formulations on a human buccal cell line. *Int J Pharm*. 7 de febrero de 2007;330(1):14-22.
116. Mayhew E, Ito M, Lazo R. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. *Exp Cell Res*. 1 de julio de 1987;171(1):195-202.
117. Silva CMG da, Franz-Montan M, Limia CEG, Ribeiro LN de M, Braga MA, Guilherme VA, et al. Encapsulation of ropivacaine in a combined (donor-acceptor, ionic-gradient) liposomal system promotes extended anesthesia time. *PLOS ONE*. 5 de octubre de 2017;12(10):e0185828.
118. Lau KG, Hattori Y, Chopra S, O'Toole EA, Storey A, Nagai T, et al. Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines. *Int J Pharm*. 26 de agosto de 2005;300(1):4-12.
119. Fens MHAM, Hill KJ, Issa J, Ashton SE, Westwood FR, Blakey DC, et al. Liposomal encapsulation enhances the antitumour efficacy of the vascular disrupting agent ZD6126 in murine B16.F10 melanoma. *Br J Cancer*. 21 de octubre de 2008;99(8):1256-64.
120. Chiong HS, Yong YK, Ahmad Z, Sulaiman MR, Zakaria ZA, Yuen KH, et al. Cytoprotective and enhanced anti-inflammatory activities of liposomal piroxicam formulation in lipopolysaccharide-

stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1245-55.

121. Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-las-Heras B, Herrero-Vanrell R, et al. Design and Characterization of an Ocular Topical Liposomal Preparation to Replenish the Lipids of the Tear Film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 5 de diciembre de 2014;55(12):7839-47.

122. Bardania H, Shojaosadati SA, Kobarfard F, Morshedi D, Aliakbari F, Tahoori MT, et al. RGD-Modified Nano-Liposomes Encapsulated Eptifibatide with Proper Hemocompatibility and Cytotoxicity Effect. *Iran J Biotechnol*. 20 de abril de 2019;17(2):e2008.

123. Rashidi M, Ahmadzadeh A, Ziai SA, Narenji M, Jamshidi H. Evaluating cytotoxic effect of nanoliposomes encapsulated with umbelliprenin on 4T1 cell line. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 1 de enero de 2017;53(1):7-11.

124. Abud MB, Louzada RN, Isaac DLC, Souza LG, dos Reis RG, Lima EM, et al. In vivo and in vitro toxicity evaluation of liposome-encapsulated sirolimus. *Int J Retina Vitro*. 24 de septiembre de 2019;5(1):35.

125. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater*. 8 de mayo de 2014;5(2):43-57.

126. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicol In Vitro*. 1 de marzo de

2015;29(2):314-9.

127. Enfermedades autoinmunes [Internet]. 2015 [citado 17 de junio de 2015]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/autoimmunediseases.html>

128. Ferrándiz C, Carrascosa JM, Toro M. Prevalencia de la psoriasis en España en la era de los agentes biológicos. Actas Dermo-Sifiliográficas. junio de 2014;105(5):504-9.

129. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. Clin Dermatol. diciembre de 2007;25(6):535-46.

130. Musa SH, Basri M, Fard Masoumi HR, Shamsudin N, Salim N. Enhancement of physicochemical properties of nanocolloidal carrier loaded with cyclosporine for topical treatment of psoriasis: in vitro diffusion and in vivo hydrating action. Int J Nanomedicine. 28 de marzo de 2017;12:2427-41.

131. Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. agosto de 2014 [citado 25 de junio de 2019];4(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109580/>

132. A. H, Ghaus M. Pathophysiology of Psoriasis: Current Concepts. En: Lima H, editor. Psoriasis - Types, Causes and Medication [Internet]. InTech; 2013 [citado 17 de junio de 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/psoriasis-types-causes-and-medication/pathophysiology-of-psoriasis-current-concepts>

133. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. The Lancet [Internet]. 15 de junio de 2015 [citado 15 de junio de 2015]; Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614619097>

134. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000prime Rep.* 2014;6:4.

135. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *The Lancet* [Internet]. [citado 15 de junio de 2015]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614619097>

136. Williams HC. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med.* 2 de junio de 2005;352(22):2314-24.

137. McAleer MA, Flohr C, Irvine AD. Management of difficult and severe eczema in childhood. *The BMJ.* 23 de julio de 2012;345:e4770.

138. Ko KC, Tominaga M, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, et al. Possible Antipruritic Mechanism of Cyclosporine A in Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 15 de junio de 2016;96(5):624-9.

139. Cabanillas-Becerra, J, Sánchez-Saldaña, L. Dermatitis atópica. *Dermatol peru.* julio de 2012;22(3):176-86.

140. Cipriani F, Ricci G, Leoni MC, Capra L, Baviera G, Longo G, et al. Autoimmunity in atopic dermatitis: biomarker or simply epiphenomenon? *J Dermatol.* julio de 2014;41(7):569-76.

141. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol.* julio de 2017;66(3):398-403.

142. Rerknimitr P, Otsuka A, Nakashima C, Kabashima K. The etiopathogenesis of atopic dermatitis: barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. *Inflamm Regen* [Internet]. 5 de junio de 2017 [citado 4 de marzo de 2020];37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725646/>
143. Warren RB, Griffiths CEM. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin Dermatol*. septiembre de 2008;26(5):438-47.
144. Berth-Jones J. The use of ciclosporin in psoriasis. *J Dermatol Treat*. 2005;16(5-6):258-77.
145. Lebwohl M, Ellis C, Gottlieb A, Koo J, Krueger G, Linden K, et al. Cyclosporine consensus conference: With emphasis on the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. septiembre de 1998;39(3):464-75.
146. Leal Canosa L, Ribera Pibernat M. Aplicaciones terapéuticas de la ciclosporina además de en la psoriasis. *Piel*. octubre de 2007;22(8):408-16.
147. Ciclosporina y su uso en dermatología - PDF [Internet]. [citado 25 de junio de 2019]. Disponible en: <https://docplayer.es/5195751-Ciclosporina-y-su-uso-en-dermatologia.html>
148. Rosmarin DM, Lebwohl M, Elewski BE, Gottlieb AB. Cyclosporine and psoriasis: 2008 National Psoriasis Foundation* Consensus Conference. *J Am Acad Dermatol*. mayo de 2010;62(5):838-53.
149. Otsuka A, Tanioka M, Nakagawa Y, Honda T, Ikoma A,

Miyachi Y, et al. Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol EJD*. octubre de 2011;21(5):816-7.

150. Archer TM, Boothe DM, Langston VC, Fellman CL, Lunsford KV, Mackin AJ. Oral cyclosporine treatment in dogs: a review of the literature. *J Vet Intern Med*. febrero de 2014;28(1):1-20.

151. Solomon B, Sahle FF, Gebre-Mariam T, Asres K, Neubert RHH. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: formulation and in vitro permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. enero de 2012;80(1):61-6.

152. McElwee KJ, Sinclair R. Hair physiology and its disorders. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):e163-71.

153. Lademann J, Knorr F, Richter H, Blume-Peytavi U, Vogt A, Antoniou C, et al. Hair follicles--an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charité -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(3):150-5.

154. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, et al. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. febrero de 2007;13(1):19-24.

155. Burckart GJ, Venkataramanan R, Ptachcinski RJ, Starzl TE, Griffith BP, Hakala TR, et al. Cyclosporine Pharmacokinetic Profiles in

Liver, Heart, and Kidney Transplant Patients as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Transplant Proc.* diciembre de 1986;18(6 Suppl 5):129-36.

156. Guo J, Ping Q, Chen Y. Pharmacokinetic behavior of cyclosporin A in rabbits by oral administration of lecithin vesicle and Sandimmun Neoral. *Int J Pharm.* 23 de marzo de 2001;216(1-2):17-21.

157. Wang A, Ahmad A, Ullah S, Cheng L, Ke L, Yuan Q. A Cheap and Convenient Method of Liposome Preparation Using Glass Beads as a Source of Shear Force. *AAPS PharmSciTech.* noviembre de 2017;18(8):3227-35.

158. Peyret A, Ibarboure E, Pippa N, Lecommandoux S. Liposomes in Polymersomes: Multicompartment System with Temperature-Triggered Release. *Langmuir.* 18 de julio de 2017;33(28):7079-85.

159. Isailović BD, Kostić IT, Zvonar A, Đorđević VB, Gašperlin M, Nedović VA, et al. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innov Food Sci Emerg Technol.* julio de 2013;19:181-9.

160. Subongkot T, Wonglertnirant N, Songprakhon P, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm.* 30 de enero de 2013;441(1-2):151-61.

161. Malinovskaja-Gomez K, Espuelas S, Garrido MJ, Hirvonen J, Laaksonen T. Comparison of liposomal drug formulations for transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 30 de agosto de 2017;106:294-301.

162. Shen LN, Zhang YT, Wang Q, Xu L, Feng NP. Enhanced in vitro and in vivo skin deposition of apigenin delivered using ethosomes. *Int J Pharm.* 2 de enero de 2014;460(1-2):280-8.
163. Yamaguchi T, Nomura M, Matsuoka T, Koda S. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. *Chem Phys Lipids.* julio de 2009;160(1):58-62.
164. Tanrıverdi ST, Özer Ö. Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 12 de marzo de 2013;48(4-5):628-36.
165. Alomrani AH, Shazly GA, Amara AA, Badran MM. Itraconazole-hydroxypropyl- β -cyclodextrin loaded deformable liposomes: in vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de septiembre de 2014;121:74-81.
166. Sabeti B, Noordin MI, Mohd S, Hashim R, Dahlan A, Akbari Javar H. Development and Characterization of Liposomal Doxorubicin Hydrochloride with Palm Oil [Internet]. *BioMed Research International.* 2014 [citado 21 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/765426/abs/>
167. Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials.* septiembre de 2000;21(18):1879-85.
168. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids.* mayo de

1970;5(5):494-6.

169. Baxa U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1682:73-88.

170. Flexible Nanosomes (SECosomes) Enable Efficient siRNA Delivery in Cultured Primary Skin Cells and in the Viable Epidermis of Ex Vivo Human Skin - Geusens - 2010 - *Advanced Functional Materials - Wiley Online Library* [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.201000484>

171. Zhou W, Liu W, Zou L, Liu W, Liu C, Liang R, et al. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 de mayo de 2014;117:330-7.

172. Caddeo C, Díez-Sales O, Pons R, Carbone C, Ennas G, Puglisi G, et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. *J Colloid Interface Sci*. 1 de enero de 2016;461:69-78.

173. Stark B, Pabst G, Prassl R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 20 de noviembre de 2010;41(3-4):546-55.

174. Chen C, Han D, Cai C, Tang X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 19 de marzo de 2010;142(3):299-311.

175. Escobar-Chávez JJ, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M,

Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm.* 2008;11(1):104-30.

176. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, et al. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol.* agosto de 2005;125(2):264-9.

177. Dreher F, Arens A, Hostýnek JJ, Mudumba S, Ademola J, Maibach HI. Colorimetric method for quantifying human Stratum corneum removed by adhesive-tape stripping. *Acta Derm Venereol.* mayo de 1998;78(3):186-9.

178. Raber AS, Mittal A, Schäfer J, Bakowsky U, Reichrath J, Vogt T, et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J Controlled Release.* 10 de abril de 2014;179:25-32.

179. Kligman AM, Christophers E. PREPARATION OF ISOLATED SHEETS OF HUMAN STRATUM CORNEUM. *Arch Dermatol.* diciembre de 1963;88:702-5.

180. Hansen S, Henning A, Naegel A, Heisig M, Wittum G, Neumann D, et al. In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part I: Experimental determination of partition and diffusion coefficients. *Eur J Pharm Biopharm.* febrero de 2008;68(2):352-67.

181. Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM.

Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2 de marzo de 2005;103(1):123-36.

182. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech.* 15 de septiembre de 2010;11(3):1432-41.

183. Zhang Q, Li P, Roberts MS. Maximum transepidermal flux for similar size phenolic compounds is enhanced by solvent uptake into the skin. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 25 de agosto de 2011;154(1):50-7.

184. Hinna A, Steiniger F, Hupfeld S, Stein P, Kuntsche J, Brandl M. Filter-extruded liposomes revisited: a study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. *J Liposome Res.* 2016;26(1):11-20.

185. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm.* 26 de agosto de 1997;154(2):123-40.

186. Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 19 de octubre de 1979;557(1):9-23.

187. Silva R, Ferreira H, Little C, Cavaco-Paulo A. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrason Sonochem.* marzo de 2010;17(3):628-32.

188. Castoldi A, Herr C, Niederstraßer J, Labouta HI, Melero A,

Gordon S, et al. Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* septiembre de 2017;118:62-7.

189. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [Internet]. 18 de mayo de 2018 [citado 30 de diciembre de 2020];10(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027495/>

190. Chen M, Liu X, Fahr A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm.* 15 de abril de 2011;408(1-2):223-34.

191. Putri DCA, Dwiastuti R, Marchaban M, Nugroho AK. OPTIMIZATION OF MIXING TEMPERATURE AND SONICATION DURATION IN LIPOSOME PREPARATION. *J Farm Sains Dan Komunitas J Pharm Sci Community.* 30 de noviembre de 2017;14(2):79-85.

192. Badran M. Formulation and in vitro evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposomes for improved skin delivery. *Dig J Nanomater Biostructures.* 1 de enero de 2014;9:83-91.

193. Abdulbaqi IM, Darwis Y, Assi RA, Khan NAK. Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: statistical optimization, characterization, and ex vivo

evaluation. *Drug Des Devel Ther.* 9 de abril de 2018;12:795-813.

194. Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *J Drug Target.* 1 de diciembre de 2012;20(10):813-30.

195. Duangjit S, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. Characterization and In Vitro Skin Permeation of Meloxicam-Loaded Liposomes versus Transfersomes. *J Drug Deliv.* 2011;2011:418316.

196. Jain S, Jain P, Umamaheshwari RB, Jain NK. Transfersomes--a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* octubre de 2003;29(9):1013-26.

197. Dubey V, Mishra D, Nahar M, Jain V, Jain NK. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* agosto de 2010;6(4):590-6.

198. Aggarwal N, Goindi S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*--dermatophytosis. *Int J Pharm.* 1 de noviembre de 2012;437(1-2):277-87.

199. Alavi M, Karimi N, Safaei M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Adv Pharm Bull.* abril de 2017;7(1):3-9.

200. Emami S, Azadmard-Damirchi S, Peighambardoust SH, Valizadeh H, Hesari J. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J Exp Nanosci.* 12 de junio de 2016;11(9):737-59.

201. Khale A. Lipid characterization study in preparation of liposomes of salbutamol sulphate. *J Pharm Res.* 2011;4(4):1267-9.
202. Vemuri S, Yu CD, Degroot JS, Wangsatornthnakun V, Venkataram S. Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes. *Drug Dev Ind Pharm.* 1 de enero de 1991;17(3):327-48.
203. Garvey CJ, Lenné T, Koster KL, Kent B, Bryant G. Phospholipid Membrane Protection by Sugar Molecules during Dehydration—Insights into Molecular Mechanisms Using Scattering Techniques. *Int J Mol Sci.* 12 de abril de 2013;14(4):8148-63.
204. Mönkkönen J, Valjakka R, Hakasalo M, Urtti A. The effects of liposome surface charge and size on the intracellular delivery of clodronate and gallium in vitro. *Int J Pharm.* 11 de julio de 1994;107(3):189-97.
205. Willian Enrique Tapia Ramírez. Desarrollo de sistemas liposomales de ciclosporina A para administración cutánea [Tesis de Máster Investigación y Uso Racional del Medicamento]. [Departamento de Farmacia Y Tecnología Farmacéutica]: Universitat de Valencia; 2014.
206. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 27 de marzo de 2004;56(5):603-18.
207. Maheshwari RGS, Tekade RK, Sharma PA, Darwhekar G, Tyagi A, Patel RP, et al. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. *Saudi Pharm J.* abril de 2012;20(2):161-70.

208. Dreier J, Sørensen JA, Brewer JR. Superresolution and Fluorescence Dynamics Evidence Reveal That Intact Liposomes Do Not Cross the Human Skin Barrier. *PloS One*. 2016;11(1):e0146514.
209. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*. junio de 2000;9(3):165-9.
210. Kumar R, Dogra S, Amarji B, Singh B, Kumar S, Sharma null, et al. Efficacy of Novel Topical Liposomal Formulation of Cyclosporine in Mild to Moderate Stable Plaque Psoriasis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 01 de 2016;152(7):807-15.
211. Bragagni M, Mennini N, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib. *Drug Deliv*. octubre de 2012;19(7):354-61.
212. Guo J, Ping Q, Sun G, Jiao C. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm*. 25 de enero de 2000;194(2):201-7.
213. Romero EL, Morilla MJ. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3171-86.
214. Jain S, Umamaheshwari RB, Bhadra D, Jain NK. Ethosomes : A Novel Vesicular Carrier For Enhanced Transdermal Delivery Of An AntiHIV Agent. *Indian J Pharm Sci*. 2004;66(1):72.
215. Liu H, Li S, Wang Y, Yao H, Zhang Y. Effect of vehicles and

enhancers on the topical delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm.* 27 de marzo de 2006;311(1-2):182-6.

216. Verma DD, Fahr A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 31 de mayo de 2004;97(1):55-66.

217. Benigni M, Pescina S, Grimaudo MA, Padula C, Santi P, Nicoli S. Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery. *Int J Pharm.* 10 de julio de 2018;545(1-2):197-205.

218. Alvarez-Figueroa MJ, Abarca-Riquelme JM, González-Aramundiz JV. Influence of protamine shell on nanoemulsions as a carrier for cyclosporine-A skin delivery. *Pharm Dev Technol.* junio de 2019;24(5):630-8.

219. Hussain A, Haque MW, Singh SK, Ahmed FJ. Optimized permeation enhancer for topical delivery of 5-fluorouracil-loaded elastic liposome using Design Expert: part II. *Drug Deliv.* mayo de 2016;23(4):1242-53.

220. Saoji SD, Atram SC, Dhore PW, Deole PS, Raut NA, Dave VS. Influence of the Component Excipients on the Quality and Functionality of a Transdermal Film Formulation. *AAPS PharmSciTech.* diciembre de 2015;16(6):1344-56.

221. Soriano M, Contreras M, Flores E. Development of a cream from a self-emulsifying base and moisturizing actives. *Farm Soc Chim Ital* 1989. 1 de julio de 2001;56:513-22.

222. Schramm G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. Gebrueder Haake; 1994. 316 p.
223. Di Mambro VM, Fonseca MJV. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. J Pharm Biomed Anal. 23 de febrero de 2005;37(2):287-95.
224. Lucero MJ, García J, Vigo J, León MJ. A rheological study of semisolid preparations of Eudragit ®. Int J Pharm. 14 de marzo de 1995;116(1):31-7.
225. Milan ALK, Milão D, Souto AA, Corte TWF. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. Rev Bras Ciênc Farm. diciembre de 2007;43(4):649-57.
226. Tokumoto S, Hirai S. Deformation Modeling of Rheological Objects for Their Shape Control. 2000;
227. Shawesh A, Kallioinen S, Hellén L, Antikainen O, Yliruusi J. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical formulations of indomethacin and rheological behaviour of these formulations. Pharm. marzo de 2002;57(3):186-90.
228. Martin AN. Physical pharmacy : physical chemical principles in the pharmaceutical sciences /. Philadelphia (Pa.): Lea & Febiger,; 1993.
229. Navarro RF. Fundamentos de reologia de polímeros. EDUCS; 1997. 264 p.
230. Colo SM, Herh PKW, Roye N, Larsson M. Rheology and the

texture of pharmaceutical and cosmetic semisolids. Am Lab. 1 de noviembre de 2004;36:26-30.

231. Domenech J, Martínez J, Peraire C. Tratado General de Biofarmacia y Farmacocinética, Vol. 1 [Internet]. Vol. 1. Barcelona: Síntesis; 2013. 702 p. Disponible en: <https://axon.es/ficha/libros/9788499589527/tratado-general-de-biofarmacia-y-farmacocinetica-vol-1>

232. Generalidades sobre la enfermedad inflamatoria intestinal - Trastornos gastrointestinales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 9 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-gastrointestinales/enfermedad-inflamatoria-intestinal-ibd/generalidades-sobre-la-enfermedad-inflamatoria-intestinal>

233. Enfermedad intestinal inflamatoria - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. [citado 10 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/inflammatory-bowel-disease/symptoms-causes/syc-20353315>

234. Ficha: ¿Qué es la enfermedad inflamatoria intestinal? - Fistera [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.fistera.com/ayuda-en-consulta/informacion-para-pacientes/enfermedad-inflamatoria-intestinal/>

235. Colitis ulcerosa - Trastornos gastrointestinales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 9 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-gastrointestinales/enfermedad-inflamatoria->

intestinal-ibd/colitis-ulcerosa

236. Enfermedad de Crohn - Trastornos gastrointestinales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 9 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-gastrointestinales/enfermedad-inflamatoria-intestinal-ibd/enfermedad-de-crohn>

237. Guía clínica de Colitis ulcerosa - Fisterra [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.fisterra.com/guias-clinicas/colitis-ulcerosa/>

238. Liu QF, Li Y, Zhao QH, Wang ZY, Hu S, Yang CQ, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with susceptibility to inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 1 de octubre de 2015;39(5):627-36.

239. Nakase H, Uchino M, Shinzaki S, Matsuura M, Matsuoka K, Kobayashi T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease 2020. *J Gastroenterol*. 1 de junio de 2021;56(6):489-526.

240. Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, Fried M, Geary R, Goh KL, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease: Update August 2015. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(10):803-18.

241. Chaparro M, Barreiro-de Acosta M, Benítez JM, Cabriada JL, Casanova MJ, Ceballos D, et al. EpidemIBD: rationale and design of a large-scale epidemiological study of inflammatory bowel disease in Spain. *Ther Adv Gastroenterol*. 21 de mayo de

2019;12:1756284819847034.

242. Guía clínica de Enfermedad de Crohn - Fisterra [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.fisterra.com/guias-clinicas/enfermedad-crohn/>

243. Fármacos para la enfermedad inflamatoria intestinal - Trastornos gastrointestinales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 9 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-gastrointestinales/enfermedad-inflamatoria-intestinal-ibd/f%C3%A1rmacos-para-la-enfermedad-inflamatoria-intestinal>

244. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1 de febrero de 2000;118(2):S68-82.

245. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Controlled Release*. 11 de febrero de 2008;125(3):193-209.

246. Ali H, Weigmann B, Neurath MF, Collnot EM, Windbergs M, Lehr CM. Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 de junio de 2014;183:167-77.

247. Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm Res*. junio de 2001;18(6):788-93.

248. Schmidt C, Lautenschlaeger C, Collnot EM, Schumann M, Bojarski C, Schulzke JD, et al. Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa: a first in vivo study in human patients. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 de enero de 2013;165(2):139-45.
249. Belouqui A, Coco R, Memvanga PB, Ucakar B, des Rieux A, Pr at V. pH-sensitive nanoparticles for colonic delivery of curcumin in inflammatory bowel disease. *Int J Pharm.* 1 de octubre de 2014;473(1-2):203-12.
250. Dvorak AM, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. I. Barrier function. Possible changes related to alterations of cell coat, mucous coat, epithelial cells, and Paneth cells. *Hum Pathol.* septiembre de 1980;11(5 Suppl):561-71.
251. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* marzo de 2007;56(3):343-50.
252. Laroui H, Dalmasso G, Nguyen HTT, Yan Y, Sitaraman SV, Merlin D. Drug-loaded nanoparticles targeted to the colon with polysaccharide hydrogel reduce colitis in a mouse model. *Gastroenterology.* marzo de 2010;138(3):843-853.e1-2.
253. Xiao B, Laroui H, Viennois E, Ayyadurai S, Charania MA, Zhang Y, et al. Nanoparticles with surface antibody against CD98 and carrying CD98 small interfering RNA reduce colitis in mice. *Gastroenterology.* mayo de 2014;146(5):1289-1300.e1-19.

254. Coco R, Plapied L, Pourcelle V, Jérôme C, Brayden DJ, Schneider YJ, et al. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: comparison of different strategies. *Int J Pharm.* 2 de enero de 2013;440(1):3-12.
255. Niebel W, Walkenbach K, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Nanoparticle-based clodronate delivery mitigates murine experimental colitis. *J Controlled Release.* 28 de junio de 2012;160(3):659-65.
256. Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm.* 14 de abril de 2003;255(1):13-32.
257. Kietzmann D, Moulari B, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Colonic delivery of carboxyfluorescein by pH-sensitive microspheres in experimental colitis. *Eur J Pharm Biopharm.* 1 de octubre de 2010;76(2):290-5.
258. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 11 de junio de 2001;48(2):173-93.
259. Gamboa JM, Leong KW. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 de junio de 2013;65(6):800-10.
260. Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. Nanoparticles Enhance Therapeutic Efficiency by Selectively Increased Local Drug Dose in Experimental Colitis in Rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 de octubre de 2005;315(1):196-202.

261. Ravi Kumar MNV, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*. 1 de mayo de 2004;25(10):1771-7.
262. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *Int J Pharm*. 30 de agosto de 2011;415(1):34-52.
263. Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst* [Internet]. 2004 [citado 3 de diciembre de 2022];21(5). Disponible en: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/3667c4ae6e8fd136,3531fe42318c587e,108d6b8570af47da.html>
264. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammouy N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1 de octubre de 1989;55(1):R1-4.
265. Arpagaus C, Collenberg A, Rütli D, Assadpour E, Jafari SM. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 30 de julio de 2018;546(1):194-214.
266. Kimura T, Higaki K. Gastrointestinal transit and drug absorption. *Biol Pharm Bull*. febrero de 2002;25(2):149-64.
267. Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*. 25 de septiembre de 2011;68(22):3635.
268. Díaz-Casasola L. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y

efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. Enfoques fisiológico y bioquímico. *Rev Med E Investig.* 1 de enero de 2015;3(1):100-3.

269. Bushnak IA, Labeed FH, Sear RP, Keddie JL. Adhesion of microorganisms to bovine submaxillary mucin coatings: effect of coating deposition conditions. *Biofouling.* 1 de mayo de 2010;26(4):387-97.

270. Avenoza A, Busto J, Corzana F, Peregrina J. Nuevas aportaciones al estudio estructural de glicopéptidos. *An Real Soc Esp Quím* ISSN 1575-3417 N° 1 2008 Pags 23-30. 1 de enero de 2008;

271. ¡Conoce a las mucinas! La gran muralla intestinal [Internet]. *Sruk.* 2019 [citado 10 de junio de 2020]. Disponible en: <https://sruk.org.uk/es/conoce-a-las-mucinas-la-gran-muralla-intestinal/>

272. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* julio de 2014;260(1):8-20.

273. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* octubre de 1969;58(10):1196-200.

274. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5280754, Cyclosporine. [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280754>

275. FICHA TECNICA SANDIMMUN NEORAL 50 mg CAPSULAS BLANDAS [Internet]. [citado 19 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/60318/FT_60318.html#5-propiedades-farmacologicas
276. FICHA TECNICA SANDIMMUN 250 mg/5 ml CONCENTRADO PARA SOLUCION PARA PERFUSION [Internet]. [citado 19 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/56798/FT_56798.html
277. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res.* mayo de 1990;7(5):435-51.
278. Hu M, Chen J, Tran D, Zhu Y, Leonardo G. The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro. *J Drug Target.* 1994;2(1):79-89.
279. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* marzo de 1989;96(3):736-49.
280. Park MS, Chung JW, Kim YK, Chung SC, Kho HS. Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva. *Oral Dis.* marzo de 2007;13(2):181-6.
281. Miner-Williams W, Moughan PJ, Fuller MF. Methods for mucin analysis: a comparative study. *J Agric Food Chem.* 22 de julio de 2009;57(14):6029-35.

282. Miner-Williams WM, Moughan PJ, Fuller MF. Analysis of an ethanol precipitate from ileal digesta: evaluation of a method to determine mucin. *Sci Rep* [Internet]. 6 de noviembre de 2013 [citado 1 de diciembre de 2020];3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6505962/>
283. Piel C, Montagne L, Salgado P, Lallès JP. Estimation of ileal output of gastro-intestinal glycoprotein in weaned piglets using three different methods. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(5):419-35.
284. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. *Powder Technol*. 24 de enero de 2000;107:137-43.
285. Martín-Villodre A, Plá-Delfina J, Moreno J, Pérez-Buendía D, Miralles J, Collado E, et al. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I. Ring-substituted anilines. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1 de enero de 1987;14:615-33.
286. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol*. 1 de enero de 2008;60(1):63-70.
287. McConnell EL, Liu F, Basit AW. Colonic treatments and targets: issues and opportunities. *J Drug Target*. 1 de junio de 2009;17(5):335-63.
288. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts:

Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm.* 8 de diciembre de 2008;364(2):213-26.

289. Swartz ME. *Analytical Method Development and Validation.* Taylor & Francis Group; 1997. 92 p.

290. Melero A, Draheim C, Hansen S, Giner E, Carreras JJ, Talens-Visconti R, et al. Targeted delivery of Cyclosporine A by polymeric nanocarriers improves the therapy of inflammatory bowel disease in a relevant mouse model. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* octubre de 2017;119:361-71.

291. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther.* noviembre de 2001;299(2):775-81.

A_{nexo} I.

Abreviaturas

CDF	Célula estática vertical de difusión tipo Franz
CU	Colitis ulcerosa
CyA	Cliclosporina A
d	Diámetro hidrodinámico
DA	Dermatitis atópica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DS	Desviación estándar
DSS	Dextrano sulfato sódico
EC	Enfermedad de Crohn
EE	Eficacia de encapsulación
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMA	European Medicines Agency (Agencia Europea del Medicamento)
EXT	Extruido
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FP	Folículos pilosos
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
	Conferencia Internacional sobre Armonización de
ICH	Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano
Ka	Constante de absorción
Kads	Constante de adsorción al moco
Kp	Coeficiente de permeabilidad
λ	Longitud de onda
LD	Límite de detección
LDH	Lactato deshidrogenasa
LQ	Límite de cuantificación
LUV	Vesículas unilamelares grandes
ml/min	mililitros por minuto

- MLV** Vesículas multilamelares
- MP** Micropartículas
- MTT** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NFAT** Factor de Activación Nuclear de las células T
- NP** Nanopartículas
- p/p** Peso/Peso
- p/v** Peso/Volumen
- PBS** Phosphate buffer saline (tampón fosfato salino)
- PC** Fosfatidilcolina
- PDI** Índice de polidispersión
- PLGA** Ácido poli(láctico-co-glicólico)
- PM** Peso molecular
- PVA** Alcohol polivinílico
- SC** Estrato córneo
- SCSIE** Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental
- SEM** Microscopía electrónica de barrido
- SGF** Fluido gástrico simulado
- SLC** Sistema Liposomal Convencional
- SLE** Sistema Liposomal Etosoma
- SLT** Sistema Liposomal Transfersoma
- SON** Sonicado
- SUV** Vesículas unilamelares pequeñas
- TEER** Resistencia eléctrica Transepitelial
- TEM** Microscopio de transmisión electrónica
- Th2** linfocitos T cooperadores de tipo 2
- t_r** Tiempo de retención
- v/v** Volumen/Volumen

A_{nexo} II.

Autorizaciones de protocolos experimentales

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 8 de noviembre de 2013, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

"Evaluación percutánea de fármacos aplicables en formulaciones dermocosméticas", número de procedimiento H1381683846659, cuya investigadora responsable es Dña. Teresa M^o Garrigues Pelufo,

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a once de noviembre de dos mil trece.



FERNANDO ALEJO|
VERDU|PASCUAL
2013.11.11 09:30:07
+01'00'



GENERALITAT VALENCIANA

CONSELLERIA DE PRESIDENCIA Y AGRICULTURA,
PESCA, ALIMENTACIÓN Y AGUA



Unión Europea

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeañas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014 / 039 / UVEG / 003

Vista la solicitud realizada en fecha 2 de abril de 2014 con nº reg. entrada 5779 por D. Pedro M. Carrasco Sorlí Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universidad de Valencia, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Nanopartículas ciclosporina-PLGA para tratamiento de enfermedad inflamatoria: estudios in vitro e in situ."

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2014/039/UVEG/003 tipo 2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Ana Melero Zaera**

Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCSIE (Campus de Burjassot)**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 30 de abril de 2014

El director general de Producción Agraria y Ganadería

José Miguel Ferrer Arrainz

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00216

Vista la solicitud realizada en fecha 21/11/16 con nº reg. entrada 29733 por D/Dª. Pilar Campins Falcó, Vicirectora de Investigación i Política Científica, centro usuario ES460780001001, para realizar el procedimiento:

"Estudios de mucoadhesión de nano partículas poliméricas de administración de fármacos"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2016/VSC/PEA/00216 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de Valencia

Responsable del proyecto: Ana Melero Zaera

Establecimiento: Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de diciembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca


Regorio Llanas Ribas