



**TESIS DOCTORAL**

---

**DISEÑO DE SISTEMAS NANOPARTICULARES  
LIPÍDICOS PARA CO-ADMINISTRACIÓN DE  
TEOFILINA Y CIPROFLOXACINO EN EL  
TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA**

**María Oliva Guerra Morillo**

**Sevilla, 2019**





FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 67 26  
E-mail: galenica@us.es  
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Oliva Guerra Morillo para optar al Título de  
Doctora en Farmacia por la Universidad de Sevilla

Fdo.: M<sup>a</sup> Oliva Guerra Morillo

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

Los directores del trabajo

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Luisa González Rodríguez  
Doctora en Farmacia  
Catedrática de Universidad  
Departamento de Farmacia y Tecnología  
Farmacéutica

Fdo.: Dr. Antonio M. Rabasco Álvarez  
Doctor en Farmacia  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Farmacia y Tecnología  
Farmacéutica

Fdo.: M<sup>a</sup> José Cózar Bernal  
Doctora en Farmacia  
Directora Técnica  
Laboratorios Air Products



FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 67 26  
E-mail: galenica@us.es  
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Doctora en Farmacia, Catedrática de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, ANTONIO MARÍA RABASCO ÁLVAREZ, Doctor en Farmacia, Catedrático de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, y MARÍA JOSÉ CÓZAR BERNAL, Doctora en Farmacia por la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la memoria de investigación titulada “Diseño de sistemas nanoparticulares lipídicos para co-administración de teofilina y ciprofloxacino en el tratamiento de la fibrosis quística” elaborada por la Licenciada en Farmacia y Graduada en Nutrición y Dietética, Doña **M<sup>a</sup> Oliva Guerra Morillo**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarla.

Para que conste, y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, a trece de noviembre de dos mil diecinueve.

Fdo.: M.L. González Rodríguez

Fdo.: A.M. Rabasco Álvarez

Fdo.: M.J. Cózar Bernal



FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 67 26  
E-mail: galenica@us.es  
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRIGUEZ, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la memoria de investigación titulada “Diseño de sistemas nanoparticulares lipídicos para co-administración de teofilina y ciprofloxacino en el tratamiento de la fibrosis quística”, realizada por Doña **M<sup>a</sup> Oliva Guerra Morillo**, ha sido dirigida por los doctores Antonio María Rabasco Álvarez, M<sup>a</sup> José Cózar Bernal y la que suscribe, habiéndose realizado en este Departamento, cumpliendo con todas las normas vigentes.

Sevilla, a 13 de noviembre de 2019

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y  
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Fdo.: Dra. María Luisa González Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

Por fin veo la luz al final del túnel. Han sido cinco años difíciles en los que pensé en tirar la toalla más de una y de dos veces. Tardes interminables en el laboratorio en las que algún que otro aparato que todos conocemos nos ha dado algún “susto” y días en los que el ordenador no quería trabajar. Años llenos de buenos, pero también de malos momentos, por ello quiero agradecer a todas las personas que me han dado el aliento necesario para seguir adelante.

A mis directores, María Luisa González Rodríguez, Antonio María Rabasco Álvarez por estar siempre pendientes de mí y apoyarme para que no abandonase y María José Cózar Bernal, por la oportunidad que me han brindado formando parte de su grupo de investigación. Su dedicación y guía han sido fundamental para finalizar con éxito la tesis que tienen en sus manos. Gracias por la dedicación y todos los buenos momentos vividos.

A todos mis compañeros del grupo de investigación: Carmen, Elena, Nabila, Ana y Sergio, por acompañarme en todo momento en este camino, por estar ahí en los momentos de agobio y desazón, por ayudarme a extruir más de una vez, por las largas horas frente al HPLC y por los miles de momentos de risas vividos.

No olvido a aquellos compañeros con los que comenzó esta aventura: Fernando, Miguel, Mariló, Flavia y muchos otros que han ido pasando a lo largo de estos años: Ana Novak, David, Francesca. Gracias por amenizar esas interminables horas de laboratorio con conversaciones interesantes y por haber tenido la oportunidad de vivir esta experiencia con vosotros.

A todos los compañeros del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por todas las horas pasadas en sus instalaciones colaborando con el buen clima de trabajo y el compañerismo.

A la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad del Algarve, especial mención a la Profesora Ana Grenha y a Filipa, por su gran aportación en los estudios de cultivos celulares. Gracias por aportar vuestros conocimientos y por el interés mostrado en este proyecto.

A mis padres, Juan y M<sup>a</sup> Antonia, y a mi hermano Juan Carlos, por el apoyo incondicional en todo momento, por escucharme y animarme a seguir adelante en los momentos difíciles. Por enseñarme a ser constante en todos mis propósitos y por ayudarme a buscar el tiempo necesario para hacer mi trabajo.

A Diego, mi compañero de viaje, por apoyarme en todos mis proyectos por transmitirme su alegría y optimismo, por hacer fácil lo que parece imposible y por demostrarme que juntos podemos conseguir todo lo que nos propongamos. Gracias por estar siempre ahí.

Muchas gracias a todos por hacer posible que esta tesis llegue a su fin.



## ÍNDICE GENERAL

Resumen general.....	1
Abreviaturas.....	3
Introducción.....	7
Capítulo I .....	51
Capítulo II .....	127
Conclusiones generales .....	203



[Escriba aquí]

## RESUMEN GENERAL

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad causada por una mutación de un gen que codifica el canal clorhídrico transmembrana denominado regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR), que regula el transporte de aniones y aclaramiento mucociliar en las vías aéreas. Hoy en día, la esperanza de vida de esta patología es de aproximadamente 40 años. Los tratamientos de la enfermedad en la actualidad se basan en paliar la sintomatología, sobre todo de la enfermedad pulmonar derivada de ésta. Dentro de las vías para tratar estas manifestaciones, la vía pulmonar ha demostrado ser útil para la administración de fármacos, debido a su elevada área superficial ( $100\text{ m}^2$ ), su extensa vasculatura y, por tanto, por su elevada capacidad de absorción.

Entre los fármacos que podrían aportar utilidad en el control de algunas de las manifestaciones clínicas de la FQ, se encuentran Teofilina y Ciprofloxacino, por su actividad broncodilatadora y antimicrobiana, respectivamente. Teniendo en cuenta que su mecanismo de acción sinérgico podría beneficiar al transcurso de la enfermedad, y que su inclusión en sistemas nanoparticulares lipídicos podría repercutir en una mejora de la liberación local a nivel pulmonar con la posible reducción de dosis a administrar, se plantea como Objetivo Principal de la Tesis diseñar y desarrollar liposomas como sistemas lipídicos compatibles con el surfactante pulmonar, que incluyan ambos fármacos, para posteriormente hacer una evaluación in vitro de la eficacia de estas formulaciones mediante la puesta a punto de un dispositivo *Twin Impinger* en el laboratorio.

En el **Capítulo I** de la presente memoria se propuso poner a punto la técnica del gradiente transmembrana como método de encapsulación de bases y ácidos débiles anfipáticos, donde se incluirían los fármacos teofilina y ciprofloxacino. Para ello, se puso en evidencia, en primer lugar, la generación de este gradiente mediante la medida de la conductividad y del cambio de pH. A continuación, se estudió la influencia de ciertos factores sobre la eficacia del método para finalmente co-encapsular teofilina y ciprofloxacino, estudiando la viabilidad celular de los fármacos libres y encapsulados. Se concluyó que el método transmembrana fue útil para la encapsulación de este tipo de fármacos, describiendo las condiciones óptimas para el gradiente con acetato amónico. Asimismo, se observó que ciertas condiciones del proceso, como la temperatura, el pH, la naturaleza del fármaco, la concentración intraliposomal de sal y la naturaleza del solvente pueden modificar la eficacia de encapsulación y las características de las

vesículas. El método propuesto demostró ser más eficaz para la encapsulación de este tipo de fármacos que el método tradicional de elaboración TLE. El método transmembrana parece ofrecer resultados prometedores en términos de eficacia de encapsulación y estabilidad de las formulaciones siendo idóneo para la encapsulación conjunta de bases y ácidos débiles anfipáticos. En cuanto a los estudios de viabilidad celular, se sugiere que la encapsulación de los fármacos en los liposomas reduce la toxicidad de los fármacos libres. A las concentraciones a las que se prepararon las formulaciones liposomales (1 y 2 mg/mL) se produjo toxicidad a la que contribuyó también la concentración de fosfolípidos empleada. Ello condujo a la necesidad de emplear mayores ratio fármaco-lípido, concluyendo que la reducción en lípidos da lugar al mantenimiento de la eficacia de encapsulación, bajando la toxicidad de las formulaciones.

En el **Capítulo II** de la memoria presentada, con el fin de simular *in vitro* el acceso de estos fármacos a la vía pulmonar, se empleó un dispositivo *Twin Impinger* para su nebulización mediante un sistema nebulizador *Corineb*<sup>®</sup>, del cual se validó su funcionamiento con salbutamol comercial y salbutamol nebulizado, para posteriormente, repetir el proceso con soluciones de los fármacos teofilina y ciprofloxacino, encapsulados y co-encapsulados en liposomas. Además, se evaluó la influencia de la variación en la concentración en fosfolípidos sobre la eficacia de encapsulación y nebulización de las formulaciones. Los estudios realizados concluyeron que la puesta a punto del dispositivo *Twin Impinger* nos ha ayudado a comprender el comportamiento de nuestras formulaciones comparadas con salbutamol comercial, para ser administradas por vía pulmonar. La nebulización de las formulaciones y su posterior recogida de muestras en las cámaras de deposición del dispositivo para medir sus diferentes propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad, porcentaje de recuperación de los fármacos en ambos compartimentos y eficacia de nebulización), corroboran la conveniencia del dispositivo. Asimismo, tras realizar ensayos tanto a soluciones de teofilina y ciprofloxacino, como a formulaciones en liposomas conteniendo ambos fármacos, con diferentes proporciones de lípidos totales con los fármacos, se demostró que se mantienen sus propiedades físico-químicas y eficacias de encapsulación y nebulización. Las próximas investigaciones sobre esta enfermedad irán avanzando utilizando este dispositivo inhalador que ha demostrado su gran utilidad.

## ABREVIATURAS

ABPA: aspergilosis alérgica broncopulmonar  
ABT: azul de bromotimol  
ACN: acetonitrilo  
ACZ: acetazolamida  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AEMPS: Agencia española del medicamento y productos sanitarios  
ARN: ácido ribonucleico  
CFDR: Diabetes Mellitus relacionada con la Fibrosis Quística  
CFTR: regulador de la conductancia de la fibrosis transmembrana  
CH: colesterol  
CIP: ciprofloxacino  
 $C_{max}$ : concentración máxima  
CYP: citocromo P450  
Da: Dalton  
DCP: dicetil fosfato  
Deo-Na: desoxicolato sódico  
DLVO: teoría (Derjaguin, Landau, Vervey, Overbeek)  
DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco  
DM: Diabetes Mellitus  
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina  
DPPE: dipalmitoilfosfatidiletanolamina  
DSPC: diestearoilfosfatidilcolina  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EE: eficacia de encapsulación  
EEUU: Estados Unidos  
ENaC: canal epitelial de sodio  
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
FBS: suero fetal bovino  
FQ: fibrosis quística

$F_t$ : cantidad total del fármaco con el que se trabaja

GI: gastrointestinal

GUV: vesícula unilaminar gigante

HCl: ácido clorhídrico

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HSPC: fosfatidilcolina hidrolizada de soja

ICM<sub>90</sub>: concentración mínima necesaria para matar al 90% de una población (bacteriana)

IP: índice de polidispersión

IPS: inhaladores de polvo seco

ISO: Organización Internacional de Estandarización

IUPAC: Asociación Internacional de Química Pura y Aplicada

IV: intravenosa

LDH: lactato deshidrogenasa

LUV: vesículas unilaminares gigantes

MDI: inhaladores de cartucho presurizado

MET: metformina

MeOH: metanol

MLV: vesículas multilaminares

MTT: dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol.

NaCl: cloruro sódico

NaOH: hidróxido sódico

NLC: nanotransportadores lipídicos estructurados

PC: fosfatidilcolina

Pd: coeficiente de permeabilidad

PdE: porcentaje de encapsulación

PEG: polietilenglicol

PM: peso molecular

Q<sub>t</sub>: cantidad total de fármaco retenido en las vesículas

$r$ : coeficiente de correlación

RDS: desviación típica relativa

SDS: dodecilsulfato sódico

SP: proteína del surfactante

SUM: sumatriptán succinato

SUV: vesículas unilaminares pequeñas

TEO: teofilina

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformador beta

TIR: tripsinógeno inmunoreactivo

TLE: elaboración en capa fina

TR: tiempo de retención



# INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística consiste en un desorden genético causado por mutaciones en el gen CFTR que codifica una proteína encargada de regular la actividad de los canales de sodio y cloruro. Hay alrededor de 70000 casos alrededor del mundo, predominando en el continente europeo, donde aparece en 1 de cada 2000- 3000 nacimientos, considerándose una enfermedad rara. Su diagnóstico se encuentra instaurado desde hace tiempo, siendo la prueba del talón o cribado neonatal la más empleada. Cursa principalmente con retención de moco e infección crónica, así como con inflamación de las vías aéreas. Actualmente, la mayoría de tratamientos existentes para la fibrosis quística están diseñados para tratar sus síntomas, siendo la enfermedad pulmonar la más común y la que causa mayor morbi-mortalidad. Los sistemas nanoparticulares son una buena opción para encapsular principios activos en el tratamiento de esta enfermedad siendo idóneos para la administración pulmonar debido a su pequeño tamaño, su liberación sostenida y su elevada biocompatibilidad. Existen varios sistemas nanoparticulares para la liberación de fármacos por vía pulmonar para esta enfermedad. Sin embargo, la mayoría se componen de un único fármaco, encontrándose además en fase de estudio y siendo mayoritariamente antibióticos. En un futuro debe buscarse la co-encapsulación de fármacos que permita tratar tanto la sintomatología y como los defectos en el gen CFTR.





## ÍNDICE INTRODUCCIÓN GENERAL

1. CONCEPTO DE LA ENFERMEDAD .....	11
2. PAPEL DEL CANAL CFTR EN LA ENFERMEDAD .....	13
3. EPIDEMIOLOGÍA Y DEMOGRAFÍA DE LA ENFERMEDAD .....	15
4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD .....	16
4.1. Cribado prenatal .....	17
4.2. Cribado en recién nacidos.....	18
4.2.1. Confirmación de la enfermedad .....	18
5. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD .....	19
5.1. Manifestaciones desde la etapa uterina hasta la edad adulta de los diferentes síntomas .....	20
6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS POR SISTEMAS .....	23
6.1. Intestinales .....	23
6.2. Alteraciones en las glándulas sudoríparas .....	26
6.3. Ausencia de conductos deferentes .....	26
6.4. Enfermedad pulmonar .....	26
7. MANEJO Y CONSIDERACIONES SOBRE LA ENFERMEDAD .....	28
7.1. Manejo de los síntomas gastrointestinales.....	29
7.2. Inmunización .....	30
7.3. Manejo de la enfermedad pulmonar .....	30
8. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....	32
8.1. Aparato respiratorio .....	32
8.2. Aparato gastrointestinal .....	33
8.3. Tratamiento actual y perspectivas futuras .....	34
9. AVANCES EN EL USO DE LIPOSOMAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA .....	35
10. CONCLUSIONES.....	40
11. BIBLIOGRAFÍA .....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mutaciones más frecuentes en la FQ con sus defectos y consecuencias.....	11
<b>Tabla 2.</b> Aparición de distintos síntomas de la FQ según el avance de la enfermedad .	16
<b>Tabla 3.</b> Relación entre el fenotipo, genotipo y la función CFTR en pacientes con FQ y en individuos sanos.....	17
<b>Tabla 4.</b> Manifestaciones clínicas y sintomatología de la fibrosis quística según diferentes grupos de edad. ....	19
<b>Tabla 5.</b> Estudios en los que se usan liposomas para tratar la FQ.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efectos de la disfunción CFTR. ....	13
<b>Figura 2.</b> Formación del biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y su crecimiento en el pulmón en pacientes que presentan FQ. ....	27
<b>Figura 3.</b> Encapsulación de fármacos para la FQ en liposomas. ....	35
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de Arikace® ..	37
<b>Figura 5.</b> Dispositivo Tobi® ..	38
<b>Figura 6.</b> Formulación de Pulmaquin® ..	39

## 1. CONCEPTO DE LA ENFERMEDAD

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad causada por la mutación de un gen que codifica el canal clorhídrico transmembrana llamado regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR), que regula el transporte de aniones y aclaramiento mucociliar en las vías aéreas (Rafeeq y Murad, 2017) .

El fallo funcional en el CFTR deriva en la retención de moco y en infección crónica y, subsecuentemente, en la inflamación de las vías aéreas, lo cual resulta perjudicial para los pulmones. La disfunción del gen RTFQ afecta principalmente a las células epiteliales, aunque existen evidencias de que las células inmunes juegan un papel importante (Zhang et al., 2018). El gen CFTR se localiza en 7q31.2. identificándose más de 1900 mutaciones de las cuales, ‘F508del’ (la delección de 3 bases que codifican fenilalanina en la posición 508) es la más común (Zhang et al., 2018). En la Tabla 1 se describen las seis mutaciones más comunes.

**Tabla 1.** Mutaciones más frecuentes en la FQ con sus defectos y consecuencias (adaptada de Rafeeq y Murad, 2017).

Clase de mutación	Defecto	Resultado	Mutación común
I	Producción de proteínas	Ausencia total de la proteína CFTR debido a una terminación temprana del ARNm	G542X, W1282X, R553X, 621+G>T
II	Procesamiento de proteínas	Incapacidad de la proteína de localizar el emplazamiento celular correcto debido a modificaciones anormales post-traslacionales	F508del, N1303K, A455E
III	Regulación de proteínas	Actividad disminuida de la proteína (canal de cloruro) en respuesta a anomalías en el plegado en las regiones centrales de la proteína	G551D
IV	Conducción de proteínas	Reducción de la frecuencia del flujo de iones y de la apertura del canal, aunque haya generación de corrientes de cloruro estimuladas por el AMPc	R117H
V	Reducción del CFTR funcional disponible	Estabilidad comprometida de ARNm y de la proteína madura	A455E
VI	Cantidad normal de CFTR funcional	Rotación aumentada debido a anomalías en la proteína C reactiva	Q1412X

Las mutaciones de clase I provocan la producción defectuosa de la proteína, lo que lleva a la completa ausencia de la proteína CFTR; ésta se encuentra en el 2-5% de la población mundial, con la excepción de los judíos Ashkenazi, en los que el 60% de los pacientes posee al menos una copia. Las mutaciones de clase II contribuyen a anomalías en el procesamiento de la proteína, lo que lleva a localizaciones aberrantes. La mutación más común es la F508, responsable del 70% de los casos en EEUU. Aproximadamente, el 50% de los pacientes son homocigóticos y el 90% son heterocigóticos para este alelo. Las mutaciones de clase III contribuyen a problemas en la regulación de las anomalías de la proteína, lo que lleva a un descenso de la actividad. También incluye otras mutaciones, especialmente en el dominio regulatorio G551D (esta es la mutación III más común). La mutación IV contribuye a anomalías en la conducción de proteínas, llegando a alterar el flujo iónico. La mutación más común es la R117H. Las mutaciones V llevan a la reducción de la proteína CFTR funcional y las de clase VI causan una sobreproducción de la proteína. Los pacientes que muestran las mutaciones I - III presentan manifestaciones más severas de la enfermedad. Sin embargo, la influencia de modificadores genéticos, como TGF-beta1 (factor de crecimiento transformador beta1) y la unión manosa-lecitina, hacen que no exista una combinación específica de mutaciones.

La FQ afecta a varios sistemas corporales, estando la morbi-mortalidad causada principalmente por bronquiectasias, pequeñas obstrucciones de las vías aéreas y discapacidad respiratoria progresiva (O'Grady et al., 2018). Aparte de éstas, ocurren alteraciones en otros órganos como el páncreas (malabsorción), hígado (cirrosis hepática), glándulas sudoríparas (golpe de calor) y otras, como infertilidad.

Existen equipos multidisciplinares, que se dedican a desarrollar medicamentos que mejoren el aclaramiento de moco en los pulmones y la subsecuente infección, junto con la mejora de la insuficiencia pancreática y la desnutrición. Gracias al trabajo de estos grupos se han conseguido importantes avances en la calidad de vida y en los resultados clínicos de los pacientes con FQ, que ahora tienen una esperanza de vida superior a 40 años (Cooney et al., 2018).

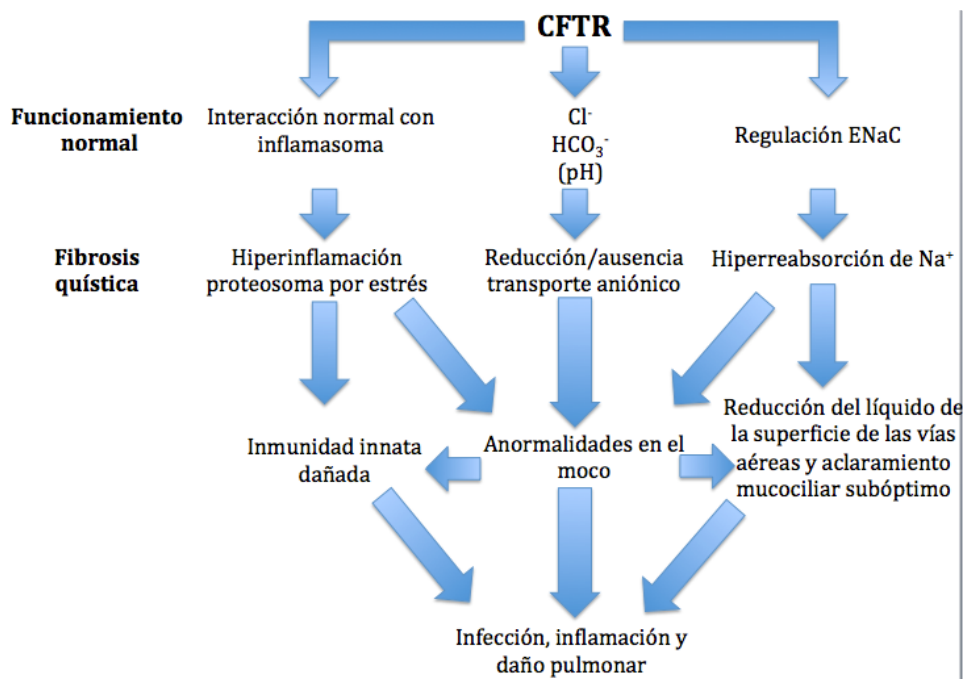
En los últimos años se han ido desarrollando terapias que atacan al defecto de base en la FQ y son efectivas mejorando la función pulmonar y reduciendo las exacerbaciones en este órgano. Así, se está avanzando en la implantación de terapias genéticas con el fin de

mejorar la función del gen CFTR y que resultan prometedoras en la modificación de la enfermedad y mejora de la calidad de vida de estos pacientes (Smyth et al., 2014).

## 2. PAPEL DEL CANAL CFTR EN LA ENFERMEDAD

El defecto en el canal CFTR afecta de manera importante al transporte de cloruro y bicarbonato (Larkin et al., 2015). No obstante, la interacción entre CFTR y otros canales iónicos, particularmente el canal epitelial de sodio (ENaC), así como las interacciones de CFTR con vías celulares relacionadas con la inflamación (inflammasoma) pueden ser importantes en la fisiopatología de la FQ.

Es importante conocer la fisiopatología de esta enfermedad durante los primeros años de vida, hecho que ha sido recalcado en los últimos estudios, que muestran que sobre los tres años de edad, casi un tercio de los niños con FQ muestran en los TAC obstrucción por moco, bronquiectasia e inflamación producida por los neutrófilos, elastasa de neutrófilos, y episodios de infección recurrentes, como se recoge en la Figura 1 (Ramsey et al., 2014).



**Figura 1.** Efectos de la disfunción CFTR (adaptada de Elborn, 2003).

La hipótesis primaria para explicar estas características clínicas es que el aclaramiento mucociliar defectuoso causado por una hidratación anormal de la superficie de las vías aéreas se convierte en el factor más importante en el desarrollo de la enfermedad (Button et al., 2012; Henderson et al., 2014). Esta hipótesis ha sido refutada por hallazgos en

algunos modelos de animales, pero no en otros, de manera que en varios modelos animales desarrollados recientemente, como el cerdo y el hurón con FQ, no se ha observado una reabsorción de sodio excesiva (Larkin et al., 2015). Este descubrimiento apoya la hipótesis de que una hidratación adecuada es necesaria en el aclaramiento mucociliar.

CFTR también transporta bicarbonato, por lo que la disfunción de la proteína cambia el pH del líquido de la superficie aérea (Button et al., 2012). Esta modificación conlleva importantes repercusiones a nivel de ataque microbiano; de hecho, existe un estudio en el cual se empleó líquido de la superficie de las vías aéreas proveniente de cerdos; los resultados mostraron que la muerte bacteriana era dependiente del pH, por lo que un cambio en éste puede resultar en un sistema inmune deprimido, reduciendo así la función de los péptidos antimicrobianos (Keiser et al., 2015). Por otra parte, el moco existente en las vías aéreas es muy dependiente de la presencia de bicarbonato para su funcionamiento normal, por lo que concentraciones reducidas del anión pueden causar desajustes del espesor del moco, aumentando su viscosidad en las vías aéreas.

Por lo tanto, es posible que la disfunción del CFTR resulte en consecuencias en la hidratación, en el aclaramiento mucociliar, en el espesor y la función del moco, daños en la inmunidad innata, y puede también predisponer al aumento de la inflamación celular intrínseca. El impacto de estos problemas asociados a una disfunción del CFTR pueden cambiar con la edad y la progresión de la enfermedad. La heterogeneidad en la evolución puede ser explicada en parte porque algunos tratamientos mejoran los síntomas de este defecto, como es el caso de los fármacos que mejoran el aclaramiento mucociliar o los agentes antimicrobianos (Graeber et al., 2013).

La clonación del gen CFTR ha permitido comprender mucho mejor el funcionamiento del aclaramiento mucociliar en la salud y en la enfermedad. Así, entendiendo el proceso de regulación de la hidratación de las vías aéreas y el aclaramiento mucociliar mediante la influencia de las fuerzas osmóticas se permitirá mejorar el pronóstico de un amplio rango de enfermedades pulmonares asociadas con infecciones. Por ejemplo, el consumo de tabaco produce una disfunción en el CFTR, incluso aunque no existan mutaciones y pueden aumentar los síntomas respiratorios, afectando al transporte mucociliar y aumentando el riesgo de padecer bronquitis crónicas (Courville et al., 2014). Todo ello puede ayudar a identificar los factores que influyen en las enfermedades pulmonares,

como las enfermedades obstructivas pulmonares y las bronquiectasias, así como a conseguir nuevos tratamientos (Rab et al., 2013).

### **3. EPIDEMIOLOGÍA Y DEMOGRAFÍA DE LA ENFERMEDAD**

Los notables progresos que se han logrado con la mejora del aclaramiento mucociliar de las vías aéreas y el control de la infección pulmonar, han conseguido que la FQ deje de ser una enfermedad predominante en niños para convertirse en un desorden de los adultos (Davis, 2015). El número de adultos con FQ continuará aumentando, con casi todas las muertes, en la población adulta (Parkins et al., 2011). Además, en los últimos cinco años, en los países con sistemas sanitarios potentes, ha habido más adultos que niños con FQ. En los países europeos desarrollados, el número de adultos con FQ se prevé que aumente un 70% para el 2025 (Burgel et al., 2015). Sin embargo, en algunos países de Europa con sistemas sanitarios menos desarrollados, la esperanza de vida puede quedarse en la segunda década debido a una falta de acceso al tratamiento (McCormick et al., 2010). La sustancial mejora de la esperanza de vida en los países desarrollados ha sido fruto de la existencia de centros bien organizados y multidisciplinarios y del empleo de fármacos efectivos para tratar la infección y mejorar el aclaramiento mucociliar (Conway et al., 2014).

Como se ha referido anteriormente, la FQ afecta a varios sistemas corporales y los efectos fenotípicos varían según la edad (Tabla 2). La progresión de la enfermedad requiere de un cuidado multidisciplinar y progresivamente de una mayor especialización. Por tanto, los sistemas de salud tienen el reto de mejorar el cuidado del paciente adulto debido al reciente aumento de enfermos de esta edad. Tanto es el aumento que incluso en varios países los adultos enfermos de FQ son tratados en servicios pediátricos (Burgel et al., 2015).



**Tabla 2.** Aparición de distintos síntomas de la FQ según el avance de la enfermedad (adaptada de Elborn, 2003).

	<b>0 - 10 años</b>	<b>10 - 20 años</b>	<b>20 - 35 años</b>	<b>&gt; 35 años</b>
<b>Vías aéreas</b>	Taponamiento de la secreción mucosa y bronquiectasia	Bronquiectasia establecida	Bronquiectasia establecida con hematomas / neumotórax	Fallo pulmonar progresivo / trasplante de pulmón
<b>Infecciones predominantes</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (intermitentemente) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otras bacterias Gram negativas no fermentadoras, ABPA (Aspergilosis broncopulmonar alérgica)	
<b>Páncreas</b>	Insuficiencia pancreática exocrina		Diabetes mellitus relacionada con FQ	
<b>Hígado</b>	Resultados anormales en el funcionamiento del hígado	Cirrosis	Hipertensión portal (5-10%)	Trasplante de hígado
<b>Microbiota</b>	<i>Meconium ileus</i>		Síndrome de obstrucción intestinal distal	
<b>Sistema reproductivo</b>	Ausencia de <i>vas deferens</i>			
<b>Otros</b>			Artropatía, enfermedad articular relacionada con la FQ	

#### 4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

La FQ se identifica normalmente mediante el cribado a los recién nacidos o durante los primeros años de vida (McCloskey et al., 2000). Las personas que son diagnosticadas después de los 20 años de edad tienen normalmente una mutación asociada con la función residual de CFTR, como por ejemplo Arg117His (también conocida como R117H), como se puede apreciar en la Tabla 3 (Bartlett et al., 2009).

Estos individuos pueden tener síntomas de taponamiento respiratorio en la infancia, pero desarrollan bronquiectasias, pancreatitis o presentan infertilidad más adelante. El diagnóstico se realiza mediante el test del sudor y el análisis del ADN (McKone et al., 2015). Los individuos con un diagnóstico tardío tienen una buena supervivencia, lo que

refleja la elevada prevalencia de mutaciones asociadas con la función residual y con un fenotipo menos grave (McKone et al., 2015).

**Tabla 3.** Relación entre el fenotipo, genotipo y la función CFTR en pacientes con FQ y en individuos sanos (adaptada de Elborn, 2003).

	<b>Mutaciones tipo I-III</b>	<b>Mutaciones IV-VI</b>	<b>Estado saludable</b>
<b>Cloruro en el sudor</b>	100 mmol/L	30-60 mmol/L	< 30 mmol/L
<b>Fenotipo pulmonar</b>	Bronquiectasia	Espesor en las paredes de las vías aéreas	Estado normal
<b>Bacteriología</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Microbioma normal
<b>Función pancreática</b>	Ninguna	50%	Función normal
<b>Fertilidad masculina</b>	Infértil	Infértil	Fértil
<b>Mutaciones típicas</b>	Gly542X Phe508del Gly551Asp	Arg117His (5T) Arg334Trp Ile55Glu	Ninguna
<b>Función de la proteína CFTR</b>	0%	50%	100%

#### **4.1. Cribado prenatal**

El cribado prenatal y el test para detectar los defectos genéticos de los padres en el gen CFTR se encuentran disponibles. Igualmente es posible detectar la presencia de mutaciones en el feto mediante tests invasivos como la biopsia de vellosidades coriónicas a las 10 - 12 semanas de gestación o mediante la amniocentesis a las 16 - 18 semanas de gestación (Bono-Neri et al., 2018). Para aquellos padres con un historial positivo de FQ o un estatus parecido, la matrona puede recomendar un test genético y dar consejo. Esto podría ocurrir incluso antes del embarazo para explorar las opciones para las futuras prácticas reproductivas. La posibilidad de reproducción asistida o adopción también debe ser recomendada por el personal sanitario (Palomaki et al., 2004). Si se descubre que ambos individuos poseen el gen, una vez que exista el embarazo, la pareja tendría un 25% de probabilidades de tener a un niño con esta enfermedad. Durante este proceso, si los tests genéticos muestran que existen dos mutaciones, la pareja debe ser aconsejada por el personal sanitario del centro y debe ser bien informada por si decide continuar con el embarazo o terminar con él, lo cual presenta bastantes implicaciones éticas.

## **4.2. Cribado en recién nacidos**

El cribado para recién nacidos se encuentra implementado en la mayoría de países desarrollados con alta prevalencia de la enfermedad (Mayell et al., 2009). Los programas de cribado reducen la severidad de la enfermedad, la carga en el cuidado y los costes. También previene los diagnósticos fallidos o retrasados (Castellani et al., 2009). Para ello, se emplean varios métodos, incluido el tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) combinado junto con el análisis de las mutaciones del ADN, test TIR doble y el test asociado a la proteína pancreática (Levy y Farrell, 2015). La metodología usada depende de factores geográficos, étnicos y económicos, y cada país debe hacer un análisis independiente sobre el protocolo más eficaz que satisfaga las necesidades locales. En la mayoría de programas, el test TIR se continúa con un test de mutaciones comunes en la FQ.

Las extracciones de sangre se realizan justo después de nacer mediante la prueba del talón. El test del sudor deber hacerse como prueba diagnóstica final. En esta situación, son necesarios los apoyos prestados a los padres con hijos recién diagnosticados y asociarles un centro de referencia en todos los programas (Levy y Farrell, 2015). El cribado ha identificado a varios niños con un diagnóstico incierto asociado con un test positivo TIR, una o ninguna mutación, y una concentración intermedia de cloruro en el sudor de 30 - 60 mmol/L. Estos niños deben ser asesorados cuidadosamente y continuar con un seguimiento porque, aunque sean asintomáticos durante los primeros años, algunos pueden desarrollar el fenotipo de la FQ con el crecimiento (Levy y Farrell, 2015). Estos individuos tienen normalmente mutaciones asociadas con la función residual de la proteína CFTR. En EEUU, este diagnóstico se llama síndrome metabólico de la FQ (McCloskey et al., 2000).

### **4.2.1. Confirmación de la enfermedad**

Es crucial para el personal médico saber que el cribado del recién nacido es meramente eso, una herramienta de cribado, pero que no confirma la enfermedad (Courville et al., 2014). Si un niño es sospechoso de padecer FQ por un positivo en esta prueba y posee los síntomas, se necesitaría un análisis más exhaustivo para confirmar el diagnóstico.

En 2015, un comité experto internacional revisó los protocolos de diagnóstico del año 2008 porque algunos pacientes se salían del algoritmo habitual sin obtener un diagnóstico definitivo (Mayell et al., 2009). Los niños con un diagnóstico incierto se denominan enfermos con el síndrome metabólico relacionado con el gen CFTR o positivo en el

cribado de la FQ, con diagnóstico inconcluyente, que resulta ser lo mismo. El test del cloruro en el sudor que usa iontoforesis con pilocarpina sigue siendo el criterio estándar para el diagnóstico (Levy y Farrell, 2015). Este test no invasivo está correctamente validado, y puede ser llevado a cabo desde las dos semanas de vida hasta la que la infancia termina. Un valor en el test de 29 mmol/L o menos significa que la FQ es improbable a cualquier edad. Un valor entre 30–59 mmol/L de concentración es considerado intermedio a cualquier edad, porque guías recientes publicadas por la Fundación de la FQ cambió el parámetro de concentración intermedia desde 40-59 mmol/ L a 30-59 mmol/L. Por lo tanto, si la concentración en el sudor va desde 30-59 mmol/L, además de dos mutaciones en el gen CTFR, se considera que el paciente padece FQ (Levy y Farrell, 2015). Por su parte, concentraciones superiores a 60 mmol/L se consideran anormales y son un indicativo de FQ en cualquier grupo de edad, confirmando la enfermedad con un diagnóstico positivo en el cribado del recién nacido (Barreiro-Martínez y Marín-Soria, 2015).

## 5. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD

Los pacientes con FQ tienden a manifestar ciertas disfunciones en algunos sistemas corporales que dependen del grupo de edad de cada paciente. Aunque la severidad de las manifestaciones clínicas puede variar según el genotipo, estos individuos tienden a tener diferentes manifestaciones según la edad. Según la edad de los pacientes, se pueden alterar diferentes funciones de varios sistemas o verse alteradas durante el proceso de la patología, como se recoge en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Manifestaciones clínicas y sintomatología de la fibrosis quística según diferentes grupos de edad (adaptada de Bono-Neri et al., 2018).

Edad	Síntomas
<b>Prenatal</b>	Historia familiar de FQ Intestino hiperecogénico Dilatación esofageal Vesícula no visible Calcificaciones abdominales
<b>Neonatal</b>	<i>Meconium ileus</i> Ictericia prolongada Insuficiencia pancreática Potasio insuficiente Test del sudor positivo

<b>Infancia</b>	Neumonía por <i>Staphylococcus aureus</i> Hiponatremia e hipocloremia Alcalosis metabólica - convulsiones Problemas en el desarrollo - deshidratación Hipertensión intracraneal (déficit de vitamina A) Anemia hemolítica (déficit de vitamina E)
<b>Niñez</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> endobronquial Pansinusitis y poliposis nasal Obstrucción intestinal distal Intususcepción y prolapso rectal Colonopatía fibrosa
<b>Adolescencia</b>	Aspergilosis broncopulmonar Acrodermatitis, artritis, neuropatía Cálculo renal, osteoporosis Pubertad retrasada Diabetes mellitus Enfermedad renal Hipertensión portal
<b>Adultez</b>	Bronquiectasia y hemoptisis Obstrucción pulmonar Fallo respiratorio Pancreatitis crónica y recurrente Amenorrea y azoospermia

## **5.1. Manifestaciones de síntomas desde la etapa uterina hasta la edad adulta**

### **5.1.1. En el útero**

Las manifestaciones de la disfunción en el gen CFTR a menudo empiezan antes del nacimiento. Los hallazgos en la ultrasonografía fetal detectan el intestino hiperecogénico con o sin peritonitis del meconio, dilatación del intestino, ascitis, no visualización de la vesícula y polihidroamniosis (Brennan y Schrijver, 2016). Además, la susceptibilidad del conducto deferente en la disfunción del gen CFTR resulta en un desarrollo anormal de las estructuras asociadas en el 98% de los hombres (Brennan y Schrijver, 2016). Mientras, en el útero, el feto va desarrollando cambios secundarios a la disfunción de la proteína CFTR. Tras el nacimiento, pueden evidenciarse ciertas manifestaciones clínicas.

### **5.1.2. En la infancia**

La sintomatología de la FQ puede manifestarse justo en el recién nacido; por lo tanto, el cribado en el recién nacido es primordial para que el diagnóstico sea lo antes posible y así poder iniciar el tratamiento, lo que mejoraría los síntomas y la evolución de la

enfermedad (VanDevanter et al., 2016). La mayoría de las manifestaciones clínicas pertenecen al aparato respiratorio o digestivo.

La sintomatología prevalente de la FQ se manifiesta en niños menores de 6 años y provienen sobre todo del sistema respiratorio. Estas incluyen taquipnea, jadeos, aumento forzado de la respiración, hiperinflamación y tos. Además, en este periodo se aprecia una rápida colonización de las vías aéreas por *Haemophilus influenzae* y/o *Staphylococcus aureus* incluso en niños con FQ que no parecen estar enfermos (Dios et al., 2016). Las infecciones virales respiratorias, especialmente aquellas con virus respiratorio sincitial que son identificadas como patógenas, pueden aumentar la progresión de la enfermedad respiratoria, resultando en una reducción de la función pulmonar, aumento de la inflamación, y un posible aumento de la probabilidad de adquirir *Pseudomonas aeruginosa*. Si la FQ se vuelve irreconocible, esos niños pueden ser mal diagnosticados con bronquitis recurrentes persistentes, retrasando la implementación de un tratamiento adecuado para la FQ.

El sistema gastrointestinal es casi el primero afectado en la FQ, con un número significativo de neonatos con daños (Bono-Neri et al., 2018). Algunos recién nacidos pueden manifestar ictericia neonatal prolongada debido a obstrucciones intestinales y alrededor del 20% de recién nacidos pueden manifestarlas en forma de *meconium ileus*. Los vaciamientos gástricos prolongados debido a alteraciones en el tiempo de transición y en la viscosidad de los fluidos pueden resultar en reflujo gastroesofágico patológico. Adicionalmente, hasta un 86% de estos niños nacen con insuficiencia pancreática (Barley et al., 2016), presentando problemas en el desarrollo, que se manifiesta con una ganancia insuficiente de peso y con un crecimiento lento. La malabsorción, particularmente de las vitaminas liposolubles A, D, E y K, pueden llevar a anemia hemolítica y a alteraciones en la coagulación.

Durante esta etapa también se pueden apreciar desequilibrios en los niveles de electrolitos. La aparición de una depleción de sales es la causante de hiponatremia, hipocalcemia y deshidratación hipoclorhídrica con alcalosis metabólica y elevación de la renina, originando una elevación de la aldosterona. Los niños son más vulnerables a estas alteraciones en los niveles de electrolitos en condiciones de calor o cuando haya otros casos que provoquen la pérdida de sodio (Bowen y Hull, 2015; Henderson et al., 2014).

### **5.1.3. En la niñez**

Aunque las vías aéreas superiores de los niños con FQ pueden manifestar infecciones sinusales repetidas y poliposis nasal, así como otitis recurrente, las infecciones de las vías aéreas inferiores a menudo resultan en infecciones recurrentes con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* que son los microorganismos más comunes que invaden el tracto respiratorio de los pacientes con FQ (Van Ginderdeuren et al., 2006). De manera habitual, estas infecciones recurrentes de las vías aéreas inferiores llevan a un aumento de la resistencia a los antibióticos y aumentan la morbilidad, conduciendo progresivamente a obstrucción pulmonar y resultando en bronquiectasias y en dedos en palillo de tambor (rigidez) (Van Ginderdeuren et al., 2006). Las infecciones gastrointestinales apreciadas comúnmente en la niñez incluyen diabetes mellitus relacionada con la FQ (CFDR), malnutrición, que llevan a fallos en el desarrollo causado por la maldigestión y la malabsorción. Estos pacientes presentan una ganancia pobre de peso, hiperglucemia, esteatorrea, distensión abdominal, estreñimiento crónico y prolapso rectal.

### **5.1.4. Adolescencia y edad adulta**

Con la edad, los pacientes manifiestan una dilatación de las vías aéreas y hay bronquiectasias, con manifestaciones pulmonares como tos, disnea, aumento de la producción de esputo, atelectasia, neumonía e hipertensión pulmonar (Goetzinger, 2017). En los estadios tardíos de la enfermedad, no es extraño apreciar la aparición de esputos sanguinolentos, retención de dióxido de carbono y una disminución de la calidad de vida. La dependencia nocturna de oxígeno, la frecuencia de las exacerbaciones y la necesidad de terapia respiratoria aumentan, requiriéndose intervenciones más especializadas y mayor actuación por parte de los profesionales especialistas.

Los problemas gastrointestinales en la población están relacionados con infecciones provocadas por *Clostridium difficile* debido al uso de los antibióticos con pancreatitis, colelitiasis, síndrome distal obstructivo intestinal y un pequeño crecimiento bacteriano causando diarrea, distensión abdominal, flatulencia, esteatorrea, anemia macrocítica y pérdida de peso.

Adicionalmente, existen problemas en aspectos reproductivos, ya que la mayoría de hombres que tienen FQ son infértiles debido a la azoospermia y a anomalías congénitas en el *vas deferens*. Por su parte, las mujeres con FQ pueden tener la fertilidad reducida,

aunque la concepción podría ocurrir con un embarazo vigilado resultando en el nacimiento de un niño sano, mientras se mantenga una buena alimentación y un buen estado pulmonar (Cohen-Cymerknoh et al., 2011).

## **6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS POR SISTEMAS**

### **6.1. Intestinales**

#### **6.1.1. Insuficiencia pancreática**

La insuficiencia pancreática se convierte en una de las manifestaciones clínicas que se presentan con mayor frecuencia en pacientes con FQ. Más del 50% de los pacientes presentan signos clínicos de IP durante los primeros días de vida y hasta el 90% los manifiestan dentro del primer año. Por otra parte, es la causa principal de desnutrición y retraso en el crecimiento de estos pacientes.

Como es bien sabido, la secreción pancreática es una solución con un volumen elevado de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) como respuesta a la estimulación por secretina y colecistoquinina (Olivier et al., 2015). Su función principal consiste en neutralizar el pH ácido producido por las secreciones gástricas y permitir un funcionamiento óptimo de las enzimas pancreáticas. La FQ se caracteriza por una disminución del volumen y la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en la secreción pancreática, lo cual da como resultado una secreción retrasada de las enzimas pro-digestivas. Ello ocasiona una sobreactivación de las enzimas pancreáticas, destruyendo las células acinares. Este daño continuado da lugar a la insuficiencia pancreática exocrina (Regard et al., 2018) que se manifiesta por un descenso o ausencia en la producción de enzimas pancreáticas como proteasas, amilasas, lipasas, colipasas y fosfolipasas. Por lo tanto, se origina malabsorción de los lípidos manifestándose clínicamente con dolor abdominal, esteatorrea, flatulencia, diarrea y disminución en la absorción de vitaminas liposolubles. Para que se den estas manifestaciones, la función enzimática del páncreas debe disminuir un 3% de lo normal (McCloskey et al., 2000).

Los pacientes que presentan IP se diagnostican de la enfermedad a edades más tempranas y cursan con cuadros clínicos más graves, mientras que aquellos que no manifiestan IP tienen como promedio una esperanza de vida veinte años mayor que los que la presentan (Layer et al., 2019). Y es que los pacientes con FQ que no presentan IP también presentan



una función pancreática defectuosa con una baja concentración de bicarbonato, pero con una cantidad suficiente de enzimas que evitan que se produzca esteatorrea.

### **6.1.2. Reflujo gastroesofágico**

El reflujo gastroesofágico consiste en el flujo retrógrado del contenido gástrico hacia el esófago. Se trata de una de las manifestaciones más frecuentes de esta enfermedad y ocurre en el 50% de los niños menores de tres meses. Sin embargo, esta manifestación desaparece en su mayoría a los dos años de edad (Cohen-Cyberknoh et al., 2011). En caso de que los síntomas persistan, alcanza los 16 años de edad y es más común en pacientes con co-morbilidades como asma, problemas neurológicos y dolor abdominal (Maqbool y Pauwels, 2017). Los problemas de deglución, regurgitación y el dolor abdominal son comunes en niños pequeños, mientras que la acidez y la regurgitación son más habituales en adolescentes y adultos.

Los síntomas pueden dividirse en típicos, como acidez o regurgitación y atípicos, como tos crónica, ronquera, jadeos y asma. Estos pueden agravarse causando esofagitis o esófago de Barrett (Dziekiewicz et al., 2015).

### **6.1.3. Síndrome de obstrucción intestinal distal**

El síndrome de obstrucción intestinal distal es una complicación común en la FQ. Se caracteriza por la acumulación de materia fecal en el lumen del intestino junto con moco pegajoso en las paredes terminales del íleo y del ciego. Esta masa se une con fuerza a las criptas y a las vellosidades y es difícil de retirar. En la mayoría de los casos, es una enfermedad permanente que se agrava a veces por la aparición de más materia, lo que explica que los síntomas sean intermitentes (Colombo et al., 2011). Pueden ser agudos, con una obstrucción intestinal, o más comúnmente, subagudos, con dolor abdominal intermitente, acompañado generalmente de distensión abdominal (Hort et al., 2019).

La incidencia de obstrucción intestinal completa resulta ser de entre 5-12 episodios en 1000 pacientes infantiles en Europa a lo largo de un año (Houwen et al., 2009).

### **6.1.4. *Meconium ileus***

El *Meconium ileus* (MI) suele ser la primera manifestación de la FQ y ocurre aproximadamente en el 20% de pacientes con esta patología. Posee dos formas de manifestarse: simple y compleja. En la simple, el *meconium* viscoso obstruye físicamente el íleo terminal y el intestino proximal. En la compleja, los segmentos distales del *meconium ileus* pueden dar lugar a complicaciones como vólvulos prenatales, isquemia, necrosis, atresia intestinal o perforación y extrusión del *meconium* hacia el perineo. El tiempo que dure la perforación influye en el resultado final (Escobar et al., 2005). Si ocurre rápido en el útero, puede ocurrir la reabsorción de parte del *meconium* en el perineo, dejando un pequeño número de calcificaciones. Si la necrosis y la perforación ocurren en las asas intestinales, puede darse más fácilmente la peritonitis del *meconium*. Además, éste podría ser encapsulado parcialmente, ocurriendo una peritonitis gigante cistítica. Tanto la simple como la compleja se presentan con igual frecuencia en pacientes con FQ (Sathe y Houwen, 2017).

#### **6.1.4. Daño hepático**

La enfermedad hepática puede afectar a niños y adultos con FQ, aunque su progresión y su impacto en la salud puede variar. La prevalencia se sitúa en un 10-30%, con un comienzo de la enfermedad normalmente en la primera década de vida, mientras que la prevalencia de cirrosis en niños es del 5-10%. Se manifiesta normalmente por una pérdida de la función de la proteína CFTR. La bilis se vuelve anormalmente viscosa, queda retenida en el árbol biliar y activa la inflamación y la fibrosis mediante la activación celular. Aunque al principio es localizada, la fibrosis biliar puede progresar a cirrosis. Además, la alteración del metabolismo de los fosfolípidos y la diabetes relacionada con la FQ, pueden causar esteatosis. Por otra parte, debido al metabolismo de fármacos como antibióticos, se puede producir daño hepático, normalmente de tipo idiosincrático, causando un aumento de las enzimas hepáticas o de la bilirrubina (Davison, 2018). Además, los enfermos de FQ pueden presentar enfermedades hepáticas no relacionadas como disfunción hepática, enfermedad autoinmune hepática y enfermedad de Wilson; aunque son menos comunes, pueden darse y tienen tratamiento. No se debe olvidar la posible hepatitis viral, obesidad, uso esporádico de drogas y alcohol como posibles causas para provocar enfermedad hepática (Debray et al., 2017).

## **6.2. Alteraciones en las glándulas sudoríparas**

Como se ha comentado anteriormente, el CFTR tiene un importante papel en la absorción y secreción de electrolitos y fluidos. En los enfermos de FQ, la disfunción de este gen provoca manifestaciones clínicas importantes. Aunque las tasas de secreción colinérgica de sudor son muy similares en pacientes con FQ y sin ella, la secreción beta-adrenérgica está ausente en la FQ (Quinton, 2007). La incapacidad del conducto para absorber el ión cloruro impide el transporte de sodio y, por lo tanto, la absorción de sales se ve reducida, aumentando los niveles de NaCl, produciendo un sudor anormalmente salado, convirtiéndose en una de las características de la enfermedad (Palma et al., 2014). Aunque en condiciones normales esto no es un problema para estos enfermos, cuando las condiciones son cálidas y húmedas, los pacientes con FQ pueden perder excesivas cantidades de sales y fluidos, causando deshidratación. Además, este aumento del sudor es la base del test cuantitativo de la pilocarpina mediante iontoforesis, que aún se sigue usando con fines diagnósticos. Este test mide la concentración de ión cloruro en el sudor y requiere la introducción iontoforética de pilocarpina (un agonista colinérgico) para estimular la suficiente producción de sudor local para el análisis de cloruro (Salinas et al., 2017).

## **6.3. Ausencia de conductos deferentes**

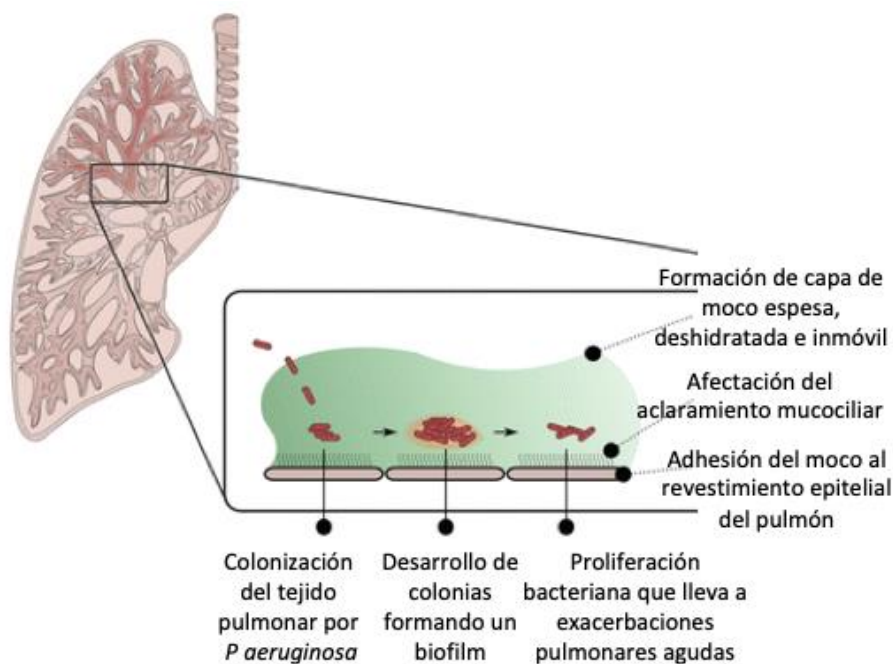
La ausencia bilateral congénita de conductos deferentes ocurre en el 1-2% de los hombres infértiles y se encuentra presente en el 6% de los casos obstructivos de azoospermia. Cerca del 95% de los varones con FQ presentan esta alteración consistente en azoospermia e hipoplasia de vesículas seminales, conductos eyaculadores y epidídimo, por lo que estos pacientes tienen problemas de fertilidad. Las mujeres con FQ parecen no presentar problemas para quedarse embarazadas (Silva de Souza et al., 2017)..

## **6.4. Enfermedad pulmonar**

La patología predominante en el pulmón es la inflamación, generada principalmente por un fallo en la eliminación de los patógenos y la generación de un ambiente pro-inflamatorio local (Regard et al., 2018). Esta se manifiesta en una etapa muy temprana, y sobre un tercio de los enfermos la desarrollan durante los primeros meses.

Las bronquiectasias se asocian con concentraciones elevadas de la neutrófilo-elastasa, lo que altera la inmunidad innata, aumenta la producción de mocos, daña péptidos y

proteínas de las vías aéreas y daña la matriz extracelular. Esta enzima y otras proteasas derivadas de éstas, como la catepsina S y las metaloproteinasas de la matriz son las responsables de dañar la vía pulmonar y provocar las bronquiectasias (Dios et al., 2016). En estos niños con FQ, las infecciones recurrentes por virus y bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* resultan en un daño directo e indirecto como consecuencia de la respuesta inflamatoria debido a la infección pulmonar. A medida que la enfermedad avanza, las bronquiectasias se desarrollan y los enfermos de FQ se vuelven susceptibles a un rango de bacterias Gram-negativas. Estos microorganismos se encuentran comúnmente en el ambiente y solamente se asocian con infecciones en humanos en situaciones donde el huésped se encuentra inmunocomprometido o la integridad del epitelio de éste se encuentra comprometida (Hassett et al., 2009). El microorganismo predominante en las infecciones pulmonares es *Pseudomonas aeruginosa*, que forma un biofilm en el tejido pulmonar provocando exacerbaciones agudas, como se puede apreciar en la Figura 2.



**Figura 2.** Formación del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* y su crecimiento en el pulmón en pacientes que presentan FQ (figura adaptada de Hassett et al., 2009).

Además de estas especies bacterianas, también se pueden encontrar otras bacterias Gram-negativas, no fermentadoras como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter* spp. Estos microorganismos han adquirido resistencia a los antibióticos que actúan contra las Gram-negativas; por ello, cuando ocurren exacerbaciones de los síntomas, los pacientes necesitan ser tratados por vía intravenosa. Las bacterias del complejo *Burkholderia*

*cepacia*, en concreto *Burkholderia cenocepacia*, son patógenos invasores en la FQ y se asocian con una elevada mortalidad. Un control adecuado de la infección ha reducido la transmisión de *B. cenocepacia* entre pacientes, reduciéndose en la población que presenta FQ (Waters y Smyth, 2015). Aparte de las bacterias Gram-negativas, están aumentando las infecciones por micobacterias ambientales no tuberculosas, en concreto *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium avium-intracellulare*, las cuales son difíciles de tratar porque son muy resistentes a la antibioterapia. Estudios recientes, en los que se han empleado técnicas de secuenciación de la siguiente generación, han identificado un rango mucho mayor de bacterias en las vías aéreas, incluyendo anaerobios estrictos. Estas bacterias pueden ser detectadas en las vías aéreas de los individuos sanos. Aunque no está claro si existen más microorganismos patógenos, algunos estudios en pacientes con FQ sugieren que si existe una gran variedad de microorganismos diferentes en las vías aéreas, la función pulmonar sería mejor que si existiera la colonización por una única especie como *P. aeruginosa* (Moreno-Sastre et al., 2016). Todo esto sugiere y cuestiona el uso de antibióticos para tratar la FQ, y podría explicar por qué algunos estudios en los que se trató a enfermos recién diagnosticados con profilaxis antibiótica, los casos de infección por *P. aeruginosa* aumentaron.

## **7. MANEJO Y CONSIDERACIONES SOBRE LA ENFERMEDAD**

Los pacientes con FQ presentan varias expresiones fenotípicas basadas en sus genotipos. Por tanto, el tratamiento de atención primaria por parte de los enfermeros especialistas debe ser participativa, individualizada, multidisciplinar y centrada tanto en el cuidado del paciente como de la familia. Los pacientes diagnosticados con FQ deben ser tratados en un centro médico especializado en la materia. Debe existir un cuidado colaborativo con líneas abiertas y frecuentes de comunicación en la atención primaria entre paciente, familia y el centro que reúna a todo el equipo: médicos, trabajadores sociales, trabajadores, enfermeros especialistas y otros.

Los objetivos más importantes son mantener un crecimiento normal y el manejo adecuado de la enfermedad pulmonar. Durante los 2-3 meses después del diagnóstico de la enfermedad se deben las siguientes pruebas: radiografía pulmonar, análisis completo de sangre, medida de los niveles de electrolitos, tests de funcionamiento del hígado y de los niveles de vitamina A, D y E, así como enseñar a manejar los síntomas respiratorios (Goetzinger, 2017).

## **7.1. Manejo de los síntomas gastrointestinales**

La nutrición es el punto central que hay que manejar para conseguir una promoción total de la salud en pacientes con FQ. El enfermero especialista debe enseñar al paciente la importancia de una alimentación apropiada. Por lo tanto, se recomienda una adecuada monitorización del crecimiento desde la infancia hasta la edad adulta, ya que existe una correlación directa entre un crecimiento óptimo en el niño y el peso del adulto con muchas probabilidades de tener mejor función pulmonar en esta enfermedad (Yen et al., 2013). Se ha demostrado que el aumento de la longevidad en estos pacientes se debe, en parte, al aumento del apoyo nutricional. Una atención nutricional especializada por parte del enfermero empezando desde la infancia, es esencial, porque este es un período de crecimiento remarcable con demandas metabólicas importantes (Kim et al., 2004). La Fundación de la FQ recomienda que sobre los dos años de edad los niños con FQ alcancen al menos el percentil 50. Además, un mantenimiento del peso con la edad en el percentil 10 o mayor para preescolares con FQ se asocia con mejor funcionamiento pulmonar y aumenta la supervivencia.

Para el manejo de la insuficiencia pancreática y los déficits nutricionales, es necesario un tratamiento oral sustitutivo enzimático y vitamínico, así como un control glucémico exógeno y una alimentación enteral adecuada (Singh y Schwarzenberg, 2017).

Así, aquellos niños con genotipo o evidencias objetivas de insuficiencia pancreática, como niveles de elastasa menores de 200  $\mu\text{g/g}$  o síntomas evidentes de malabsorción, deben empezar terapia enzimática de reemplazo y de vitaminas específicas de la FQ tan pronto como se detecte en la prueba del cloro (Borowitz et al., 2009).

Algunos factores pueden impedir alcanzar los objetivos nutricionales adecuados en pacientes con FQ. Por lo tanto, cuando la nutrición no es suficiente para asegurar un funcionamiento nutricional óptimo, el enfermero, en colaboración con el equipo de FQ, el paciente y la familia, deben considerar una forma de alimentación enteral mediante tubo que puede proporcionar los nutrientes necesarios. Esto puede incluir la sonda nasogástrica, nasoyeyunal, gastrostomía o gastrostomía endoscópica percutánea. La educación nutricional es primordial para conseguir un crecimiento óptimo y un mantenimiento de peso, incluyendo la alimentación a través de sonda, que debe ser aplicada por el enfermero a lo largo de toda la vida del paciente (White et al., 2013). Con un correcto manejo nutricional empleando suplementación, terapia enzimática sustitutiva,

comida saludable en general, consejo nutricional, mantenimiento del peso y vigilancia de la diabetes, estos pacientes pueden combatir con éxito la enfermedad (Borowitz et al., 2009).

## **7.2. Inmunización**

Una parte esencial del plan de salud es la inmunización, para conseguir mejorar la salud en general, mantener y prevenir. Reducir el riesgo de infecciones en pacientes con FQ puede prevenir exacerbaciones pulmonares, hospitalizaciones, infecciones sistémicas, ingresos en la UCI y posible ventilación mecánica. El enfermero encargado debe estar al tanto de la inmunización del paciente y vacunarlo anualmente contra el virus *Influenza* (administrada en menores de 6 meses) en los pacientes con FQ, miembros de la familia y personal sanitario (Borowitz et al., 2009). Además, la asociación de FQ recomienda que los niños entre 2 y 5 años con FQ reciban la primera dosis de la vacuna polisacáridica del neumococo (i.e., PPSV23), 8 semanas después de la vacuna conjugada (PCV13; Prevnar, Wyeth, Madison, NJ) (Borowitz et al., 2009).

## **7.3. Manejo de la enfermedad pulmonar**

Un aspecto del manejo de la FQ por parte del enfermero incluye optimizar la función pulmonar del paciente usando broncodilatadores, mucolíticos, antiinfecciosos y antiinflamatorios. Un moco espeso y la existencia de problemas en las vías aéreas son los síntomas más comunes asociados a la FQ. Las exacerbaciones pulmonares se observan a menudo en casos agudos y es importante controlarlas.

En la enfermedad pulmonar es importante atacar la infección respiratoria para actuar contra *Pseudomonas aeruginosa*. El daño pulmonar secundario a la infección crónica determina la morbi-mortalidad en el paciente con FQ. Los individuos con FQ son altamente susceptibles a la infección bacteriana en el tracto respiratorio y es necesaria una antibioterapia intensiva para mantener la función pulmonar y la calidad de vida, con el fin de reducir las exacerbaciones en pacientes afectados. En este sentido, la antibioterapia busca erradicar *Pseudomonas aeruginosa*, el patógeno mayoritario en la FQ. Después de mejorar el tratamiento de la infección por esta bacteria y del tratamiento crónico de esta infección, la esperanza media de vida ha aumentado en las últimas décadas. En 1969, los enfermos de FQ en los países industrializados tenían una esperanza media de vida de 14 años, mientras que en 2010, ésta superaba los 40 años. Desgraciadamente, este desarrollo positivo no se ha observado en todos los países del

mundo y la edad media de muerte sigue siendo 20-30 años. El genotipo de la FQ, las diferentes maneras de tratar la enfermedad, entre ellas la infección, la selección de antibióticos y el modo de acción, así como los recursos del país y del propio paciente influyen en el desarrollo de la enfermedad (McCormick et al., 2010).

Se cree que las vías aéreas de pacientes con FQ no se infectan en el nacimiento y que son las bacterias patogénicas oportunistas las que entran en las vías aéreas procedentes del medio ambiente. Estas bacterias son capaces de establecerse eventualmente de manera crónica en algunas personas debido a una inmunidad innata insuficiente (Dios et al., 2016) y se asocia con una respuesta inflamatoria. Como ya se ha comentado, las bacterias más comunes en la enfermedad son *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Burkholderia*. Recientes estudios microbiológicos han demostrado que la infección de las vías aéreas por estos microorganismos es más complicada que lo que se aprecia normalmente en los métodos de cultivo, como se detallará más adelante. Aunque se cree que la mayoría de estas bacterias son patogénicas, nuestro conocimiento sobre cómo tratar cada una de ellas aún sigue incompleto, siendo el más conocido el de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria penetra en las vías aéreas inferiores presumiblemente mediante inhalación y puede infectar transitoriamente las vías aéreas en algunos pacientes con FQ (esto ocurre en un rango del 10-50%). Parece claro que algunos pacientes con esta enfermedad son capaces de aclarar el patógeno espontáneamente, presentando el resultado de los cultivos negativo (Döring et al., 2012). Sin embargo, el patógeno va a persistir o va a ser recurrente y se va a desarrollar eventualmente en una infección crónica, que se define como la presencia de colonias positivas repetidas y de anticuerpos positivos contra el patógeno (Döring et al., 2004). En este sentido, la definición de Leeds (Lee et al., 2003) clasifica a los pacientes en 4 grupos según el resultado del cultivo de las vías aéreas obtenido en los últimos 12 meses: “Infección crónica”, que se refiere a pacientes que han tenido más de un 50% de colonias positivas en los últimos 12 meses; “infección intermitente”, referida a pacientes con menos de un 50% de colonias positivas en los últimos 12 meses; “libre de la bacteria”, cuando los pacientes no presentan la bacteria en los 12 meses previos, a pesar de una historia previa de colonización con *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente, “Nunca infectado”, se refiere a pacientes en los que nunca se ha encontrado la bacteria (Lee et al., 2003).



La infección crónica resulta en una respuesta inflamatoria prolongada, que se cree que causa daño en el tejido pulmonar, llevando a una pérdida de la función pulmonar. Hay bastante evidencia que indica que la erradicación temprana y la prevención de la infección crónica se asocia con un beneficio clínico. De forma general, se ha observado que en pacientes jóvenes con FQ que no presentan infección por *Pseudomonas aeruginosa* y aquellos que siguen el tratamiento de erradicación, han preservado la función pulmonar (por espirometría), en contraste con el descenso de la función pulmonar en aquellos que presentan infección crónica (Kozłowska et al., 2008).

Los pacientes con FQ presentan exacerbaciones recurrentes de la enfermedad, que son episodios en los que hay un aumento en los síntomas de las infecciones crónicas pulmonares, particularmente tos y producción de esputo. Se asocian con fatiga respiratoria, reducción de la tolerancia al ejercicio y síntomas sistémicos asociados con una fase aguda inflamatoria.

## **8. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

El tratamiento de la enfermedad abarca el uso de fármacos para tratar tanto las causas como los síntomas.

Las dianas del tratamiento de los síntomas incluyen:

### **8.1. Aparato respiratorio**

El manejo de la enfermedad respiratoria siempre ha sido fundamental en el tratamiento de la enfermedad ya que el fallo respiratorio provocado por la infección constituye la segunda causa de muerte por esta enfermedad.

- ***Tratamiento antibiótico oral e inhalado***

En el caso de las exacerbaciones pulmonares, los antibióticos se suelen administrar de forma intravenosa, mientras que para tratamientos prolongados se emplean inhaladores o fármacos por vía oral (Döring et al., 2012).

Las fluoroquinolonas han demostrado eficacia como tratamiento antibiótico oral; entre ellas destacan ciprofloxacino y levofloxacino. Además, tobramicina (inhalatoria) y amikacina (intravenosa) han demostrado su efectividad en la prevención de las exacerbaciones pulmonares asociadas a las infecciones del tracto respiratorio, especialmente en aquellas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

No todos los antibióticos son igualmente válidos para todos los pacientes. La tobramicina y el aztreonam han sido modificados a la forma inhalada para el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* (Peng et al., 2017).

- ***Broncodilatadores***

De este grupo se emplean los  $\beta_2$  agonistas, que tienen un efecto directo en la relajación de la musculatura lisa y aumentan la frecuencia del barrido ciliar; sin embargo, el aumento de la viscosidad del esputo puede disminuir este último efecto, lo que hace que la respuesta a estos fármacos sea variable. Deberían usarse para realizar ejercicio y para pacientes que presenten sibilancias. Los fármacos más usados son salbutamol, y fenoterol o salbutamol en mezcla con bromuro de ipratropio.

Otro fármaco empleado es la teofilina, el cual es un alcaloide de la familia de las metilxantinas con efecto broncodilatador, estimulando el centro respiratorio. Se trata de un inhibidor de la fosfodiesterasa VI (enzima que degrada el AMPc intracelular), que incrementa los niveles de AMPc e induce la relajación del músculo liso bronquial, inhibiendo asimismo mediadores químicos a nivel mastocitario (Zhang et al., 2014). Sus dos acciones farmacológicas principales son la relajación del músculo liso bronquial (tanto a nivel central como periférico) y su acción antiinflamatoria, ya que inhibe la liberación de los mediadores químicos mastocitarios que participan en los mecanismos inflamatorios a nivel bronquial. Actualmente, se administra tanto por vía oral como por vía intravenosa; sin embargo, su rango terapéutico es muy estrecho y por ello, hay que ser cautos con la administración pulmonar; actualmente, se emplea la vía oral al ser más segura (Zhou et al., 2014).

- ***Esteroides orales e inhalatorios***

Existen algunas sugerencias que relacionan el defecto básico en la FQ y el inicio de la inflamación con la desregulación de la producción de citoquinas, lo que favorecería un proceso inflamatorio persistente. Para reducir dicha inflamación, se emplea por vía oral normalmente prednisona 1 mg / kg / día durante 5-7 días. Se recurre a la vía inhalatoria cuando los pacientes demuestren hiperreactividad bronquial, siendo entonces los fármacos más empleados: beclometasona, budesonida y fluticasona (Newman, 2018).

## **8.2. Aparato gastrointestinal**

En esta localización del organismo, la terapia se basa principalmente en prevenir o tratar las obstrucciones intestinales. Así, para rehidratar se emplean sueros, para obstrucciones

incompletas laxantes osmóticos, y para obstrucciones completas los preparados que se administran son enemas hiperosmolares. El tratamiento de los vómitos se lleva a cabo con una solución intestinal a base de electrolitos, o bien con un enema que contiene ditrizoato de meglumina o ditrizoato de sodio, según el estado. Para prevenir la recurrencia, se puede dar regularmente polietilenglicol 3350, el cual puede administrarse desde 6 meses hasta 1 año. La insuficiencia pancreática se trata con terapia pancreática enzimática de reemplazo, que contiene una combinación múltiple de proteasas, amilasas y lipasas (Davies et al., 2013; Rafeeq y Murad, 2017).

Globalmente, se recomienda prevenir la deshidratación y llevar una nutrición adecuada, con una dieta hipercalórica rica en grasas saludables, y suplementación de vitaminas A, D, E y K; y minerales, como fluoruro y cinc. La suplementación con cloruro sódico depende de la edad del paciente y de sus condiciones ambientales (Borowitz et al., 2009).

### **8.3. Tratamiento actual y perspectivas futuras**

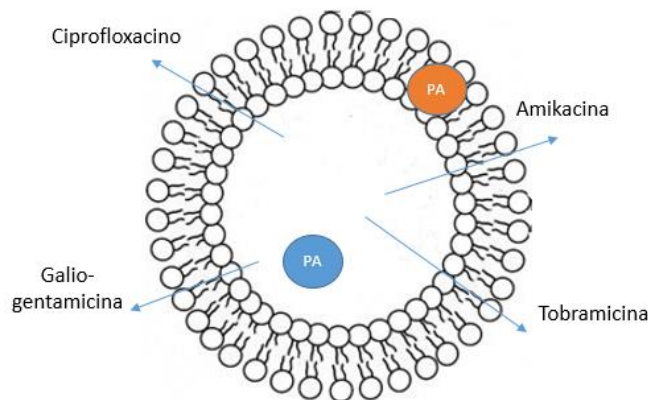
Las terapias actuales y las que tendrán éxito en un futuro próximo se basan principalmente en corregir las anomalías estructurales y funcionales del gen CFTR. Dentro de éstas destacan los moduladores de CFTR, los cuales son capaces de corregir el defecto básico de la FQ, el que ocurre en la proteína; sin embargo, el mecanismo exacto por el que actúan aún se desconoce. Entre estos fármacos, los más conocidos son: ivacaftor y lumacaftor. A pesar de que la llegada de estas moléculas ha mejorado el manejo de la FQ, sin embargo, no están exentos de ciertas limitaciones, entre las que se incluyen:

- Necesidad de medicación para el tratamiento de los síntomas.
- Interacción con inductores e inhibidores de CYP3A.
- Efectos secundarios que incluyen elevación de las transaminasas, cataratas y dolor orofaríngeo.
- Efecto casi nulo en niños menores de 12 años.
- Necesidad de dosis elevadas, sobre todo en el caso de lumacaftor (hasta 600 mg).
- Interacción mutua de lumacaftor e ivacaftor, que lleva a un aumento del metabolismo del ivacaftor, requiriéndose mayor dosis en el tratamiento combinado. Por otra parte, debido a la estructura multi-dominio y al plegado secuencial del CFTR, un único fármaco no puede corregir todos los defectos de los diferentes dominios, así que siempre es necesaria una combinación de

fármacos. Además, existen algunos agentes farmacéuticos para el tratamiento de los síntomas en desarrollo (Garbuzenko et al., 2019).

## 9. AVANCES EN EL USO DE LIPOSOMAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Como es bien conocido, los liposomas se han convertido en unos interesantes sistemas de vectorización de moléculas activas, a administrar por diferentes vías. Como ya se verá en el capítulo 1 de la presente memoria, éstos permiten la sencilla incorporación de fármacos lipofílicos en su interior o en la membrana. Además, la naturaleza anfifílica de la mayoría de lípidos empleados en su composición les permite formar varias estructuras e incorporar a su vez moléculas hidrofílicas (Figura 3).



**Figura 3.** Encapsulación de fármacos para la FQ en liposomas.

Estos nanotransportadores lipídicos pueden fabricarse a partir de lípidos biocompatibles, similares a los que componen la membrana pulmonar. Así, aparte de limitar su toxicidad, esto les permite penetrar fácilmente en células diferentes.

En términos de inhalación y liberación pulmonar, las partículas lipídicas pueden ser aerosolizadas fácilmente y son bien captadas por los pulmones permitiendo una retención más prolongada, como han demostrado algunos autores (Ivanova et al., 2013).

En la Tabla 5 se recopilan diferentes formulaciones nanoparticulares que se han estudiado para el tratamiento de la FQ, la mayoría centradas en erradicar o mejorar la enfermedad pulmonar, que se encuentran actualmente en estudio.

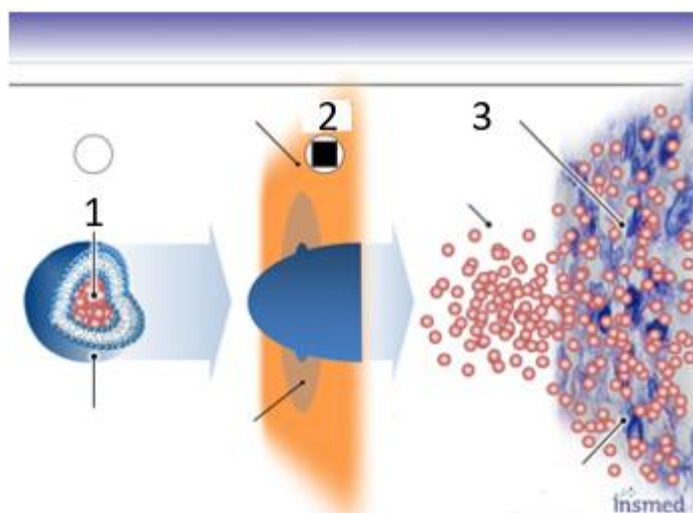
**Tabla 5.** Estudios en los que se usan liposomas para tratar la FQ.

Fármaco	Enfermedad que trata	Tipo de sistema de nebulización	Resultados obtenidos	Referencia
<b>Levofloxacin</b>	Infecciones crónicas de <i>P. aeruginosa</i>	Aerosol	Reducción de la infección en un 61-77% de los casos	(Geller, 2005)
<b>Gentamicina</b>	Infecciones crónicas de <i>P. aeruginosa</i>	Aerosol	Tratamiento con las formulaciones de liposomas podría ser más efectivo que el fármaco solo	(Mugabe et al., 2005)
<b>Aztreonam</b>	Infecciones provocadas por <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador eFlow®	Concentraciones sistémicas bajas, por lo que se requieren más estudios	(Gibson et al., 2006)
<b>Amikacina Arikace®, INSMED</b>	Infecciones crónicas de <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador e inhalador	Mejora de infecciones crónicas de pulmón	(Meers et al., 2008)
<b>Amikacina eFlow®</b>	Infecciones crónicas de <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador	Mejora de la infección crónica	(Okusanya et al., 2009)
<b>Vector plásmido (pGM169)</b>	Modulador del gen CFTR	Aerosol	Pocos efectos adversos y reducción de inflamación. Futuro uso en humanos.	(Alton et al., 2013)
<b>Colestimetato de sodio (Colomycin®)</b>	Mejora de la terapia antimicrobiana para <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador de malla vibrante	Las partículas demostraron una buena distribución <i>in vivo</i> mejorando el tratamiento antibacteriano	(Pastor et al., 2014)
<b>Plásmido de ADN que codifica el gen CFTR</b>	Restauración de la función de la proteína CFTR	Nebulizador activado por respiración	Estabilización de la función pulmonar	(Alton et al., 2015)
<b>Tobramicina</b>	Infecciones del tracto respiratorio provocadas por <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador	Mejora de la alternativa de la encapsulación comparada con el fármaco en solitario	(Moreno-Sastre et al., 2016)
<b>Calcifediol</b>	Prevención de la enfermedad pulmonar provocada por <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador tipo “jet”	Los excipientes mostraron no tener efectos adversos y el fármaco se presentó como alternativa para prevenir la infección	(Castoldi et al., 2017)
<b>Tobramicina (TOBI®)</b>	Mejora de la terapia antimicrobiana para <i>P. aeruginosa</i>	Nebulizador	Los datos demuestran una baja biodisponibilidad de la tobramicina en el pulmón	(Mashat et al., 2017)
<b>Ciprofloxacino (Pulmaquin®)</b>	Conseguir la liberación sostenida del fármaco para el tratamiento de infecciones pulmonares	Aerosol	Liberación prolongada de ciprofloxacino desde las formulaciones	(Khatib et al., 2019)
<b>Lumacaftor e ivacaftor</b>	Mejora y regulación del gen / proteína CFTR aumentando el número de canales y su amplitud.	Inhalador	Mejora de la regulación, con respecto a los dos fármacos sin encapsular	(Garbuzenko et al., 2019)
<b>Amikacina y tobramicina</b>	Infección pulmonar por <i>P. aeruginosa</i>	Suspensión para inhalación	Disminución de la densidad del esputo y mejora de síntomas respiratorios	(Bilton et al., 2019)

- **Amikacina**

Como se ha referido anteriormente, los liposomas son vesículas biodegradables compuestas por una o varias bicapas lipídicas, que pueden proteger a los antibióticos policatiónicos encapsulados, como los aminoglucósidos, de la inactivación por los componentes polianiónicos presentes en el esputo, como la mucina, o el ADN.

En las vías aéreas, los liposomas pueden ser captados por los macrófagos alveolares. Teniendo en cuenta esta consideración, aparece en el mercado amikacina liposomal desarrollada para inhalación (Arikace<sup>®</sup>, INSMED), compuesta por liposomas con carga neutra, y que ha sido desarrollado para mejorar la penetración del aminoglucósido en el moco y en los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Okusanya et al., 2009), como se recoge en la Figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo de acción de Arikace<sup>®</sup>. 1: el fármaco con carga neutra se encuentra dentro del núcleo hidrofílico del liposoma. 2: la barrera pulmonar y el moco de las vías aéreas presentan carga negativa, mientras que Arikace<sup>®</sup> tiene carga neutra, lo que permite la rápida circulación a través de biofilms y del moco. 3: una vez que el liposoma llega al sitio de acción, las bacterias liberan una serie de agentes que provocan la lisis del liposoma y, por lo tanto, la salida del antibiótico (adaptada de Clancy et al., 2013).

Los ensayos clínicos llevados a cabo con este fármaco, el cual fue liberado con el sistema nebulizador eFlow<sup>®</sup>, revelaron que se producía una liberación sostenida a los pulmones. La farmacocinética clínica y la farmacodinámica de este fármaco fueron evaluadas en estudios en fase Ib en 24 pacientes con FQ e infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales recibieron 500 mg de Arikace<sup>®</sup> una vez al día durante 14 días. Los ensayos clínicos de fase II randomizados, con control de placebo en pacientes con

infección crónica de *Pseudomonas aeruginosa* en una dosis de 560 mg una vez al día durante 28 días consecutivos, seguidos de 28 días de descanso, mostraron un beneficio clínico mayor que con el placebo, reduciendo la densidad de del biofilm y mejorando la función pulmonar. Además, los enfermos mejoraron sus síntomas respiratorios y el fármaco fue bien tolerado (Clancy et al., 2013).

- ***Tobramicina***

Este fármaco forma parte del grupo de medicamentos aprobados en la Unión Europea y en EEUU para el tratamiento crónico de las infecciones de pulmón por *Pseudomonas aeruginosa*. El medicamento, constituido por una solución de liposomas que encapsula tobramicina, es seguro y eficaz en pacientes con FQ mayores de 6 años. Las guías terapéuticas de EEUU recomiendan el uso crónico de este fármaco en pacientes que presenten enfermedad pulmonar moderada-grave con cultivos positivos persistentes de la bacteria. De hecho, las guías europeas recomiendan el tratamiento intermitente (meses alternativos) del fármaco inhalado.

Se encuentra comercializado con el nombre de Tobi<sup>®</sup> y consiste en un inhalador de polvo seco que ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* y puede ayudar a aliviar los síntomas. Los estudios llevados a cabo muestran la misma eficacia que con la solución inhalada. Sin embargo, este dispositivo se considera fácil de usar por parte de los pacientes, requiriendo menos dosis y no necesitando ser desinfectado (Figura 5).



**Figura 5.** Dispositivo Tobi<sup>®</sup> (adaptado de Griese et al., 2014).

Todas estas circunstancias hacen que la adherencia al tratamiento sea mayor. Adicionalmente, se demuestra en estos estudios que se trata de un fármaco totalmente

seguro y bien tolerado, a pesar del efecto adverso más importante que es la producción de tos, mostrando un perfil adecuado en estudios en fase III.

- **Ciprofloxacino**

Se trata de una fluoroquinolona que afecta a la función de la enzima girasa en bacterias, y ha sido ampliamente empleado por vía oral en pacientes con FQ y otras patologías. Se ha demostrado que la aerosolización de liposomas de este fármaco en cerdos guinea previenen la muerte de estos animales por *Legionella pneumophila* y *Francisella tularensis*, sugiriendo que la liberación de estos fármacos al tracto respiratorio inferior podría ser efectiva para los pacientes con FQ (Hamblin et al., 2014).

Existen dos tipos de formulaciones liposomales de ciprofloxacino: Lipoquin® (Aradigm, Inc., Hayward, CA), con un 99% de ciprofloxacino encapsulado, y otra denominada Pulmaquin® (Aradigm, Inc., Hayward, CA), con un 70% de ciprofloxacino encapsulado y un 30% no encapsulado. Ambas han demostrado ser prometedoras para el tratamiento vía inhalatoria de la FQ (Cipolla et al., 2016). Como el ciprofloxacino no encapsulado es poco soluble a pH 6.0, se preparan dos viales para esta formulación: uno con el encapsulado y otro con el no encapsulado.



**Figura 6.** Formulación de Pulmaquin® (adaptado de Cipolla et al., 2016).

Estas formulaciones han demostrado ser eficaces para tratar infecciones pulmonares causadas por *Yersinia pestis* y la fiebre Q. Ambas soluciones fueron aerosolizadas convenientemente, manteniendo la integridad del liposoma ya que la formación de



cristales del fármaco a largo plazo podría reducir su estabilidad mecánica (Cipolla et al., 2016).

- ***Galio - Gentamicina***

El galio, un metal parecido al hierro, ha demostrado inhibir de alguna manera el crecimiento bacteriano de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*. Los estudios *in vitro* han demostrado que una formulación conjunta de galio-gentamicina fue capaz de eliminar los biofilms de esta bacteria y bloqueó la comunicación bacteriana (*quorum sensing*). Empleando concentraciones muy bajas de gentamicina (0.94 mg/L), esta demostró ser más eficaz que la que contenía el antibiótico en solitario. Por tanto, el galio sigue siendo investigado por su potencial para el tratamiento de infecciones bacterianas en la FQ (Halwani et al., 2008).

- ***Lumacaftor e ivacaftor***

Otro enfoque diferente en el tratamiento de esta enfermedad se basa en tratar la causa fundamental de la enfermedad, dirigiéndose hacia la disfunción de la proteína CFTR (Zhang et al., 2018). El tratamiento consiste básicamente en dos aspectos: corrección de los defectos celulares y potenciar que el canal se abra más. Para ello, se propuso la combinación de dos fármacos con diferentes mecanismos de acción que pueden ser aplicados simultáneamente en el tratamiento de la FQ. Uno de los fármacos es el lumacaftor (Luma), el cual ha demostrado corregir el fenotipo Phe508del del gen CFTR aumentando la cantidad de células de superficie (Griesenbach y Alton, 2015). El otro fármaco es ivacaftor (Iva), un potenciador del CFTR que aumenta la probabilidad de que se abran los canales ya que estudios *in vitro* han demostrado que potencia el fenotipo Phe508del del gen CFTR. Así, la combinación de ambos fármacos ha demostrado asociarse con un aumento del transporte del ión cloruro que no puede ser logrado con cada fármaco en solitario. Por ello, la nanoencapsulación de ambos demostró ser interesante para su administración vía pulmonar, ya que la liberación directa a pulmón puede aumentar su eficacia y reducir sus efectos adversos (Garbuzenko et al., 2019).

## **10. CONCLUSIONES**

- Actualmente, los tratamientos para la FQ se basan en atender los aspectos sintomatológicos. Un aspecto interesante para el futuro sería el desarrollar fármacos que traten el defecto en el gen CFTR.

- La vía pulmonar es idónea para la administración de fármacos por su elevada área superficial (100 m<sup>2</sup>), su extensa vasculatura y, por tanto, su elevada absorción. Sin embargo, el aclaramiento por parte de los macrófagos hace que a veces no todas las formulaciones puedan administrarse por esta vía.
- Los liposomas permiten la incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, pudiendo fabricarse éstos a partir de lípidos biocompatibles, similares a los que componen la membrana y el surfactante pulmonar. Además, las partículas lipídicas pueden ser aerosolizadas fácilmente y son bien captadas por los pulmones, permitiendo una retención más prolongada.
- Entre los sistemas nanoparticulares existentes para la liberación de fármacos vía pulmonar para el tratamiento de la FQ, la mayoría se componen de un único fármaco, que suelen ser un antibiótico. Se propone en un futuro la coencapsulación de fármacos que permita tratar otro tipo de sintomatología y los defectos en el gen CFTR.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Alton, EFWF, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, Boyd AC. 2015. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 3(9):684–91. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00245-3).

Alton EFWF, Baker A, Baker E, Boyd AC, Cheng SH, Coles RL, Collie DDS. 2013. The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep. *Biomaterials* 34(38):10267–77. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.023>.

Barley M, McNally J, Marshall B, Faro A, Elbert A, Fink A, Sewall A. 2016. Annual data report 2016 cystic fibrosis foundation patient registry. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry* 1–92.

Barreiro T, Marín JL. 2015. Fibrosis quística: detección bioquímica y diagnóstico molecular. *Revista del Laboratorio Clínico* 8(2):82–91. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2015.04.002>.

Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, Castaldo G. 2009. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 302(10):1076. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1295>.

Bilton D, Pressler T, Fajac I, Clancy JP, Sands D, Minic P, Cipolli M. 2019. Amikacin liposome inhalation suspension for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal*

of *Cystic Fibrosis*, August. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.08.001>.

Bono-Neri F, Romano C, Isedeh A. 2018. Cystic fibrosis: advancing along the continuum. *Journal of Pediatric Health Care* 33(3):242–54. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2018.08.008>.

Borowitz D, Robinson KA, Rosenfeld M, Davis SD, Sabadosa KA, Spear SL, Michel SH. 2009. Cystic fibrosis foundation evidence-based guidelines for management of infants with cystic fibrosis. *Journal of Pediatrics* 155(6):S73–93. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.09.001>.

Bowen SJ, Hull J. 2015. The basic science of cystic fibrosis. *Paediatrics and Child Health* 25(4):159–64. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2014.12.008>.

Brennan ML, Schrijver I. 2016. Cystic fibrosis: a review of associated phenotypes, use of molecular diagnostic approaches, genetic characteristics, progress, and dilemmas. *Journal of Molecular Diagnostics* 18(1):3–14. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.06.010>.

Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, Elborn JS and ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. 2015. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 european countries. *European Respiratory Journal* 46(1):133–41. <https://doi.org/10.1183/09031936.00196314>.

Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, Boucher RC, Rubinstein M. 2012. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 337(6097):937–41. <https://doi.org/10.1126/science.1223012>.

Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Roelse JD, Duff A, Farrell M, Mehta A. 2009. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis* 8(3):153–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.01.004>.

Castoldi A, Herr C, Niederstraßer J, Labouta HI, Melero A, Gordon S, Schneider-Daum N, Bals R, Lehr CM. 2017. Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 118:62–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.026>.

Cipolla D, Blanchard J, Gonda I. 2016. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010006>.

Clancy JP, Dupont L, Konstan MW, Billings J, Fustik S, Goss CH, Lymp J. 2013. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax* 68(9):818–25. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202230>.

Cohen-Cymerknoh M, Shoseyov D, Kerem E. 2011. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *American Journal of Respiratory and Critical*

- Care Medicine* 183(11):1463–71. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1478CI>.
- Colombo C, Ellemunter H, Houwen R, Munck A, Taylor C, Wilschanski M. 2011. Guidelines for the diagnosis and management of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 2:S24-8. . [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(11\)60005-2](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(11)60005-2).
- Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, Heijerman H. 2014. European cystic fibrosis society standards of care: framework for the cystic fibrosis centre. *Journal of Cystic Fibrosis* 13:S3–22. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.009>.
- Cooney A, McCray P, Sinn P. 2018. Cystic fibrosis gene therapy: looking back, looking forward. *Genes* 9(11):538. <https://doi.org/10.3390/genes9110538>.
- Courville CA, Tidwell S, Liu B, Accurso FJ, Dransfield MT, Rowe SM. 2014. Acquired defects in CFTR-dependent  $\beta$ -adrenergic sweat secretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 15(1):25. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-25>.
- Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, Mainz JG. 2013. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a g551d mutation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (11):1219–25. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0153OC>.
- Davis PB. 2015. Another beginning for cystic fibrosis therapy. *New England Journal of Medicine* 373(3):274–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1504059>.
- Davison S. 2018. Assessment of liver disease in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*. WB Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.05.010>.
- Debray D, Narkewicz MR, Bodewes FAJA, Colombo C, Housset C, de Jonge HR, Jonker JW. 2017. Cystic fibrosis-related liver disease: research challenges and future perspectives. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 65(4):443–48. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001676>.
- De Souzaa DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, Sotomaior VS, Raskina S. 2017. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Physiology & Behavior* 176(3):139–48. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- Dios J, Royuela A, Solé A, Máiz L, Casilda O, Quintana-Gallego E, de Gracia J. 2016. Bronchopulmonary infection – colonization patterns in spanish cystic fibrosis patients: results from a national multicenter study. *Journal of Cystic Fibrosis* 15(3):357–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.004>.

- Döring G, Flume P, Heijerman H, Stuart-Elborn J. 2012. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *Journal of Cystic Fibrosis* 11(6):461–79. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.10.004>.
- Döring G, Niels H. 2004. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a european consensus.” *Journal of Cystic Fibrosis* 3(2):67–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.03.008>.
- Dziekiewicz MA, Banaszkiwicz A, Urzykowska A, Lisowska A, Marta R, Sands D, Walkowiak J, Radzikowski A, Albrecht P. 2015. Gastroesophageal reflux disease in children with cystic fibrosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 873:1–7. Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2015\\_154](https://doi.org/10.1007/5584_2015_154).
- Elborn, S. 2003. Cystic fibrosis. *The Lancet* 373(9678):1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28047-1.00220-1>.
- Escobar MA, Jay L, Grosfeld J, Burdick J, Powell RL, Colleen LJ, Wait AD, West KW. 2005. Surgical considerations in cystic fibrosis: A 32-year evaluation of outcomes. *Surgery* 138(4):560–72. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.06.049>.
- Garbuzenko OB, Kbah N, Kuzmov A, Pogrebnyak N, Pozharov V, Minko T. 2019. Inhalation treatment of cystic fibrosis with lumacaftor and ivacaftor co-delivered by nanostructured lipid carriers. *Journal of Controlled Release* 296(1):225–31. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.025>.
- Geller DE. 2005. Comparing clinical features of the nebulizer, metered-dose inhaler, and dry powder inhaler. *Respiratory Care* 50(10):1313–21; discussion 1321–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185367>.
- Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Oermann C, Milla C, Pilewski J, Daines C, Ahrens R. 2006. Microbiology, safety and pharmacokinetics of aztreonam lysinate for inhalation in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 41(7):656–65. <https://doi.org/10.1002/ppul.20429>.
- Ginderdeuren FV, Van Cauwelaert F, Malfroot A. 2006. Influence of digital clubbing on oxygen saturation measurements by pulse-oximetry in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 5(2):125–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.01.007>.
- Goetzinger KR. 2017. Cystic fibrosis. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care: Second Edition* 44(5):579-581. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44548-1.00141-8>.
- Graeber SY, Zhou-Suckow Z, Schatterny J, Hirtz S, Boucher RC, Mall MA. 2013. Hypertonic saline is effective in the prevention and treatment of mucus obstruction, but not airway

inflammation, in mice with chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49(3):410–17. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0050OC>.

Griese M, Eismann C, Börner G, Denk O, Schierholz JM, Keller M, Mazurek H, Kappler M. 2014. A pharmacokinetics and safety comparison of a highly concentrated tobramycin solution with TOBI. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 27(3):185–92. <https://doi.org/10.1089/jamp.2012.1022>.

Griesenbach U, Alton EFWF. 2015. Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction. *F1000Prime Reports* 7:64. <https://doi.org/10.12703/P7-64>.

Halwani MB, Yebio Z, Suntres E, Alipour M, Azghani AO, Omri A. 2008. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(6):1291–97. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn422>.

Hamblin KA, Armstrong SJ, Barnes KB, Davies C, Wong JP, Blanchard JD, Harding SV, Simpson AJH, Atkins HS. 2014. Liposome encapsulation of ciprofloxacin improves protection against highly virulent *Francisella tularensis* strain Schu S4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(6):3053–59. <https://doi.org/10.1128/AAC.02555-13>.

Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. 2009. *Pseudomonas Aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends in Microbiology* 17(3):130–38. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.003>.

Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai LH, Leigh MV, De Maria GC. 2014. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *Journal of Clinical Investigation* 124(7):3047–60. <https://doi.org/10.1172/JCI73469>.

Hort A, Hameed A, Middleton PG, Pleass HC. 2019. Distal intestinal obstruction syndrome: an important differential diagnosis for abdominal pain in patients with cystic fibrosis. *ANZ Journal of Surgery* July. <https://doi.org/10.1111/ans.15357>.

Houwen RH, Van Der Doef HP, Sermet I, Munck A, Hauser B, Walkowiak J, Robberecht E, Colombo C, Sinaasappel M, Wilschanski M. 2009. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50(1):38–42. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a6e01d>.

Ivanova V, Garbuzenko OB, Reuhl KR, Reimer DC, Pozharov VP, Minko T. 2013. Inhalation treatment of pulmonary fibrosis by liposomal prostaglandin E2. *European Journal of*

Keiser NW, Nicholas W, Birket SE, Evans IA, Tyler SR, Crooke AK, Sun X, Zhou W, Nellis JR, Stroebele EK, Chu EK, Tearney GJ, Stevens KJ, Kirk HJ, Rowe SM, Engelhardt SM. 2015. Defective innate immunity and hyperinflammation in newborn cystic fibrosis transmembrane conductance regulator–knockout ferret lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 52(6):683–94. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0250OC>.

Khatib I, Khanal D, Ruan J, Cipolla D, Dayton F, Blanchard JD, Chan HK. 2019. Ciprofloxacin nanocrystals liposomal powders for controlled drug release via inhalation. *International Journal of Pharmaceutics* 566(7):641–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.068>.

Kim KJ, Fandy TE, Lee VHL, Ann DK, Borok Z, Crandall ED. 2004. Net absorption of IgG via FcRn-mediated transcytosis across rat alveolar epithelial cell monolayers. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287(3):L616–22. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00121.2004>.

Kozłowska WJ, Bush A, Wade A, AurorPa , Carr SB, Castle RA, Hoo AF. 2008. Lung function from infancy to the preschool years after clinical diagnosis of cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178(1):42–49. <https://doi.org/10.1164/rccm.200710-1599OC>.

Larkin A, Chang M, Whitworth G, Imperiali B. 2015. Origins of cystic fibrosis lung disease. *New England Journal of Medicine* 9(6):367–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1300109.Origins>.

Layer P, Kashirskaya N, Gubergrits N. 2019. Contribution of pancreatic enzyme replacement therapy to survival and quality of life in patients with pancreatic exocrine insufficiency. *World Journal of Gastroenterology* 25(20):2430–41. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i20.2430>.

Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. 2003. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 2(1):29–34. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(02\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(02)00141-8).

Levy H, Farrell PM. 2015. New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 166(6):1337–41. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.03.042>.

Maqbool A, Pauwels A. 2017. Cystic Fibrosis and gastroesophageal reflux disease. *Journal of Cystic Fibrosis* 16(11):S2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.07.007>.

Mashat M, Clark BJ, Assi KH, Chrystyn H. 2017. Assessment of recent nebulizer delivery systems using urinary pharmacokinetics method and aerodynamic characteristics of TOBI®

nebulized dose following inhalation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39(6):428–34. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.007>.

Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW. 2009. A european consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 8(1):71–78. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2008.09.005>.

McCloskey M, Redmond AO, Hill A, Elborn JS. 2000. Clinical features associated with a delayed diagnosis of cystic fibrosis. *Respiration* 67(4):402–7. <https://doi.org/10.1159/000029538>.

McCormick J, Mehta G, Olesen HV, Viviani L, Macek M, Mehta A. 2010. Comparative demographics of the european cystic fibrosis population: A cross-sectional database analysis. *The Lancet* 375(9719):1007–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62161-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62161-9).

McKone EF, Velentgas P, Swenson AJ, Goss CH. 2015. Association of sweat chloride concentration at time of diagnosis and CFTR genotype with mortality and cystic fibrosis phenotype. *Journal of Cystic Fibrosis* 14(5):580–86. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.01.005>.

Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, Kurumunda R, Mackinson C, James G, Fisher S, Perkins WR. 2008. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(4):859–68. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn059>.

Moreno-Sastre M, Pastor M, Esquisabel A, Sans E, Viñas M, Fleischer A, Palomino E, Bachiller D, Pedraz JL. 2016. Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics* 498(1–2):263–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.028>.

Mugabe C, Azghani AO, Omri A. 2005. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(2):269–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh518>.

Newman SP. 2018. Delivering drugs to the lungs: the history of repurposing in the treatment of respiratory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 133:5–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.010>.

O’Grady KAF, Cripps AW, Grimwood K. 2018. Paediatric and adult bronchiectasis: vaccination in prevention and management. *Respirology* 24(2):107–114. <https://doi.org/10.1111/resp.13446>.

Okusanya OO, Bhavnani SJ, Hammel J, Minic P, Dupont LJ, Forrest A, Mulder GJ, Mackinson



C, Ambrose PG, Gupta R. 2009. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of liposomal amikacin for inhalation in cystic fibrosis patients with chronic pseudomonal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(9):3847–54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00872-08>.

Olivier AK, Gibson-Corley KN, Meyerholz DK. 2015. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. animal models of cystic fibrosis: gastrointestinal, pancreatic, and hepatobiliary disease and pathophysiology. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 308(6):G459-71. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00146.2014>.

Palma AG, Kotsias BA, Marino GI. 2014. CFTR and ENaC Functions in cystic fibrosis. *Medicina* 74(2):133–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736260>.

Palomaki GE, FitzSimmons SC, Haddow JE. 2004. Clinical Sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR Carrier testing in a united states panethnic population. *Genetics in Medicine* 6(5):405–14. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000139505.06194.39>.

Parkins MD, Parkins VM, Rendall JC, Elborn S. 2011. Changing Epidemiology and clinical issues arising in an ageing cystic fibrosis population. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 5(2):105–19. <https://doi.org/10.1177/1753465810386051>.

Pastor M, Moreno-Sastre M, Esquisabel A, Sans E, Viñas M, Bachiller D, Asensio VJ, Del Pozo A, Gainza E, Pedraz JL. 2014. Sodium Colistimethate loaded lipid nanocarriers for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics* 477(1–2):485–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.048>.

Peng J, Cao J, Ng FM, Hill J. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Develops ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes 152:75-87. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.005>.

Poole LA, Lewis AJ, Toumbourou JV, Knight T, Bertino MD, Pryor R. 2016. A Multi-family group intervention for adolescent depression: The BEST MOOD Program. *Family Process* 56(2):317-330. <https://doi.org/10.1111/famp.12218>.

Quinton PM. 2007. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology* 22:212-25. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2006>.

Rab A, Rowe SM, Raju SV, Bebok Z, Matalon S, Collawn JF. 2013. Cigarette Smoke and CFTR: Implications in the Pathogenesis of COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305(8):L530–41. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00039.2013>.

Rafeeq MM, Murad HAS. 2017. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future

approaches. *Journal of Translational Medicine* 15:84 <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>.

Ramsey KA, Ranganathan S, Park J, Skoric B, Adams AM, Simpson SJ, Robins-Browne RM. 2014. Early respiratory infection is associated with reduced spirometry in children with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190(10):1111–16. <https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1277OC>.

Regard L, Lavoie H, Martin C, Chassagnon G, Burgel PR. 2018. Ageing with cystic fibrosis: classical and emerging comorbidities in adults with cystic fibrosis. *Revue de Pneumologie Clinique* 74(5):279-291. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2018.09.012>.

Salinas DB, Kang L, Colleen A, and Quinton P. 2017. Low beta-adrenergic sweat responses in cystic fibrosis and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 30(1):2–6. <https://doi.org/10.1089/ped.2016.0662>.

Sathe M, Houwen R. 2017. Meconium ileus in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 16(11):S32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.007>.

Singh VK, Schwarzenberg SJ. 2017. Pancreatic insufficiency in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 16:S70–78. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.011>.

Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, Kashirskaya N. 2014. European cystic fibrosis society standards of care: best practice guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis* 13(5):S23–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.010>.

Van Devanter DR, Kahle JS, O’Sullivan AK, Sikirica S, Hodgkins PS. 2016. Cystic fibrosis in young children: a review of disease manifestation, progression, and response to early treatment. *Journal of Cystic Fibrosis* 15(2):147–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.008>.

WaterS V, Smyth A. 2015. Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. *Journal of Cystic Fibrosis* 14(5):551–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.02.005>.

White H, Morton AM, Conway SP, Peckham DG. 2013. Enteral tube feeding in adults with cystic fibrosis; patient choice and impact on long term outcomes. *Journal of Cystic Fibrosis* 12(6): 616–22. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.05.003>.

Yen EH, Quinton H, Borowitz D. 2013. Better nutritional status in early childhood is associated with improved clinical outcomes and survival in patients with cystic fibrosis. *Journal of Pediatrics* 162(3):530-535 <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.08.040>.

Zhang S, Shrestha CL, Kopp BT. 2018. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

(cfr) modulators have differential effects on cystic fibrosis macrophage function. *Scientific Reports* 8(1):17066. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35151-7>.

Zhang X, Liu Q, Hu J, Xu L, Tan W. 2014. An aerosol formulation of r-salbutamol sulfate for pulmonary inhalation. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 4(1):79–85. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.010>.

Zhou QT, Leung SSY, Tang P, Parumasivam T, Loh ZH, Chan HK. 2014. inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections. *Advanced Drug Delivery Reviews* 85:83-99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.022>.

# CAPÍTULO I

El principal objetivo de este capítulo consistió en formular un sistema liposomal que incorporara teofilina y ciprofloxacino en una misma formulación para una futura aplicación en el tratamiento de los síntomas de la fibrosis quística. Los liposomas fueron preparados usando un método de carga remota. Tras analizar la influencia de cuatro fármacos diferentes en las propiedades físico-químicas de los liposomas, y de seleccionar teofilina como candidato idóneo para este método, se añadió ciprofloxacino, evaluándose la influencia de diferentes sales de amonio a diferentes pH en la eficacia de encapsulación de ambos fármacos en la formulación final. Después de analizar diversas variables con el fin de optimizar la formulación final, los liposomas correspondientes a la formulación optimizada mostraron un tamaño medio de 174 nm y potencial zeta de -16.6 mV. La obtención de una mejora del porcentaje de fármaco encapsulado con respecto al método utilizado habitualmente en nuestro grupo de investigación (TLE), 90% y 50.9% *versus* 61.3 y 34.3%, para teofilina y ciprofloxacino, respectivamente, nos permite concluir que el método transmembrana empleando un gradiente de acetato amónico podría ser útil para co-encapsular un ácido y una base débil en una misma vesícula lipídica.

Los estudios de viabilidad celular de las formulaciones concluyendo que para evitar la toxicidad de éstas se requiere el uso de menor cantidad de lípidos y una mayor encapsulación. Se redujo la concentración de lípidos a un 75 y 50%, aumentando la viabilidad celular a la vez que se mantuvo la eficacia de encapsulación.

## ÍNDICE DEL CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.....	56
1.1. Concepto y métodos convencionales de elaboración de liposomas .....	56
1.1.1. Métodos convencionales para preparar vesículas gigantes unilaminares (GUV).....	58
1.1.2. Métodos convencionales para preparar vesículas multilaminares (MLV) ...	60
1.1.3. Métodos convencionales para preparar vesículas unilaminares pequeñas y grandes (SUV y LUV).....	61
1.2. Método de gradiente transmembrana .....	64
1.2.1. Factores que influyen en el método .....	66
1.3. Fármacos en estudio .....	71
1.3.1. Teofilina .....	71
1.3.2. Ciprofloxacino .....	72
1.4. Hipótesis y objetivos .....	73
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	75
2.1. Productos y reactivos.....	75
2.2. Preparación de los liposomas .....	76
2.2.1 Método pasivo de carga por evaporación en capa fina (TLE).....	76
2.2.2. Método activo de carga por gradiente transmembrana.....	77
2.3. Caracterización de las formulaciones .....	79
2.3.1. Parámetros dimensionales .....	79
2.3.2. Carga superficial.....	79
2.3.3. Intercambio de iones.....	80
2.3.4. Porcentaje de encapsulación (PdE) .....	81
2.4. Co-encapsulación de ciprofloxacino y teofilina en vesículas lipídicas por método transmembrana.....	83
2.4.1 Estudios de solubilidad en diferentes sales de amonio.....	83
2.4.2. Optimización del proceso .....	83
2.5. Estudios de viabilidad celular en cultivos celulares .....	84
2.5.1. Evaluación de la actividad metabólica celular mediante el ensayo del MTT .....	84
2.5.2. Evaluación de la integridad de la membrana (Test de lactato deshidrogenasa) .....	86
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	87
3.1. Estudios preliminares sobre el método .....	87
3.2. Efecto de las características físico-químicas del fármaco .....	90
3.3. Efecto de la deformabilidad en la carga del fármaco .....	93
3.4. Co-encapsulación de teofilina y ciprofloxacino .....	94

3.4.1. Efecto de las sales de amonio en la solubilidad de los fármacos .....	95
3.4.2. Efecto de la concentración de fármaco.....	98
3.4.3. Efecto del NaCl como medio externo no tamponador y extrusión antes de cargar .....	100
3.4.4. Carga remota transmembrana versus TLE .....	102
3.5. Evaluación de la viabilidad celular.....	102
3.3.1. Evaluación de la viabilidad celular de las formulaciones con el 100% de fosfolípidos .....	103
3.3.2. Evaluación de la viabilidad celular de las formulaciones con el 75% y 50% de fosfolípidos .....	111
4. CONCLUSIONES.....	115
5. BIBLIOGRAFÍA .....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de un liposoma y su composición .....	56
<b>Figura 2.</b> Tipos de liposomas según tamaños y número de bicapas .....	57
<b>Figura 3.</b> Vesículas gigantes unilaminares .....	58
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la formación de GUVs en una estructura tipo “sandwich”.....	59
<b>Figura 5.</b> Formación de GUVs por la unión de vesículas más pequeñas .....	59
<b>Figura 6.</b> Método de evaporación en capa fina (TLE).....	60
<b>Figura 7.</b> Proceso de elaboración de proliposomas. ....	61
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la técnica de evaporación en fase inversa ...	62
<b>Figura 9.</b> Imagen del extrusor empleado en nuestro grupo de investigación Lipex® Thermobarrel. ....	64
<b>Figura 10.</b> Carga del fármaco en las vesículas mediante el método transmembrana ....	65
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la teofilina. ....	71
<b>Figura 12.</b> Estructura química de ciprofloxacino. ....	73
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática del método TLE. ....	77
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática del proceso de elaboración de los liposomas por gradiente transmembrana.....	78
<b>Figura 15.</b> Cambios en el color del azul de bromotimol (ABT) con el aumento de pH	81
<b>Figura 16.</b> Reacción del NADH. ....	84
<b>Figura 17.</b> Representación esquemática de la placa de cultivo .....	86
<b>Figura 18.</b> Medidas de conductividad en el medio receptor externo, fuera de las membranas de diálisis con respecto al tiempo.....	88
<b>Figura 19.</b> Diferentes soluciones de azul de bromotimol (ABT) a distintos pH. ....	89
<b>Figura 20.</b> Muestras centrifugadas antes (derecha) y después (izquierda) del proceso de la diálisis. ....	89
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de fármaco encapsulado (PdE) en los lotes analizados. ....	91
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de TEO solubilizada usando diferentes sales de amonio a pH 4 y pH 7. ....	96
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de CIP solubilizado usando diferentes sales de amonio a pH 4 y pH 7. ....	96
<b>Figura 24.</b> Representación esquemática del intercambio iónico para TEO y CIP en el método transmembrana.....	97
<b>Figura 25.</b> Eficacias de encapsulación de los lotes preparados con TEO. ....	99
<b>Figura 26.</b> Eficacia de encapsulación (PdE) de los lotes preparados con CIP. ....	99
<b>Figura 27.</b> Eficacia de encapsulación (PdE) de los lotes que contenían ambos fármacos. ....	101
<b>Figura 28.</b> Viabilidad celular de los fármacos en estudio para 3 horas. ....	105
<b>Figura 29.</b> Viabilidad celular de los liposomas con el 100% de fosfolípidos cargados con los fármacos en estudio para 3 horas. ....	105
<b>Figura 30.</b> Viabilidad celular de los fármacos en estudio para 24 horas. ....	106
<b>Figura 31.</b> Viabilidad celular de los liposomas con el 100% de fosfolípidos cargados con los fármacos en estudio para 24 horas. ....	107
<b>Figura 32.</b> Ensayo MTT de las formulaciones con el 100% de fosfolípidos. ....	110
<b>Figura 33.</b> Viabilidad celular del lote 1 (75% de FL) en estudio para 3 horas.....	112

<b>Figura 34.</b> Viabilidad celular del lote 2 (50% de FL) en estudio para 3 horas.....	112
<b>Figura 35.</b> Viabilidad celular del lote 1 (75% de FL) en estudio para 24 horas.....	113
<b>Figura 36.</b> Viabilidad celular del lote 2 (50% de FL) en estudio para 24 horas.....	114
<b>Figura 37.</b> Ensayo MTT de las formulaciones con el 75% y el 50% de fosfolípidos.	115

### ÍNDICE DE TABLAS:

<b>Tabla 1.</b> Aumento de la eficacia de encapsulación (EE) de los fármacos a medida que aumenta la basicidad.....	67
<b>Tabla 2.</b> Condiciones cromatográficas para los fármacos analizados .....	82
<b>Tabla 3.</b> Caracterización físico-química de los liposomas extruidos con diferentes fármacos.....	90
<b>Tabla 4.</b> Propiedades físico-químicas de los fármacos seleccionados.....	92
<b>Tabla 5.</b> Propiedades físico-químicas de los lotes de TEO antes y después de la extrusión. Se prepararon usando diferentes cantidades de desoxicolato sódico (Deo-Na) .....	93
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de caracterización y PdE% de ambos fármacos encapsulados por TLE y por el método del pH transmembrana. ....	102

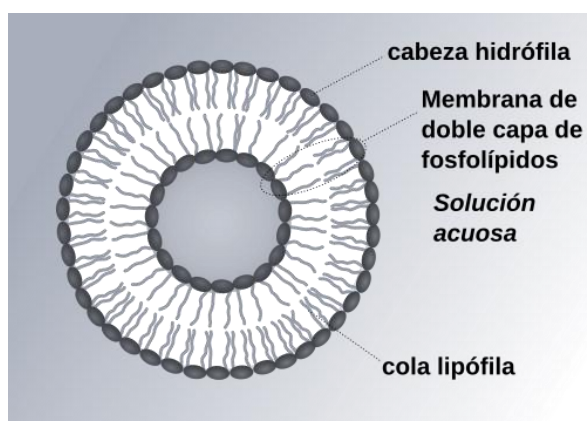


## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Concepto y métodos convencionales de elaboración de liposomas

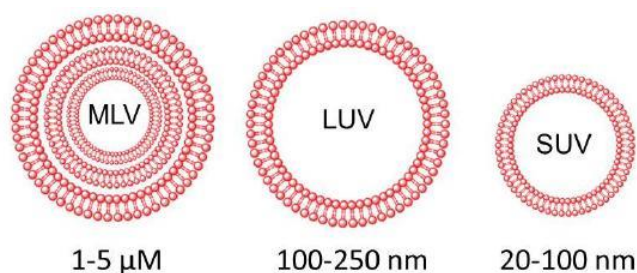
Los liposomas son considerados el tipo de sistemas nanoparticulares más estudiado como transportadores de fármacos y han ganado importancia como sistemas trascendentales en la liberación de éstos.

Se definen globalmente como vesículas constituidas por materiales lipídicos como fosfolípidos, que se encuentran dispersas en una fase acuosa, formándose una o más bicapas concéntricas con una estructura similar a la membrana celular, y que separan compartimentos acuosos, como se muestra en la Figura 1 (Eloy et al., 2014; Huang et al., 2014).



**Figura 1.** Esquema de un liposoma y su composición. (<https://www.wikiwand.com/es/Liposoma>).

En función del número de bicapas y el tamaño de las vesículas, se clasifican los liposomas en: multilaminares (MLV), unilaminares pequeños (SUV) y unilaminares grandes (LUV). En la Figura 2 se recoge una imagen de cada uno de ellos.



**Figura 2.** Tipos de liposomas según tamaños y número de bicapas. MLV (Vesículas multilaminares), LUV (vesículas unilaminares) y SUV (pequeñas vesículas unilaminares). (<https://biopharma.co.uk/blog/2016/11/16/why-you-should-choose-extrusion-for-your-liposomal-enhancement/>).

Debido a su conformación especial, los liposomas aportan grandes ventajas como sistemas de liberación de fármacos. En primer lugar, la capacidad de las vesículas para separar la fase interna de la externa puede mejorar la estabilidad de los fármacos encapsulados (Oliveira et al., 2014). En segundo lugar, cuando éstos son encapsulados en los liposomas, los que poseen baja solubilidad en fase acuosa han mostrado mejorar su biodisponibilidad, además de lograr una liberación sostenida o controlada tras la encapsulación (Swaminathan y Ehrhardt, 2012). Adicionalmente, los liposomas, que son compuestos biodegradables, poseen una excelente afinidad celular, lo que permite mejorar la distribución *in vivo* del fármaco, optimizando así el índice terapéutico de ciertas moléculas (Mohammed et al., 2004; Fan y Zhang, 2013; Huang et al., 2014). Por otra parte, ciertos ligandos pueden modificar la superficie de los liposomas, con el objetivo de alterar sus características y el comportamiento biológico del producto final (Abra et al., 2002).

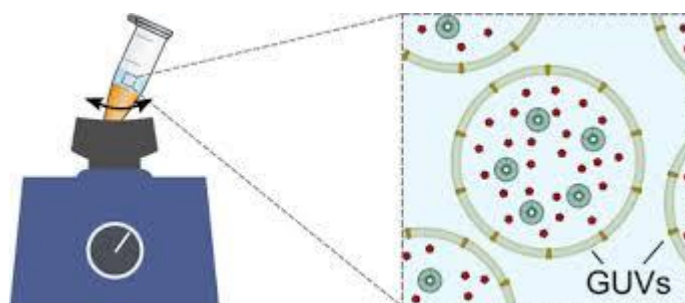
Existen en la actualidad una gran variedad de métodos de preparación de liposomas, cada uno de ellos con sus características propias y sus ventajas. La óptima selección de unos métodos adecuados junto con las novedosas técnicas disponibles, hace que las nuevas preparaciones puedan ser preparadas fácil y eficazmente (Huang et al., 2014).

A continuación, se describirán brevemente los métodos más empleados en la elaboración de liposomas.

### 1.1.1. Métodos convencionales para preparar vesículas gigantes unilaminares (GUV)

#### 1.1.1.1. Hidratación de una película fosfolipídica

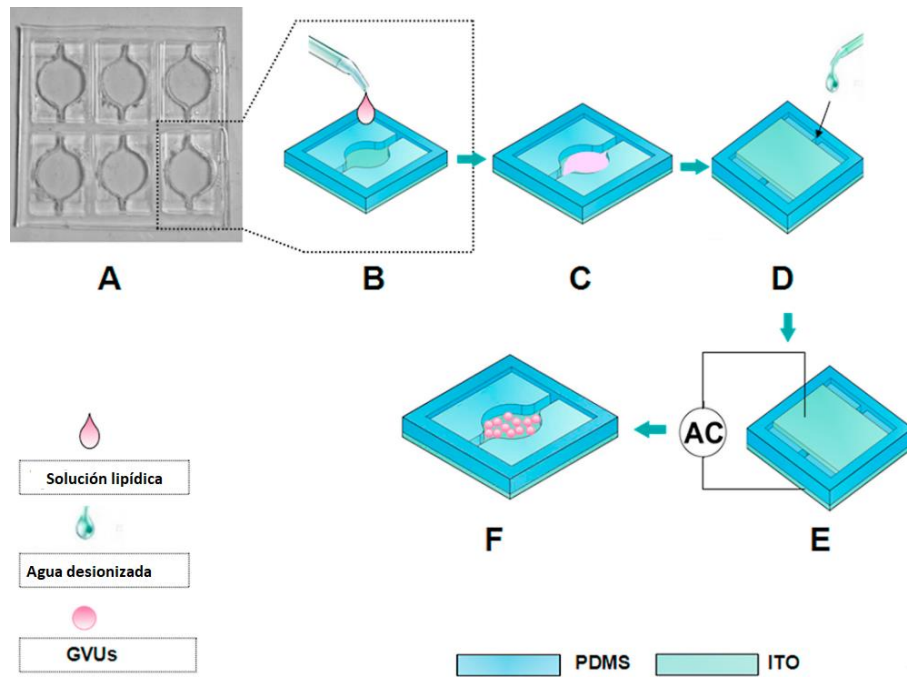
Este método consiste en depositar los fosfolípidos desde una solución contenida en un solvente orgánico, como cloroformo o etanol, sobre un sustrato. La película, que está formada por bicapas lipídicas apiladas, se hidrata durante dos días en ausencia de flujo hidrodinámico obteniéndose una dispersión acuosa de GUVs (Figura 3). Aunque una fracción importante de la preparación también se compone de vesículas multilaminares (MLV), este método es el más adecuado para obtener GUV con fosfolípidos cargados (Kuroiwa et al., 2009).



**Figura 3.** Vesículas gigantes unilaminares (<https://www.x-mol.com/paper/5666911>).

#### 1.1.1.2. Electroformación

En este método, la bicapa lipídica se deposita en unos electrodos y es hidratada posteriormente durante un par de horas en presencia de un campo eléctrico. Aunque las GUV son formadas por corrientes alternas y directas, la corriente continua no es la de elección, ya que provoca la formación de burbujas debido a la electrolisis del agua (Rodríguez et al., 2005). En la Figura 4 se recoge un esquema del proceso.



**Figura 4.** Representación esquemática de la formación de GUVs en una estructura tipo “sandwich” (adaptada de Li et al., 2016). ITO: cristal de óxido de indio, PMDs: cristales de polidimetilsiloxano.

### 1.1.1.3. Coalescencia de vesículas pequeñas

Otros métodos válidos para obtener GUV, aunque no se usan muy frecuentemente, se basan en la coalescencia de pequeñas vesículas que se mantienen en dispersión durante varios días, y que resultan finalmente en la formación de GUV (Figura 5). La fusión de vesículas unilaminares grandes (LUV) puede ser inducida por diferentes métodos, incluyendo ciclos de congelación-descongelación en soluciones concentradas de electrolitos, usando fosfolípidos con carga opuesta, añadiendo polietilenglicol, péptidos fusogénicos o incorporando cationes divalentes a fosfolípidos cargados negativamente (Knorr et al., 2018).

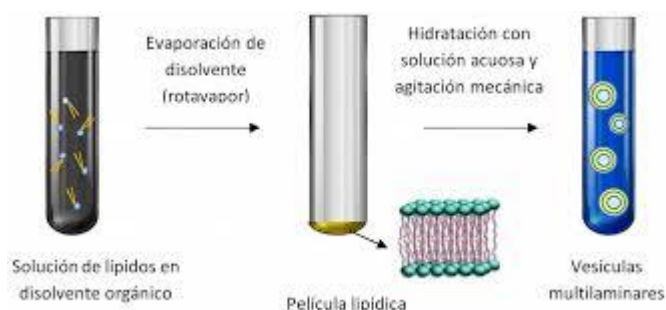


**Figura 5.** Formación de GUVs por la unión de vesículas más pequeñas. ([http://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/83510/1/T01258.pdf](http://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83510/1/T01258.pdf).)

## 1.1.2. Métodos convencionales para preparar vesículas multilaminares (MLV)

### 1.1.2.1. Hidratación en capa fina (TLE)

Las MLV se forman cuando una bicapa lipídica de fosfolípidos empaquetados, depositada sobre un sustrato, que puede ser el fondo de un matraz de fondo redondo, se rehidrata bajo la influencia de fuertes flujos hidrodinámicos durante un par de horas (Figura 6). La dispersión de vesículas MLV resultante es heterogénea tanto en tamaño como en laminaridad (Villasmil-Sánchez et al., 2013).



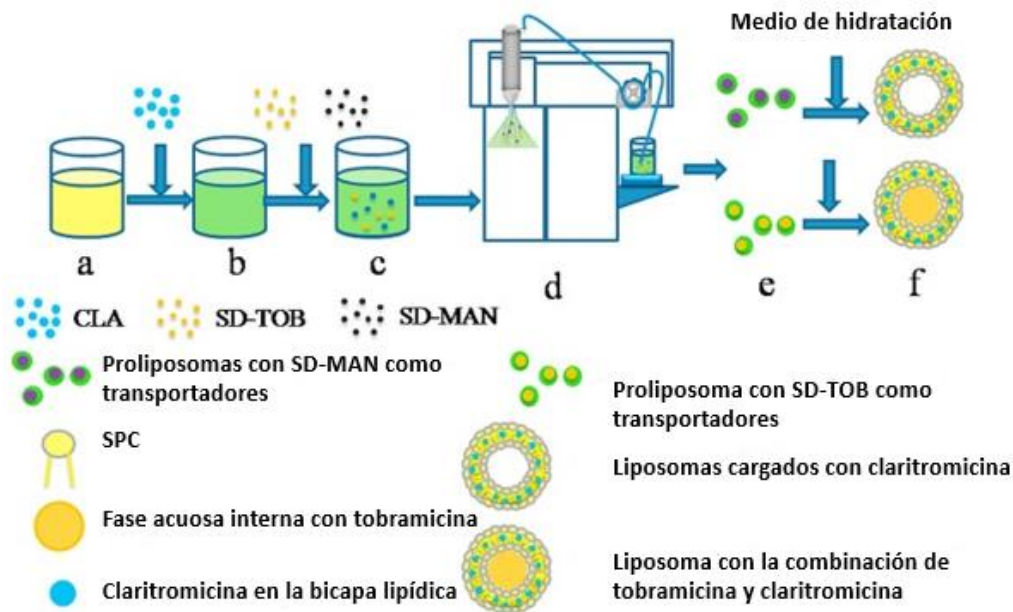
**Figura 6.** Método de evaporación en capa fina (TLE). <https://www.omniascience.com/books/>.

### 1.1.2.2. Método del solvente esférico

Consiste en mezclar vigorosamente una fase orgánica que contiene fosfolípidos y una fase acuosa durante una hora a vacío, formando una emulsión oleosa-acuosa que contiene pequeñas esferas de lípidos que contienen solventes. Posteriormente, se retira la fase orgánica mediante evaporación, lo que resulta en la conversión de las esferas en vesículas MLV con una estrecha distribución de tamaños (Kim et al., 1985).

### 1.1.2.3. Método de hidratación de proliposomas

Los proliposomas son estructuras granulares estables, secas y “con flujo libre” que contienen el fosfolípido y el denominado portador/fármaco, y que forman MLV cuando se dispersan en la fase acuosa (Figura 7). Son estructuras estables que previenen de la inestabilidad del liposoma o de la salida de fármaco durante el almacenamiento. Pueden ser hidratados para formar liposomas añadiendo un solvente acuoso a la hora de usarlos (Ye et al., 2018).

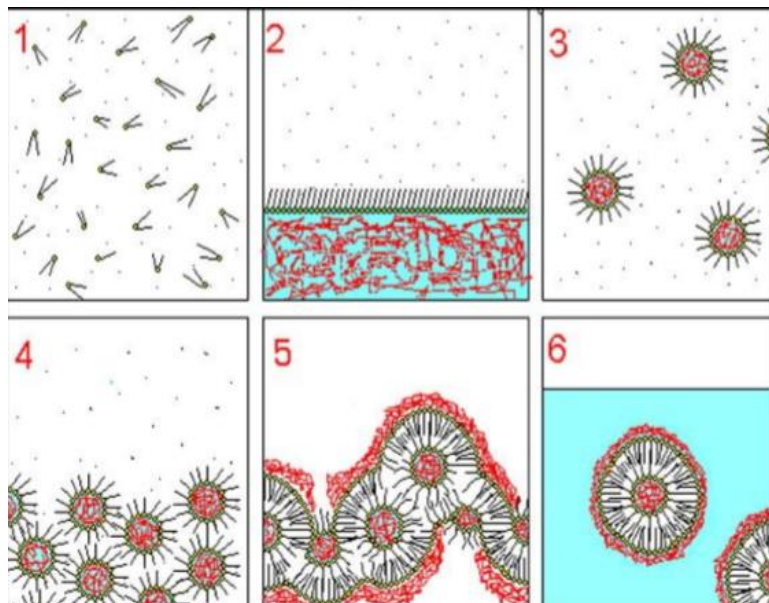


**Figura 7.** Proceso de elaboración de proliposomas. (a) Solución lipídica con etanol. (b) Solución de lípidos-etanol con claritromicina. (c) Suspensión lipídica de claritromicina en combinación con un transportador. (d) Secado en un paso. (e) Proliposoma. (f) Liposoma reconstituido. (MAN: manitol; TOB: tobramicina; CLA: claritromicina). (Adaptada de Ye et al., 2018).

### 1.1.3. Métodos convencionales para preparar vesículas unilaminares pequeñas y grandes (SUV y LUV)

#### 1.1.3.1. Evaporación en fase reversa

Este método es similar al del solvente esférico que se usa para preparar MLV. Es análogo al método TLE, pero en él se forman agregados en su preparación debido al uso de polielectrolitos, que hay que eliminar. La evaporación en fase reversa también incluye la hidratación de los fosfolípidos disueltos en la fase orgánica mediante la adición de agua, a la vez que se agita vigorosamente. En este caso se forma una emulsión acuosa en una suspensión oleosa con LUVs (Figura 8). Algunos autores han demostrado que menores concentraciones de fosfolípidos en la dispersión acuosa llevaron a mayor cantidad de vesículas LUV con respecto a las MLV (Shohda et al., 2015).



**Figura 8.** Representación esquemática de la técnica de evaporación en fase inversa (1) Disolución de los componentes lipídicos en solvente orgánico. (2) Adición de la fase acuosa, que contiene el fármaco. (3) Sonicación hasta obtener una emulsión de color blanco y de aspecto lechoso, correspondiente a la formación de micelas invertidas. (4) Eliminación del solvente orgánico con ayuda de un rotavapor. (5) Formación del gel. (6) Colapso del gel y formación de la dispersión de liposomas.

#### 1.1.3.2. Inyección de un solvente orgánico con fosfolípidos en una fase acuosa

Este método consiste en inyectar un solvente orgánico (etanol o éter dietílico) en el cual se encuentran los fosfolípidos disueltos en una fase acuosa. Al inyectar etanol, se mezcla este solvente con el agua y la mezcla se diluye hasta alcanzar la concentración crítica, lo que fuerza al autoensamblaje de los fosfolípidos en la fase acuosa formándose SUV. Por el contrario, si se inyecta una solución de éter y fosfolípidos en agua, la formación de SUV resulta de la evaporación de éter. Se ha demostrado que el aumento en la concentración de fosfolípidos en el solvente orgánico conlleva un aumento del tamaño, polidispersión y laminaridad de los liposomas finales (Zhang et al., 2019).

#### 1.1.3.3. Diálisis del detergente

La diálisis del detergente, usada comúnmente para preparar LUV, fue propuesta en primer lugar con el objetivo de reconstituir proteínas integrales de membrana en las bicapas fosfolipídicas. En este método, los fosfolípidos son solubilizados por micelas de detergente en una fase acuosa. Posteriormente, se retira el detergente mediante diálisis,



resultando en la coalescencia de los fosfolípidos que son ricos en micelas, formando LUV. También pueden emplearse técnicas cromatográficas para retirar el detergente (Hildebrand et al., 2003).

#### 1.1.3.4. Reducción de la laminaridad y el tamaño de las MLV

Como la formación espontánea de vesículas MLV se consigue fácilmente, se emplean técnicas como la prensa francesa, sonicación, homogeneización y la extrusión de la membrana para convertir MLV en SUV y LUV.

En la sonicación, las ondas ultrasónicas destruyen las MLV para formar vesículas con un tamaño aproximado de 30-50 nm. Sin embargo, se consiguen volúmenes pequeños de SUV con una elevada polidispersión y se puede degradar tanto el fosfolípido como el fármaco encapsulado, lo que limita el uso de este equipo para reducir el tamaño (Taladril et al., 2017).

La técnica de la prensa francesa (*French Press*) consiste en extruir dispersiones de vesículas MLV a elevadas presiones a través de un orificio de dimensiones reducidas, lo que da lugar a la formación de SUV. A pesar de ello, los liposomas resultantes son de mayor tamaño que los obtenidos por la sonicación de vesículas MLV (Marasini et al., 2017).

La homogeneización se emplea normalmente para reducir el tamaño y la laminaridad de los lotes preparados a nivel industrial. Durante el proceso, la formulación de liposomas es bombeada de forma continua a través de un orificio y colisiona con un dispositivo de acero en la pared del homogeneizador a presiones muy elevadas para reducir el tamaño de los liposomas. No obstante, el principal problema de este método es el uso de presiones muy elevadas (Pando et al., 2013).

El método más empleado para formar SUV y LUV a partir de MLV es la extrusión a través de membrana, empleando para ello un extrusor, como el que se recoge en la Figura 9. En este método, se extruye una dispersión de MLV varias veces a través de poros cilíndricos uniformes en una membrana de policarbonato, dando lugar a vesículas pequeñas. El tamaño medio de las vesículas obtenidas por extrusión disminuye a medida que aumenta la presión transmembrana y el número de ciclos. Sin embargo, el tamaño medio depende mucho del tamaño del poro de la membrana (Ghosh et al., 2019).





**Figura 9.** Imagen del extrusor empleado en nuestro grupo de investigación Lipex® Thermobarrel.

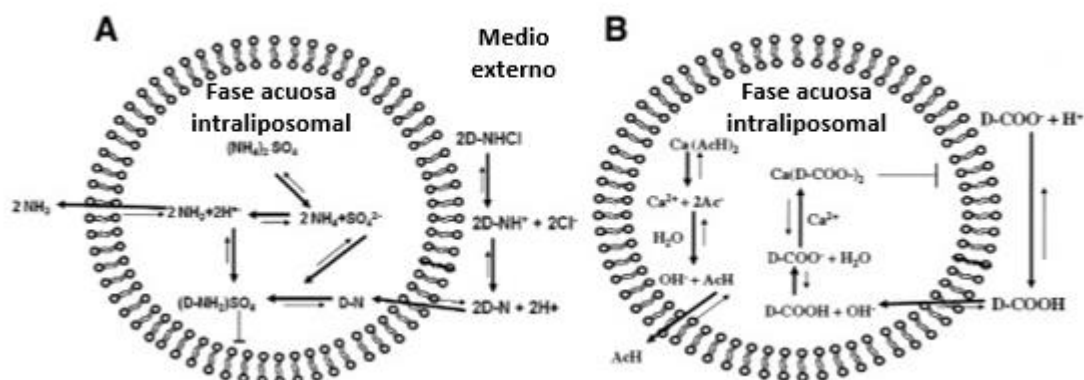
## **1.2. Método de gradiente transmembrana**

El método tradicional de elaboración de liposomas más empleado es el de evaporación en capa fina (TLE). Tiene el inconveniente de que conlleva la aplicación de temperaturas y condiciones extremas, que pueden afectar a moléculas sensibles como las proteínas. El método que se describe a continuación, denominado método del gradiente transmembrana ofrece ciertas posibilidades que pueden evitar parcial o totalmente estas limitaciones (Bi et al., 2019).

La encapsulación remota / activa mediante el método transmembrana es uno de los métodos más eficaces para lograr una elevada concentración de fármaco dentro del liposoma. Para que la encapsulación sea efectiva, el fármaco debe tener ciertas características estructurales que le permitan permear y difundir a través de la bicapa lipídica con el fin de almacenarse en el liposoma y difundir hacia el interior de las vesículas (Zucker et al., 2009). Así, se requiere que las moléculas tengan un log P a pH 7 en el rango -2.5 a 2.0, un pKa  $\leq 11$  para una base anfipática débil o un pKa  $> 3$  para un ácido débil anfipático (Zucker et al., 2009).

Indicado, por tanto, para bases o ácidos débiles anfipáticos, este método se basa en el intercambio de protones ( $H^+$ ) entre el interior del liposoma y el medio externo, que suele ser una solución tampón. El proceso se basa en la presencia del catión  $NH_4^+$  en el interior de la vesícula procedente de una sal de amonio, que se disocia en un  $H^+$  y  $NH_3$ . Esta disociación depende del pH, de manera que cuanto mayor sea el gradiente de pH, mayor es la disociación del anión  $NH_4^+$ . Además, el  $NH_3$  resultante de la disociación atraviesa con facilidad la bicapa lipídica debido a su elevado valor de coeficiente de permeabilidad. En la Figura 10 se recoge un esquema del mecanismo general de generación del gradiente

en presencia de sulfato amónico (Figura 10A) para una base débil, y en presencia de acetato cálcico (Figura 10B) para un ácido débil.



**Figura 10.** Carga del fármaco en las vesículas mediante el método transmembrana. (A) Carga de una base débil. (B) Carga de un ácido débil. D: fármaco, AcH: ácido acético, Ac<sup>-</sup>: acetato- la base o el ácido débil no ionizado atraviesa la membrana liposomal y se queda atrapado dentro debido a su ionización y la consecuente formación de una sal insoluble. Adaptado de Zucker et al. (2009).

Por otra parte, la elevada diferencia entre los coeficientes de permeabilidad entre el catión amonio y el anión de dicha sal, junto a la facilidad que presenta el fármaco (la fracción no ionizada) para entrar en el interior del liposoma, hacen que la encapsulación del fármaco sea adecuada (Fatima et al., 2018).

Para intentar comprender las condiciones necesarias para lograr la mayor eficacia de encapsulación de los fármacos en base a las características fisicoquímicas y de formulación de los mismos, se han considerado las aportaciones llevadas a cabo por Barenholz y su equipo de investigación a lo largo de quince años (Haran et al., 1993; Barenholz, 2003). En el estudio, se han recopilado datos sobre varios parámetros que afectaban a la encapsulación para nueve fármacos diferentes, tales como la relación fármaco/lípidos (F/L), el tiempo de encapsulación, la temperatura de encapsulación y otras características fisicoquímicas como el pKa, log P y la solubilidad (Zucker et al., 2009). Mediante el seguimiento de un árbol de decisión, se puede llegar a conseguir eficacias de encapsulación superiores al 90% en formulaciones de las que se partía de un 75% aproximadamente. Asimismo, la concentración de fármaco en los liposomas debe ser suficientemente elevada para permitir la administración de una dosis terapéutica; por lo tanto, si la concentración del fármaco es baja en los liposomas, aunque la eficacia de carga sea elevada, solo sería adecuado para fármacos muy potentes. Por lo tanto, generalmente se acepta que un buen candidato para la carga remota en liposomas debe

ser capaz de lograr una elevada eficacia de carga en todas las ratios iniciales fármaco/lípido.

A continuación, se recoge un apartado sobre el análisis de la influencia que determinados factores pueden ejercer en la encapsulación de los fármacos por este método.

### **1.2.1. Factores que influyen en el método**

#### **1.2.1.1. Efecto de la fase interna acuosa del liposoma**

La creación del gradiente transmembrana (la fuerza que dirige a la molécula de interés del medio externo hacia el interior de los liposomas, y que permite que permanezca dentro), puede ser debida al pH o a las características de la sal. Nichols y Deamer (1976) fueron los primeros en encapsular aminas anfipáticas mediante el método de gradiente de pH. De ahí que el gradiente de pH interno sea tan importante para la carga del fármaco (Das et al., 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que el tipo de sal que se utilice, así como su concentración condicionarán la encapsulación mediante el método transmembrana, siendo más adecuada una sal determinada para cada tipo de fármaco. Prácticamente, toda la literatura al respecto hace referencia a la encapsulación de doxorubicina por este método. Así, en un estudio llevado a cabo por Fritze et al. (2006), el tampón citrato no fue capaz de formar ninguna sal estable; sin embargo, la solubilidad de este fármaco aumentó con soluciones 300 mM de citrato, 300 mM de fosfato y 600 de mM acetato, cuando se disminuyó el valor del pH, si bien la fracción de doxorubicina cargada positivamente se redujo. En cambio, tras la desprotonación del fármaco, el compuesto es prácticamente insoluble en la solución salina. El uso de estas sales hace que la fuerza iónica del medio varíe, y que sean necesarias concentraciones elevadas de sal, de 300 mM para encapsular doxorubicina. Además, los resultados mostraron que usando gradientes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a varios valores de pH, se puede lograr la protonación y precipitación del fármaco, consiguiendo mayores eficacias de encapsulación. El uso de gradientes de amonio es más efectivo que los gradientes de NaCl. El amonio actúa como un reservorio, que proporciona más protones cuando la doxorubicina se encuentra protonada.

#### **1.2.1.2. Efecto de la fase externa**

Se parte del hecho de que las especies ionizadas y la fuerza iónica del medio afectan al potencial de membrana, parámetro fisicoquímico importante que determina la interacción

entre un fármaco ionizado y la membrana. Así, para las bases débiles, la existencia de un potencial negativo o muy poco positivo favorecería al reparto membrana / agua debido a las interacciones de carga, lo que aumentaría la cantidad de fármaco acumulado.

Este efecto se muestra en la Tabla 1, en la que se observa un incremento de la eficacia de encapsulación del fármaco a medida que las bases eran más fuertes.

**Tabla 1.** Aumento de la eficacia de encapsulación (EE) de los fármacos a medida que aumenta la basicidad. Adaptado de Qiu et al. (2008).

Base	pH externo	Potencial zeta (mV)	EE (%) antes de liofilizar	EE (%) después de liofilizar
NaOH	7.0	1.5 ± 0.7	97.9 ± 3.1	74.5 ± 5.8
NaHCO <sub>3</sub>	7.0	5.9 ± 1.3	95.2 ± 1.8	84.3 ± 3.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.0	10.7 ± 2.5	93.6 ± 2.7	97.5 ± 2.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.2	-20.5 ± 1.9	90.9 ± 3.0	61.5 ± 3.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.6	-15.7 ± 2.1	97.3 ± 1.8	78.5 ± 2.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.4	14.2 ± 3.3	85.2 ± 1.9	79.1 ± 4.8

Ajustando el pH externo al mismo nivel con la base débil NaHCO<sub>3</sub> (pK<sub>a</sub> 7.62), la fracción disociada de sodio en el sistema sería mayor. Y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pK<sub>a</sub> 7.20), con dos iones sodio hará que el sistema tenga Na<sup>+</sup> a una elevada concentración. Así, aumentando la concentración de cationes en el medio, se mejora el potencial de membrana y disminuye el coeficiente de partición membrana-medio acuoso. Por ello, la EE de los liposomas es menor cuando se usa Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Qiu et al., 2008).

### 1.2.1.3. Influencia de la composición de la bicapa

Algunos lípidos que forman parte de la bicapa, como colesterol o los denominados activadores del borde, como desoxicolato sódico, pueden influir en la flexibilidad de la bicapa y en la encapsulación y liberación del fármaco encapsulado por este método.

En un estudio realizado por Sadeghi et al. (2018), se evaluó la liberación de doxorubicina a partir de liposomas termosensibles que fueron elaborados con diferentes cantidades de colesterol. Se utilizó el método de carga remota por gradiente iónico transmembrana para el atrapamiento del fármaco. Tras realizar los estudios de liberación *in vitro* a temperatura ambiente y en condiciones de hipertermia, la incorporación de 5 y 10% de colesterol en las bicapas redujo la salida de doxorubicina a temperatura fisiológica, y no afectó de

forma negativa a la liberación ni a la carga a temperaturas elevadas. Por lo tanto, añadiendo el estudio de Karanth y Murthy, se podría concluir que la presencia de colesterol es clave en la composición de las vesículas, ya que éste reduce considerablemente la salida del fármaco encapsulado al ambiente extracelular además de mejorar sustancialmente su encapsulación (Karanth y Murthy, 2007).

En cuanto a la composición de los fosfolípidos de la bicapa, en un estudio llevado a cabo por Chou y colaboradores (Chou et al., 2003) se comprobó que la encapsulación mejoró notablemente cuando los liposomas se prepararon usando fosfolípidos con una temperatura elevada de transición como diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) o fosfatidilcolina hidrolizada de soja (HSPC). Estos lípidos hacen que la membrana liposomal sea más impermeable que en los liposomas que se componen de otros fosfolípidos, con temperaturas de transición más bajas.

Finalmente, se ha comprobado que la ratio entre lípido y fármaco constituye otro factor importante a tener en cuenta. En un estudio llevado a cabo por Qiu et al. (2008), se demostró que al disminuir la ratio fármaco / fosfatidilcolina (en masa), de 1:10 a 1:50, la eficacia de encapsulación aumentó de 47.4 a 93.6%, mientras que la capacidad de carga descendió de un 3.9 a un 1.7%. La justificación a este resultado estriba en que si existe mucha cantidad de fármaco acumulada, colapsa el gradiente de pH, impidiendo la entrada del fármaco al interior de la vesícula (Qiu et al., 2008).

#### 1.2.1.4. Influencia de la naturaleza del fármaco

La carga activa de fármaco en los liposomas mediante el método transmembrana es prometedora en cuanto a que se consiguen elevadas concentraciones dentro de la vesícula, consiguiendo que un fármaco con la estructura adecuada difunda sin problemas a través de la membrana lipídica. Además, la afinidad por el núcleo liposomal del fármaco no permite la salida al medio externo permitiendo que el fármaco se acumule en su interior (Cern et al., 2012).

Como se ha referido anteriormente, los candidatos más adecuados para ello son bases o ácidos débiles anfipáticos definidos porque su  $\log P$  a pH 7 sea de -2.5 a 2. Las bases débiles anfipáticas deben tener un  $pK_a \leq 11$  y los ácidos débiles un  $pK_a > 3$  (Barenholz, 2003).

La creación de gradientes de sales favorece el almacenamiento del fármaco deseado dentro de las vesículas. El exterior de las vesículas mantiene un pH fisiológico de 7.4 unidades. En ese caso, los fármacos que sean neutros o sin carga, pueden difundir a través de la bicapa hacia el interior. El bajo pH del interior permite la ionización del fármaco, y una vez que la molécula se protona, ya no puede difundir a través de la bicapa liposomal, lo que favorece su acumulación en el interior (Figura 10).

Sin embargo, no todos los fármacos son adecuados para lograr una elevada eficacia de encapsulación mediante este método. Se ha observado un importante prerrequisito para lograrlo, que consiste en la capacidad que presente el fármaco para pasar de ser una especie sin carga (capaz de difundir libremente a través de la bicapa lipídica) a una especie cargada (que no difunda libremente). Como el grado de ionización depende del pKa y del pH local, y como la molécula encapsulada debe ser bastante soluble, los ácidos o las bases débiles anfipáticos son los candidatos ideales. Aquellos fármacos que no sean ácidos ni bases débiles anfipáticos, o no sean ionizables, pueden ser encapsulados por otros métodos, como por ejemplo con el uso de ciclodextrinas especiales o modificadas (Alyane et al., 2016; Russo et al., 2018).

Diferentes grupos de investigación han usado sales de bases débiles como amonio, o sales de ácidos débiles como acetato para crear un gradiente de pH y de iones (Haran et al., 1993; Clerc y Barenholz, 1995). Además, un gradiente transmembrana de esos iones puede ser intercambiado con fármacos anfipáticos. A título de ejemplo, el gradiente del sulfato amónico  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ha sido empleado para lograr una carga activa de bases débiles anfipáticas en los liposomas con una eficacia muy elevada ( $> 90\%$ ) (Fatima et al., 2018).

#### 1.2.1.5. Influencia multifactorial en la formulación de liposomas por este método

Además de las sales de amonio, el gradiente iónico de algunos metales supone otra posibilidad para cargar fármacos en liposomas mediante este método. En el estudio llevado a cabo por Abraham y colaboradores, se comparó el gradiente de manganeso ( $\text{MnSO}_4$  y  $\text{MnCl}_2$ ) con el de sulfato y citrato amónico, como estrategia para encapsular el topotecan hidrosoluble. Todos los métodos demostraron facilitar la encapsulación del fármaco, pero la presencia de citrato y de  $\text{MnCl}_2$  redujo la capacidad de carga (Abraham et al., 2004).

Además, existe un modelo matemático, con 60 fármacos, desarrollado por Cern y colaboradores que facilita la selección de los mejores fármacos para ser encapsulados. Tiene en cuenta el estudio diversas características del proceso, como la temperatura de transición de los fosfolípidos, la rigidez de la membrana, el tamaño de la vesícula, el porcentaje de colesterol, la duración del proceso y la temperatura, el grado del gradiente de pH, la eficacia de carga, la concentración de sal y las características físico-químicas de la molécula. El modelo relaciona las características químicas estructurales y las condiciones experimentales y clasifica los fármacos como adecuados o no para ser encapsulados. Según ellos, aquellos fármacos que lograsen ser adecuadamente encapsulados en la mayoría de casos, serían los candidatos ideales (Cern et al., 2012).

### **1.3. Co-encapsulación de fármacos en liposomas por el método transmembrana**

La estrategia de co-encapsular dos o más principios activos en un único sistema nanoparticular se ha extendido al tratamiento de numerosas patologías. Centrando la atención en la terapia de patologías pulmonares, resulta interesante el estudio llevado a cabo por Halwani et al. (2008), que co-encapsularon gentamicina y galio para el tratamiento de las infecciones pulmonares provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Como se ha referido en el apartado de Introducción General de la presente memoria, la fibrosis quística (FQ) sigue siendo una enfermedad sin cura disponible en la actualidad. Uno de los objetivos del tratamiento usual consiste en mejorar las terapias ya existentes con el fin de prevenir la resistencia bacteriana, que es muy común en estos pacientes (Larkin et al., 2015).

Los aminoglucósidos, como gentamicina, constituyen un grupo de antibióticos que no sólo son efectivos frente a dicha bacteria, sino que también pueden suprimir la expresión de algunas de las mutaciones del gen CFTR, mejorando su funcionalidad (Mugabe et al., 2005). Sin embargo, el uso de este fármaco está restringido debido al aumento de la resistencia bacteriana.

Además, el galio ha surgido recientemente como un agente inhibitorio contra el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y la formación del biofilm. La disrupción del metabolismo del hierro aumenta la vulnerabilidad de las bacterias patógenas, ya que este metal es esencial para el crecimiento y funcionamiento de enzimas tan importantes como las que intervienen en la síntesis de ADN y proteínas, así como para el transporte de electrones y el estrés oxidativo (Lv et al., 2019). El galio, debido a su similitud química

con el hierro, puede sustituirlo e inhibir los procesos que dependen de éste. Sin embargo, también ha demostrado una elevada toxicidad en solitario.

Por otra parte, los liposomas, como sistemas transportadores de fármacos, tienen la capacidad de mejorar la terapia antibiótica, reduciendo su toxicidad, mejorando la acción del fármaco y aumentando la eficacia bacteriana, ya que son capaces de fusionarse con la membrana de la bacteria (Zhou et al., 2014).

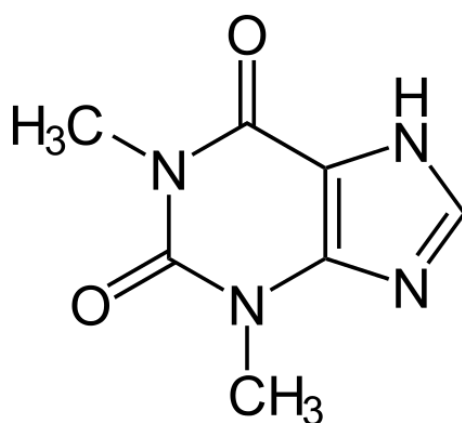
La posibilidad de co-encapsulación de ambos compuestos referidos anteriormente (gentamicina y galio) en liposomas ofrecería una nueva alternativa para controlar múltiples factores de la enfermedad. Así, la formulación demostró ser estable y se concluyó en el estudio que utilizar liposomas como sistemas transportadores de dos fármacos optimizó la actividad antimicrobiana de gentamicina y redujo la toxicidad del galio, previniendo la formación del *biofilm* bacteriano y reduciendo la resistencia bacteriana, la cual está asociada con la infección pulmonar crónica en pacientes con FQ.

### **1.3. Fármacos en estudio**

#### **1.3.1. Teofilina**

Ha sido el broncodilatador más usado en las últimas décadas debido, entre otros aspectos, a su bajo coste.

Alcaloide de la familia metilxantina, teofilina (TEO) es la 1,3 dimetilxantina (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura química de la teofilina.

Se presenta como polvo cristalino blanco, inodoro. Estable al aire. Fácilmente soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos y amoníaco; moderadamente soluble en alcohol, cloroformo y éter, y poco soluble en agua. La solubilidad en agua es 7.36 mg/mL a 25 °C y se incrementa hasta 11.2 mg/mL con el aumento de la temperatura (Viridén et al., 2011).



Es un compuesto que presenta polimorfismo. Se han identificado cuatro formas diferentes de TEO anhidra; la forma tipo II es la más utilizada en las preparaciones farmacéuticas, debido a que posee una estabilidad superior a temperatura ambiente. Esta forma cristalina se caracteriza por la presencia de un enlace de hidrógeno entre nitrógeno e hidrógeno y dos enlaces entre C, H y O formando una estructura de bicapa. Sin embargo, cuando las condiciones de almacenamiento son de gran humedad o durante la granulación húmeda, la molécula de TEO sufre una dimerización en presencia de agua para formar un canal hidratado monocíclico. Esto lleva a cambios en las características físico-químicas del fármaco y en parámetros como estabilidad, biodisponibilidad y eficacia clínica (Korang-Yeboah et al., 2016).

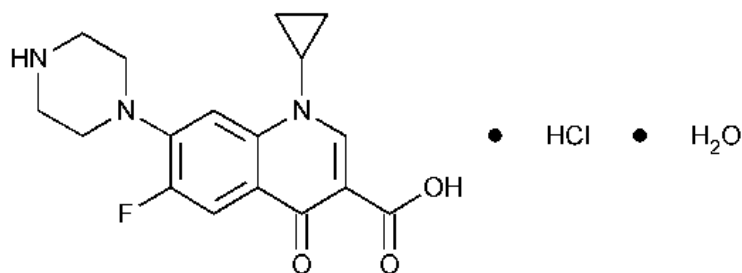
Presenta una rápida absorción tras su administración oral, alcanzándose los valores de  $C_{max}$  a las 1-2 horas en las formulaciones de liberación inmediata, y de 4-9 h para los preparados retard. Por vía i.v. es efectiva en unos minutos. Por vía respiratoria ha demostrado ser irritante e inefectiva (Viridén et al., 2011). Presenta metabolismo hepático y posterior excreción urinaria, con una semivida de eliminación de 6-12 horas. Es un fármaco proclive a soportar numerosas fuentes de variabilidad, dependientes de la edad, peso, presencia de enfermedades, altura, tipo de alimentación, etc.

Su intervalo terapéutico de concentración plasmática se encuentra entre 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , aunque generalmente manteniendo los valores en 10-15  $\mu\text{g/mL}$  se consigue el efecto terapéutico. Si se superan los 20  $\mu\text{g/mL}$  no aumenta prácticamente la acción broncodilatadora, pero sí aparecen efectos tóxicos cardíacos y nerviosos (Barnes, 2013).

### **1.3.2. Ciprofloxacino**

Es una fluoroquinolona de nueva generación relacionada estructuralmente con el ácido nalidíxico. El mecanismo primario de acción es la inhibición de la ADN girasa.

Se presenta como polvo cristalino amarillo pálido. Químicamente es un ácido (Figura 12), soluble en ácido acético diluido, muy poco soluble en alcohol y cloruro de metileno, y prácticamente insoluble en agua (Cipolla et al., 2016). Con el fin de mejorar sus propiedades de solubilidad, se comercializa en forma de su sal clorhidrato, alcanzando valores de solubilidad en agua de 1.35 mg/mL.



**Figura 12.** Estructura química de ciprofloxacino.

CIP tiene un  $ICM_{90} \leq 1$  mg/mL (lo que indica susceptibilidad) frente a todas las especies de enterobacterias, excepto algunas especies del género *Providencia*. *Pseudomonas aeruginosa* ha demostrado ser susceptible en un rango 0.12-1 mg/mL, si bien es cierto que este fármaco es menos activo para otras especies de *Pseudomonas*, requiriendo un intervalo superior, de 0.25- 16 mg/mL (De Smet et al., 2009).

Tras la administración oral en dosis únicas (50-1000 mg), se obtienen  $C_{max}$  de 0.28-5.92 mg/mL a las 0.5-2 horas. La biodisponibilidad de CIP por vía oral es de 69-85%. Las concentraciones séricas aumentan en proporción a la dosis administrada dentro del rango terapéutico. La comida no ejerce un efecto significativo en la farmacocinética del ciprofloxacino, salvo que retrasa la velocidad de absorción. Su farmacocinética se caracteriza por ajustarse a un modelo tricompartmental: uno central y dos periféricos (rápido y lento) (Principi y Espósito, 2015).

La farmacocinética del ciprofloxacino no se ve afectada normalmente ni por la edad ni por la presencia de enfermedades como la FQ. Sin embargo, las concentraciones séricas tienden a ser mayores en pacientes de edad avanzada, posiblemente por una disminución de la función renal o cambios en el volumen de distribución (Cios et al., 2014).

#### **1.4. Hipótesis y objetivos**

En base a los antecedentes revisados anteriormente en lo referente a la posibilidad de co-encapsular TEO y CIP en una única formulación de liposomas empleando el método transmembrana, por sus peculiaridades de atrapar fármacos de diferente naturaleza ácida o básica, se plantea como **OBJETIVO GENERAL** la determinación de que el método transmembrana es el más adecuado para la encapsulación de TEO y CIP, evitando el uso de condiciones extremas que podrían afectar a las características físico-químicas de las vesículas y a la encapsulación de los fármacos.

Para ello, se proponen los siguientes **objetivos parciales**:

1. Poner en evidencia la generación del gradiente de iones transmembrana mediante la aplicación de técnicas de variación de la conductividad entre medio externo e interno y empleando una metodología colorimétrica que permitirá apreciar el cambio de color en las soluciones de liposomas, utilizando azul de bromotimol como indicador de pH.
2. Valorar la influencia de ciertos parámetros en el método transmembrana, como las características físico-químicas de diferentes fármacos y el efecto de la deformabilidad en el éxito del método.
3. Proceder a la co-encapsulación de TEO y CIP una vez puesto a punto el método para los fármacos por separado con el fin de comprobar que es adecuado para co-encapsular los dos conjuntamente.
4. Estudiar el efecto de las sales de amonio en la solubilidad de los dos fármacos, empleando cuatro sales diferentes y estudiando su efecto en la encapsulación de los fármacos.
5. Evaluar la influencia de la concentración de los fármacos y la composición del medio externo a la hora de realizar el proceso de diálisis, sobre el atrapamiento de los fármacos y las características fisicoquímicas de las vesículas resultantes.
6. Llevar a cabo un análisis comparativo del método desarrollado con el método convencional de evaporación en capa fina (TLE), con el fin de analizar las ventajas que el método propuesto ofrece.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

Los materiales y equipos empleados en el presente capítulo se encuentran detallados en el Índice de Materiales e Índice de Equipamiento de la presente Memoria.

### **2.1. Productos y reactivos**

Cloruro de sodio (NaCl), teofilina (TEO), clorhidrato de metformina (MET) y acetazolamida (ACZ) fueron adquiridos en Acofarma (España). Acetonitrilo (ACN), cloroformo, metanol, etanol, ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacil] etanosulfónico (Hepes) y acetato amónico se obtuvieron de Panreac Química (España). L- $\alpha$  fosfatidilcolina de la yema de huevo (PC), colesterol (CH), desoxicolato sódico (DeoNa), citrato amónico, sulfato amónico, fosfato amónico, dicetilfosfato (DCP) y azul de bromotimol (ABT), se adquirieron de Sigma-Aldrich (Italia). Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) fue proporcionado por Avanti Polar Lipids. INC (Alabaster, Alabama). Sumatriptán succinato fue recibido como muestra de Glaxo Smith Kline (UK). Clorhidrato de ciprofloxacino fue adquirido en Fagron (Terrassa, Barcelona). Hidróxido sódico (NaOH) fue adquirido en Applichem (Darmstadt, Alemania) y el ácido clorhídrico (HCl) en T3Q Química (Sentmenat, Barcelona).

El medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), la solución de L- glutamina (200 nM), la solución de aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina (10,000 unidades/mL, 10,000 g/mL), la solución de tripsina-EDTA (2.5 g/l, 0.5 g/l 5 EDTA), la solución de azul de tripano (0.4%), el dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol (MTT) y el dodecilsulfato sódico (SDS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemania). El Tritón-X 100 fue proporcionado por Amresco (USA). El kit de lactato deshidrogenasa (LDH) fue de Takara Bio (Tokyo, Japan). El suero fetal bovino (FBS) fue obtenido de Gibco (Life Technologies, USA). Los solventes fueron de calidad HPLC. El resto de reactivos empleados en este estudio fueron de grado analítico.

Se utilizó agua desionizada purificada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore). Las membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 800 y 400 nm se adquirieron en Millipore (Condado de Cork, Irlanda).

## **2.2. Preparación de los liposomas**

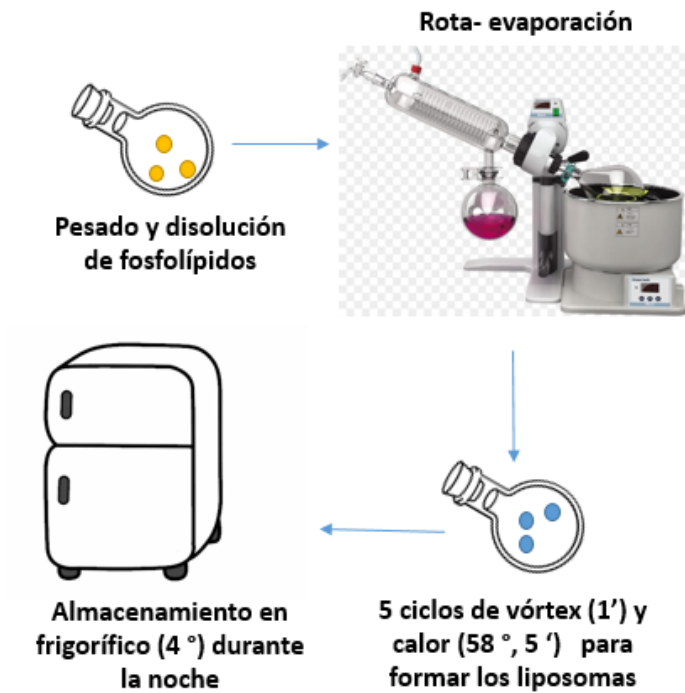
### **2.2.1 Método pasivo de carga por evaporación en capa fina (TLE)**

Los liposomas fueron elaborados utilizando la técnica de evaporación en capa fina o método Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*) obteniéndose vesículas multilaminares (MLV). Para elaborarlos, se añadieron los siguientes componentes lipídicos: fosfatidilcolina de huevo (PC), colesterol (CH), dicetilfosfato (DCP) y desoxicolato sódico (Deo-Na), en una relación molar de 70/5/10/15, en base a la experiencia previa del grupo de investigación y la de otros autores (Roy et al., 2009; Villasmil-Sánchez et al., 2013). Siguiendo la técnica de preparación, en primer lugar, se procedió a la formación de la película lipídica, para lo cual se pesaron en un matraz de fondo redondo los componentes lipídicos (*Balanza de precisión Explorer Pro*) y se disolvieron en 8 mL de cloroformo, constituyendo la fase orgánica de los liposomas. Seguidamente, se procedió a su evaporación hasta crear una fina película lipídica. Este proceso se llevó a cabo en un rotavapor (*Büchi rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491*) a una temperatura de 58 °C, temperatura superior a la temperatura de transición de los lípidos. Este proceso ha de hacerse lentamente y de forma homogénea en toda la superficie de la película con el fin de evitar cristalizaciones de los componentes. A continuación, la película obtenida se hidrató con la fase acuosa, como es lo habitual en todo proceso de elaboración de liposomas (Gregoriadis, 2016).

En este caso, la fase acuosa estuvo constituida por una disolución de ciprofloxacino, CIP (2 mg/mL) y/o teofilina, TEO (1 mg/mL).

Una vez hidratada la película, se sometió el preparado a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto intercalados con 5 minutos en baño termostatzado a 58 °C hasta la obtención de un preparado de color blanquecino opalescente en el que se encuentran dispersos los liposomas. La realización de estos ciclos de vórtex da lugar a la formación de las vesículas multilaminares (Villasmil-Sánchez et al., 2013). Finalmente, los liposomas se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

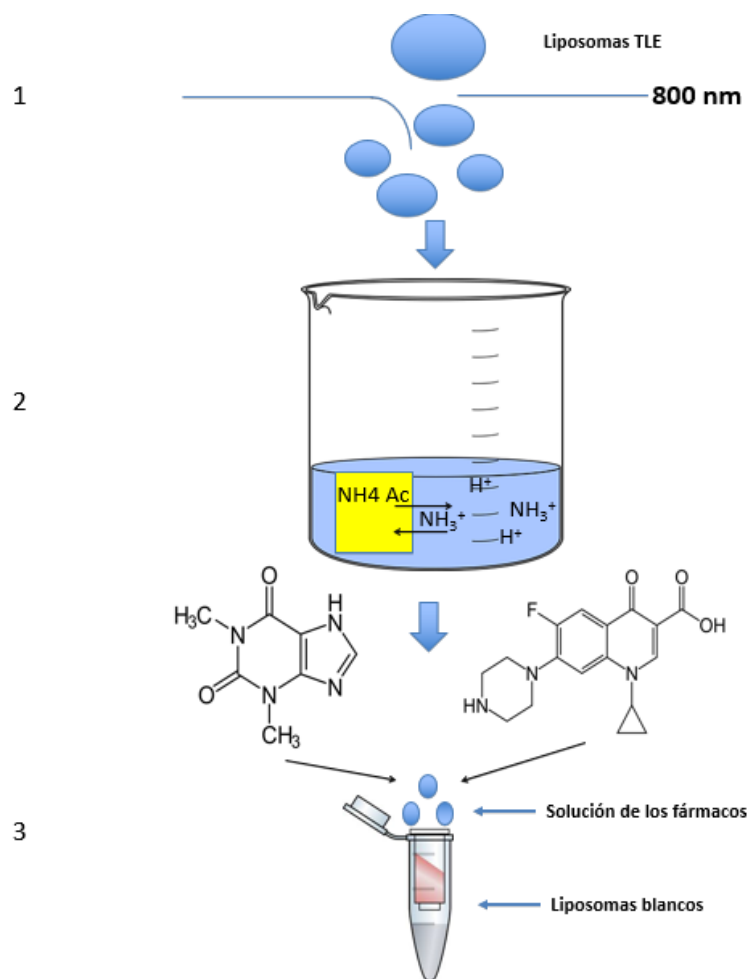
En la Figura 13 se recoge un esquema de esta técnica de elaboración.



**Figura 13.** Representación esquemática del método TLE.

### 2.2.2. Método activo de carga por gradiente transmembrana

El método de elaboración de liposomas por esta técnica (Figura 14) consiste en preparar inicialmente una película lipídica similar a la del método anterior. A continuación, se hidrató con una solución de acetato amónico 250 mM (5 mL), completando con seis ciclos de vórtex consistentes en 5 min de calor (58 °C) en baño seguidos de 1 min de agitación.



**Figura 14.** Representación esquemática del proceso de elaboración de los liposomas por gradiente transmembrana. 1: Se forman los liposomas mediante TLE y se extruyen. 2: Se realiza la diálisis. 3: Los fármacos se encapsulan en los liposomas blancos previamente extruidos.

La siguiente etapa del proceso es la extrusión de las muestras, con la finalidad de reducir el tamaño de los liposomas, así como obtener una distribución de tamaños homogénea. Para ello, se empleó un extrusor LIPEXTM (*Thermobarrel Extruder*), dispositivo de acero inoxidable que emplea nitrógeno para aplicar presiones moderadas (generalmente 100 - 800 psi), forzando de esta forma el paso de las vesículas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. La presión empleada fue de 600 psi y se utilizaron filtros de policarbonato de 0.8  $\mu\text{m}$  y 0.2  $\mu\text{m}$ , a través de los cuales se hizo pasar la muestra tres veces por cada uno de ellos.

Una vez obtenidas las muestras extruidas, se procedió a realizar una diálisis frente a un volumen 100 veces mayor de HEPES a pH 7.4 hasta conseguir el intercambio de protones

entre la membrana y el medio. Este proceso se va monitorizando midiendo la conductividad con el tiempo, hasta conseguir valores estables.

Finalmente, la carga del fármaco en el preparado se lleva a cabo por adición gota a gota mediante vórtex.

### **2.3. Caracterización de las formulaciones**

#### **2.3.1. Parámetros dimensionales**

El tamaño de las vesículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Mediante esta técnica se analiza la intensidad de la luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, la cual está relacionada con el tamaño y la forma de las partículas. También denominada *Dynamic Light Scattering*, esta técnica permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas suspendidas o dispersadas.

Esta técnica también permite calcular el índice de polidispersión (IP), parámetro que hace referencia a la homogeneidad / heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. Representa una medida de la diferencia del tamaño que suele tener la mayoría de los liposomas analizados en función de su diámetro medio. En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población de liposomas analizada y, por tanto, más heterogéneas serán las vesículas. Así, un valor elevado de IP (0.8 - 1) es indicativo de una muestra heterogénea, mientras que un valor bajo de IP (< 0.2) indicará una elevada homogeneidad de las vesículas en cuanto a sus dimensiones.

El equipo utilizado fue un *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)*. Las medidas se efectuaron por triplicado. Para ello, las muestras de liposomas a analizar fueron diluidas con tampón Hepes pH 7.4 en una proporción 1:20.

#### **2.3.2. Carga superficial**

Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de la dispersión coloidal, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células. El potencial zeta ( $\zeta$ ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética ( $\mu$ ) refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas. Este



parámetro resulta de especial interés en los preparados coloidales, ya que constituye un importante indicador de la estabilidad física de la dispersión. Según la teoría DLVO, un sistema será estable en una solución electrolítica simple cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas sean mayores a sus fuerzas de atracción de Van der Waals. Para determinar la carga superficial de los liposomas, se introdujeron 4 mL de la dispersión liposomal en el equipo *Zetasizer Nano ZS*, donde se calculó  $\zeta$  a partir de  $\mu$ , empleando la ecuación de Smoluchowsky (Bertolotto et al., 2010);  $\zeta = \mu\eta/\varepsilon$  donde  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $\varepsilon$  la constante dieléctrica. La dispersión de liposomas atraviesa una serie de canalículos hasta el interior de una célula fotoeléctrica en donde se soporta una diferencia de potencial. Allí, los liposomas migran hasta el electrodo de carga opuesta. La velocidad de migración de las vesículas se calcula en función de la variación de la frecuencia de la luz de un rayo láser que difracta al chocar con los liposomas en movimiento por el campo eléctrico (movilidad electroforética). El equipo cuenta con un software de control que permite crear un entorno de trabajo personalizado donde se definen las variables de control (presión de aire en bar, porcentaje de vibración de la bandeja, etc.) para cada tipo de ensayo. Las medidas se han realizado por triplicado empleando una dilución 1:20 con tampón Hepes pH 7.4.

### **2.3.3. Intercambio de iones**

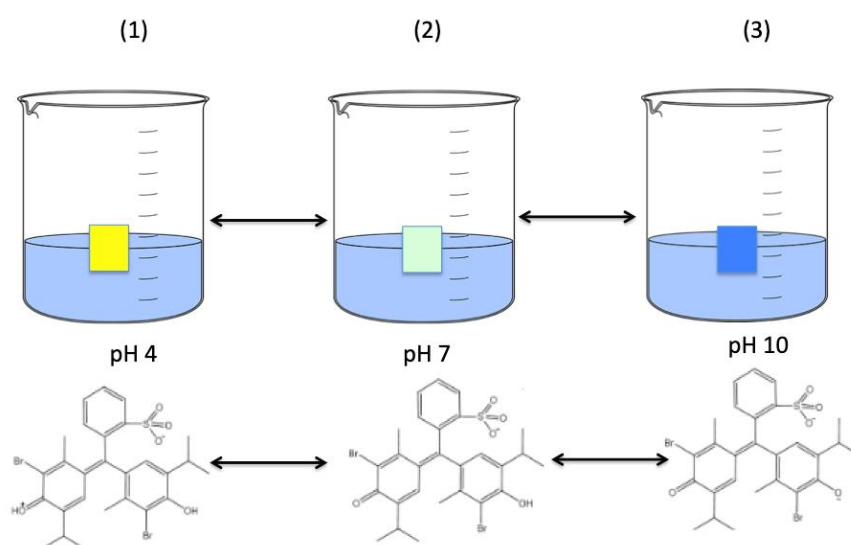
Con el fin de extraer alguna información sobre la segunda etapa de elaboración de los liposomas por el método de gradiente transmembrana, en la que se procede a la realización de una diálisis con el fin de crear el gradiente iónico para favorecer posteriormente la entrada del fármaco al interior de las vesículas, se aplicaron dos técnicas: medida de la conductividad y método colorimétrico.

La conductividad está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones (electrolitos) capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. En este estudio, se llevó a cabo la medida de la conductividad del medio acuoso externo a la bolsa de diálisis con el fin de detectar el intercambio de iones fuera y dentro de dicha bolsa. La medida se llevó a cabo en un conductivímetro (*Hanna Edge*<sup>®</sup>, *España*), introduciendo la celda del conductivímetro y recogiendo los valores (mS/cm) hasta conseguir la estabilización de los datos.

Para corroborar la existencia del intercambio iónico entre el interior y el exterior de las membranas previo a la encapsulación del fármaco, se aplicó un método colorimétrico

usando azul de bromotimol (ABT) como indicador de pH. ABT se caracteriza porque una solución acuosa de este indicador de pH es de color amarillo en una solución de ácido débil y se vuelve azul, pasando por el verde cuando aumenta el pH. El color verde aparece cuando la solución de ABT se acerca al pH neutro (aprox. 7). En la Figura 15 se recoge de forma esquemática los cambios de color que experimenta el ABT en función del pH.

Para este ensayo, se prepararon siete soluciones en un rango de pH de 4 - 11, observando el cambio de color de amarillo a azul. De la misma forma, el indicador fue añadido a la membrana de diálisis, en la cual se encontraban las vesículas, con el fin de apreciar también el intercambio de protones en dicha localización.



**Figura 15.** Cambios en el color del azul de bromotimol (ABT) con el aumento de pH. La bolsa de diálisis que contiene las vesículas es amarilla con valores ácidos, verde a pH neutro y se vuelve azul con valores básicos.

#### 2.3.4. Porcentaje de encapsulación (PdE)

Con objeto de evaluar el porcentaje de fármaco retenido en los liposomas, se eligió el método de centrifugación para separar la fracción de fármaco encapsulada de la no encapsulada, y posteriormente cuantificar los fármacos en estudio por HPLC. La metodología seguida se basó en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, que concluyeron que el método de extracción por centrifugación confiere mejores resultados que el método tradicional de extracción en fase sólida. Este método consistió en la eliminación del fármaco libre por centrifugación (*Eppendorf Centrifuge* 5804 R) a 11.000 rpm a 4 °C durante 60 min (Chimanuka et al., 2002; Fang et al., 2008).

El sobrenadante se filtró y se analizó por HPLC, determinando así la cantidad no encapsulada de fármaco. Al precipitado se le añadió 1 mL de una solución de lauril sulfato sódico (LSS) 0.5% p/v o metanol para facilitar la destrucción de las vesículas y se sometió a 1 min de vórtex y a 5 min de sonicación, tres veces. Después se filtró.

Se cuantificó por HPLC la cantidad de fármaco encapsulado. Este porcentaje de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PdE (\%) = \frac{Q_I}{F_t} \cdot 100$$

Donde PdE es el porcentaje de fármaco atrapado,  $F_t$  es la cantidad total del fármaco con el que estamos trabajando en la muestra y  $Q_I$  es la cantidad de fármaco retenido en las vesículas.

La cantidad de fármaco encapsulado fue cuantificado por un equipo cromatográfico (*Hitachi Elite LaChrom*), equipado con una bomba isocrática L-7100, un conjunto de detector de diodo L-7455 de longitud de onda variable y un auto-inyector L-2200 e interfase D-7000. Para el registro de datos, se utilizó un software de sistema de datos *EZChromElite*.

Las condiciones cromatográficas de los fármacos en estudio se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones cromatográficas para los fármacos analizados. TEO: teofilina. CIP: ciprofloxacino. ACZ: acetazolamida. MET: metformina. SUM: sumatriptán.  $\lambda$ : longitud de onda. TR: tiempo de retención. Todos los fármacos usaron condiciones isocráticas.

	Características de la columna	Composición de la fase móvil	Flujo (mL·min <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	TR (min)	Ref.
<b>TEO</b>	Lichrospher (C-18, 125×4 mm, 5 $\mu$ m, Merck)	Agua milliQ / ACN 9/91 (v/v) a pH 4 con ácido acético glacial	1	273	5.5	(Barnes, 2013)
<b>CIP</b>	Lichrospher (C-18, 100×4.6 mm, 5 $\mu$ m, Merck)	Dihidrógenofosfato de sodio pH 3 con ácido fosfórico / MetOH 72/28 (v/v)	1	278	3.4	(Chamseddin y Jira, 2011)
<b>ACZ</b>	Lichrospher (C-18, 250×4.6 mm, 5 $\mu$ m, Merck)	Dihidrógenofosfato de potasio (pH 3) / ACN / agua 30/20/50 (v/v/v)	0.8	265	1.9	(Clerc y Barenholz, 1995) (Villasmil-Sánchez et al., 2013)

<b>MET</b>	Lichrospher (C-18, 125×4.6 mm, 5 µm, Merck)	PBS (pH 6.8) 0.02 M / ACN 50/50 (v/v)	1.5	236	1.8	(Erickson et al., 2017) (Bouriche et al., 2019).
<b>SUM</b>	Spherisorb OSD2 (C-18, 250×4.6 mm, 5 µm, Merck)	Tampón fosfato 0.05 M pH 6 / ACN 80/20 (v/v)	1	214	7.5	(Villasmil-Sánchez et al., 2013)

## **2.4. Co-encapsulación de ciprofloxacino y teofilina en vesículas lipídicas por método transmembrana**

### **2.4.1 Estudios de solubilidad en diferentes sales de amonio**

Una vez que se seleccionaron TEO y CIP como los fármacos a estudiar, se evaluó el efecto de la sal de amonio donadora en la mejora del gradiente. Además, ya que la nanocrystalización en el interior del compartimento acuoso es necesaria para mantener el fármaco en la fase acuosa y prolongar su liberación (Haran et al., 1993), se analizó la solubilidad de estos fármacos con varias soluciones de sales de amonio: acetato, sulfato, hidrogenofosfato y citrato, todas preparadas a la concentración de 300 mM. Se seleccionó esta concentración en vez de la de 250 mM para apreciar más claramente la nanocrystalización. Las muestras fueron ajustadas a pH 4 y pH 7 con amonio o con ácido clorhídrico. Este test fue llevado a cabo mediante un ensayo de solubilidad. Para esto, se añadieron 400 µL de las soluciones de sales a 100 µL de la solución de TEO (0.36 mM) y de CIP (3.85 mM), en agua Milli-Q. Tras añadirlos, la placa se colocó en un agitador durante 2 h a 25 °C. Las muestras se filtraron en una placa de baja unión hidrofílica (*Millipore, Ref. MDRLN0410*) equipada con un filtro de 0.45 µm al final. La concentración de los filtrados de ambos fármacos se cuantificó por HPLC (Csuha et al., 2015).

### **2.4.2. Optimización del proceso**

La fase de optimización se centró en determinar las condiciones idóneas y la adecuada composición lipídica de las vesículas para la co-encapsulación de TEO y CIP con unas propiedades físico-químicas de calidad.

En este sentido, se realizó un primer estudio cambiando el medio externo de diálisis de HEPES a pH 7.4 a una solución isotónica de NaCl (0.9% p/v). Tras comprobarlo en la literatura, se corroboró que la presencia de una solución no tamponadora en el medio

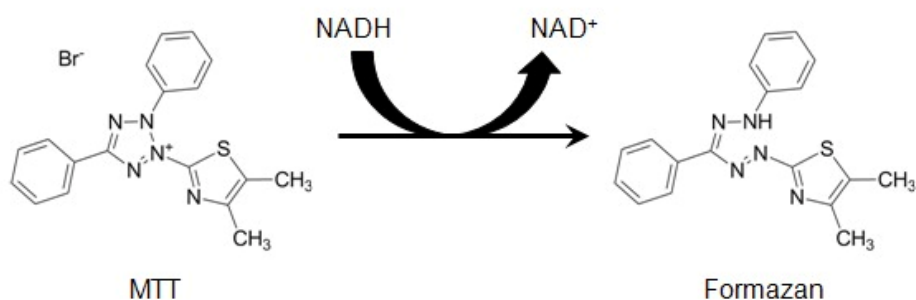
externo, podría mejorar la carga de los ácidos débiles en el interior de las vesículas (Fritze et al., 2006).

Por otra parte, se introdujo un cambio en el orden de la extrusión de las muestras como otra variable. El objetivo de este ensayo consistió en conocer cómo la estructura multilaminar y el cambio en la estructura unilaminar afectan a la carga del fármaco y las propiedades físico-químicas de las vesículas. Finalmente, esta formulación optimizada fue comparada con la técnica convencional de TLE en la que la versatilidad de este método permite incluir ambos fármacos en el compartimento acuoso, y también, TEO en la bicapa lipídica y CIP en el compartimento acuoso.

## 2.5. Estudios de viabilidad celular en cultivos celulares

### 2.5.1. Evaluación de la actividad metabólica celular mediante el ensayo del MTT

Este ensayo consiste en realizar un análisis colorimétrico para detectar la viabilidad celular. Está basado en la actividad de los cultivos celulares dependientes del NAD(P)H que muestran las células vivas. Estas enzimas son capaces de reducir el sustrato 3-(4,5-dimetil)-2-tiozolid-2,5-difeniltetrazolium bromuro (amarillo) en 5-(4,5-dimetil)-2-tiozolid-1,3- difenilformazano (morado).



**Figura 16.** Reacción del NADH. En esta reacción se reduce el MTT (amarillo) a formazano (morado).

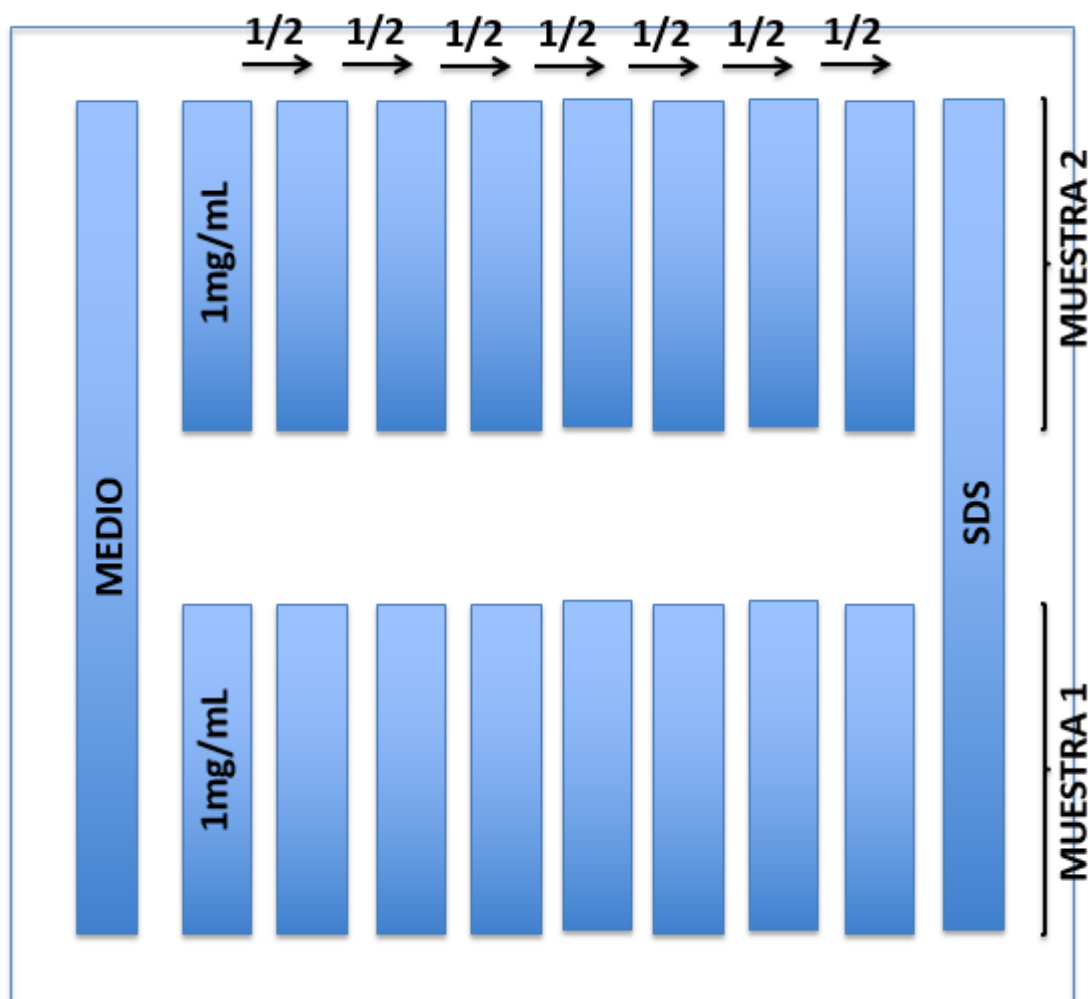
Se determinó la viabilidad celular de soluciones de ambos fármacos (TEO y CIP), liposomas blancos y liposomas cargados con TEO/CIP utilizando diferentes concentraciones de fosfolípidos. En primer lugar, se midió la viabilidad celular con una concentración del 100% y posteriormente se bajó al 75 y 50% para ver la influencia de la concentración lipídica sobre las células, mediante el ensayo del MTT.

Los liposomas (cargados o vacíos) fueron expuestos en forma de dispersión preparados en Hepes y evaluados a las concentraciones de 1 y 2 mg/mL durante 3 y 24 horas. Asimismo, también se testaron soluciones de TEO y CIP a las concentraciones empleadas en los liposomas: 1 mg/mL para TEO, que es un fármaco con un margen terapéutico muy estrecho. Ya a partir de 1.81 mg/mL aumentan los efectos secundarios (Buhecha et al., 2019).

Para CIP se ensayó la concentración de 2 mg/mL. Esta debería ser una concentración segura ya que existe una formulación comercial llamada Lipoquin® con una concentración de 50 mg/mL (Darweesh y Sakagami, 2018).

Para llevar a cabo el ensayo, se sembraron células A549 (células humanas de epitelio alveolar basal) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/plato en una placa de 96 pocillos (*Orange Scientific, Belgium*), en 100  $\mu$ L de DMEM completo. Las células fueron incubadas 24 h a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión celular. Tras este proceso, el medio de cultivo de A549 fue reemplazado por 100  $\mu$ L de nuevo medio (sin rojo de fenol y suplementado con FBS (2% v/v) conteniendo las soluciones a estudiar en un rango determinado de concentraciones. Se utilizó DMEM como control positivo de la viabilidad celular y el lauril sulfato sódico (SDS) (2% w/v) fue considerado como control negativo. Tras la incubación durante 3 o 24 horas, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ L del medio con todos los suplementos a cada pocillo, junto con 25  $\mu$ L de solución de MTT (0.5 mg/mL en PBS, pH 7.4). Tras 4 horas, se retiró el medio. Los cristales de formazano formados se solubilizaron con 100  $\mu$ L de una solución de surfactante con un 10% de SDS en agua (2:1). Las placas fueron incubadas durante la noche para que se produjera la solubilización de los cristales formados y posteriormente se midió la absorbancia de cada pocillo mediante espectrofotometría (*Infinite M200; Tecan, Austria*) a 570 nm y corrigiendo a 650 nm.

En la Figura 17 se recoge un esquema de lo que sería la preparación de la placa de ensayo.



**Figura 17.** Representación esquemática de la placa de cultivo. Columna 1: medio de cultivo; Columna 2: control positivo; Columna 3: concentración más elevada que se emplea, en este caso 1 mg/mL; columnas 4-10: diluciones sucesivas de la muestra 1:2; Columna 11: SDS (control negativo).

### 2.5.2. Evaluación de la integridad de la membrana (Test de lactato deshidrogenasa)

Esta enzima se encuentra normalmente en el citoplasma de las células que se encuentran vivas y su liberación al medio de cultivo se produce porque la membrana celular aumenta su permeabilidad cuando las células están muertas o casi muertas. Cuando la actividad de la enzima aumenta en el sobrenadante indica la lisis de las células. Únicamente se realiza el ensayo con las concentraciones más elevadas debido a su elevado precio.

La integridad de la membrana celular tras la exposición a TEO, CIP y a liposomas blancos y cargados con fármacos se determinó cuantificando la liberación de LDH por las células. El ensayo fue llevado a cabo simultáneamente junto con el del MTT usando el

sobrenadante de las células expuestas a las muestras durante 24 horas. Se seleccionaron las dos concentraciones más altas del ensayo del MTT y también se testaron TEO y CIP libres como controles. Se llevó a cabo un control negativo de LDH incubando las células con medio de cultivo celular solo y con Tritón-X 100 (10%), que se usó como control positivo, asumiendo una liberación de LDH del 100%. Tras la exposición durante 24 horas, se recolectó el sobrenadante de las células y se centrifugó (16000×g, 5 min, 4 °C), cuantificándose la liberación de LDH mediante un kit comercial. Las absorbancias se midieron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm (con una corrección de 690 nm).

Se determinó la liberación de LDH de cada muestra en comparación con el control positivo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

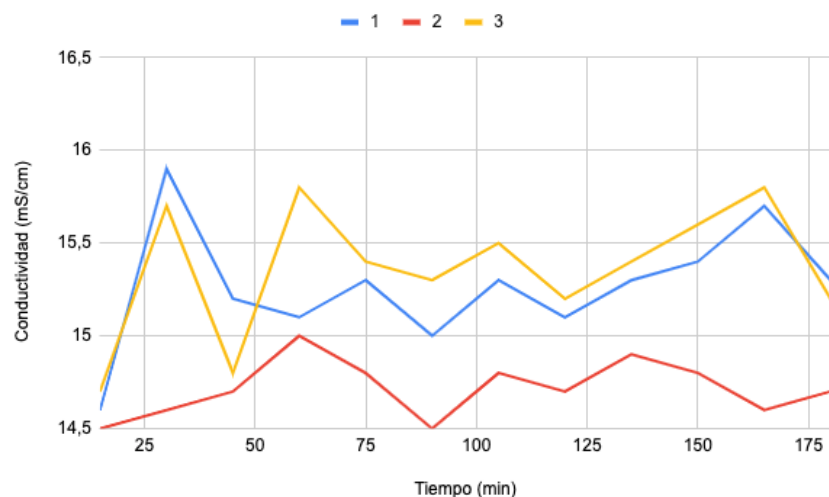
### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Estudios preliminares sobre el método**

El método transmembrana se basa en el intercambio de iones entre el interior y exterior del liposoma. Cuando el interior del liposoma es ácido, el valor externo de pH tiende a ajustarse para lograr las condiciones fisiológicas mediante diálisis con Hepes a pH 7.4. Estas condiciones preliminares son necesarias para lograr una eficacia mayor en la carga del fármaco no ionizado, que difundirá dentro de las vesículas para ser encapsulado.

En este ensayo, se utilizó el gradiente transmembrana del acetato para estudiar el intercambio de iones entre las membranas y se evaluó midiendo la conductividad y el cambio de color del indicador de pH ABT. Los valores de conductividad de la solución receptora se recopilaron durante 3 horas. La Figura 16 muestra la existencia de un intercambio iónico, ya que los valores de conductividad varían a lo largo del tiempo. En primer lugar, los valores de conductividad fueron bajos, debido a que el medio externo fue Hepes. A medida que avanza el tiempo cuando la membrana de diálisis con acetato amónico es introducida, se produce el intercambio iónico entre ambos medios, modificando los valores de conductividad a lo largo del tiempo. Finalmente, una vez que los valores de conductividad fueron estables, concluye el proceso.





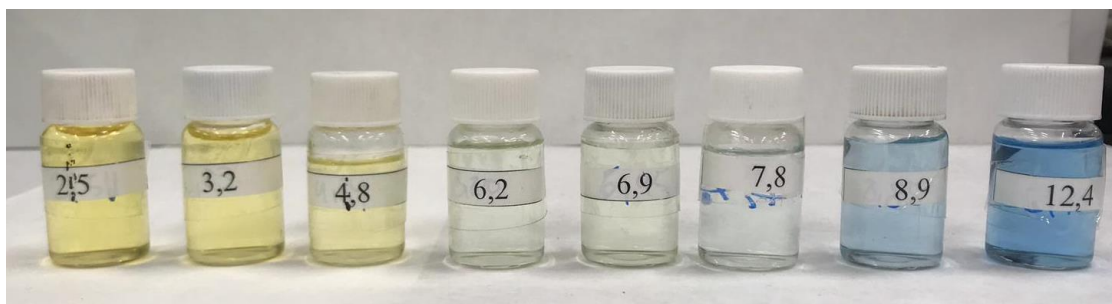
**Figura 18.** Medidas de conductividad en el medio receptor externo, fuera de las membranas de diálisis con respecto al tiempo. 1: liposomas blancos no extruidos; 2: medio externo (Hepes); 3: liposomas blancos extruidos.

Cuando los liposomas son homogéneos y se encuentran en un ambiente estable dispersos en una solución acuosa, la interfaz entre la solución (tampón Hepes) y la bicapa lipídica es suave. Además, al igual que ocurre con las biomembranas, muy pocos iones pasan a través de la membrana de fosfolípidos, y el área superficial de los liposomas en contacto con el medio acuoso es escasa. Por lo tanto, la parte ionizada de la cabeza de los fosfolípidos es estable, quedándose en la parte superficial de los liposomas. El número de iones libres se reduce, lo que explica la baja conductividad cuando hay condiciones de neutralidad (pH 7.4, Hepes). Por tanto, la conductividad de la dispersión de liposomas en condiciones neutras es baja, lo que indica que los liposomas son más estables e integrados (Fan et al., 2017). Sin embargo, a medida que aumenta la entrada de protones en el medio interno, los valores de conductividad aumentan y sale la sal al medio externo, los liposomas se desestabilizan ligeramente debido a que las cabezas de los fosfolípidos capturan el exceso de protones y la membrana se debilita ligeramente destruyendo la estructura estable; sin embargo, se aprecia que a pesar del aumento de conductividad inicial, una vez que desaparece todo el Hepes, la conductividad vuelve a bajar alcanzando valores similares a los iniciales, formando liposomas estables finalmente.

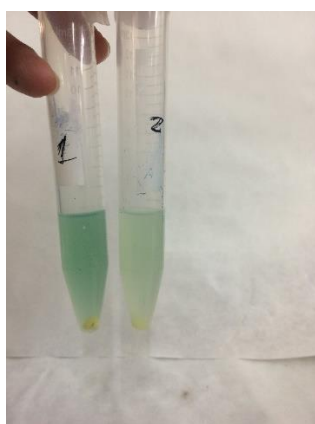
Por otro lado, para detectar el intercambio de iones, se añadió una solución diluida de ABT dentro de la membrana de diálisis en la cual estaba presente la dispersión de liposomas. ABT es un indicador que vira de pH ácido (amarillo) a pH básico (azul) en el rango de 2.5 a 12.5 (Figura 17). Este resultado puede ser detectado visualmente debido al

cambio de pH en la solución interna de acetato amónico, demostrando que existe un intercambio de protones entre ambos medios. Se puede observar que la absorbancia de la solución receptora decrece con el cambio de pH; cuanto más ácida es, más amarilla es la señal y por lo tanto se detecta una mayor absorbancia. A la vez se observa que la absorbancia aumenta con el incremento de pH, cuanto más básica es la solución más azul es y, por lo tanto, más absorbente. Ambos comportamientos pueden explicarse por la ley de Lambert – Beer (Gobrecht et al., 2015).

En la Figura 20 se visualiza el intercambio de iones cuando las muestras ubicadas dentro de la membrana de diálisis se centrifugan, antes (derecha) y después (izquierda) de producido ese intercambio de protones. Se aprecia en la parte inferior del falcon el precipitado de liposomas, cuyo interior es ácido (amarillo). Respecto al líquido sobrenadante, se diferencian las tonalidades del ABT, ya que en el tubo de la derecha aún no se ha producido el intercambio (amarillo verdoso), mientras que, en el tubo de la izquierda, ya ha tenido lugar dicho intercambio de protones, y la coloración torna a azulada (pH más básico).



**Figura 19.** Diferentes soluciones de azul de bromotimol (ABT) a distintos pH.



**Figura 20.** Muestras centrifugadas antes (derecha) y después (izquierda) del proceso de la diálisis.

### **3.2. Efecto de las características físico-químicas del fármaco**

El método transmembrana consiste básicamente en el intercambio de iones entre el interior y el exterior de las vesículas. En este método, el fármaco se carga en liposomas preformados mediante un proceso remoto. Debido a esto, debe ser favorecido el cambio de especies neutras (sin carga), que sean capaces de difundir a través de la membrana, a moléculas ionizadas que no son capaces de difundir a través de ésta. Por tanto, basándonos en este hecho, conocer el grado de ionización y la solubilidad de un fármaco en el medio es fundamental para el éxito del proceso.

Las bases débiles anfipáticas y los ácidos débiles cumplen con estos requerimientos. Por otro lado, la fuerza externa que impulsa la difusión del fármaco del medio externo al interior del liposoma y que mantiene al fármaco dentro, es otra condición esencial para que tenga lugar el proceso (Zucker et al., 2009).

Para evaluar la influencia de estas propiedades en la carga del fármaco, se prepararon cuatro formulaciones con diferentes fármacos. Se evaluaron parámetros dimensionales, potencial zeta y el porcentaje de fármaco encapsulado en los liposomas. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Caracterización físico-química de los liposomas extruidos con diferentes fármacos. MET: clorhidrato de metformina. SUM: succinato de sumatriptán. ACZ: acetazolamida. TEO: teofilina. IP: índice de polidispersión.

	<b>MET</b>	<b>SUM</b>	<b>ACZ</b>	<b>TEO</b>
<b>Tamaño (nm)</b>	216.2±3.13	210.2±3.33	220.7±1.25	210.5±1.36
<b>IP</b>	0.15±0.014	0.20±0.015	0.15±0.021	0.18±0.006
<b>Potencial zeta (mV)</b>	-18.2±0.52	-20.2±1.42	-22.7±1.93	-17.50±0.62

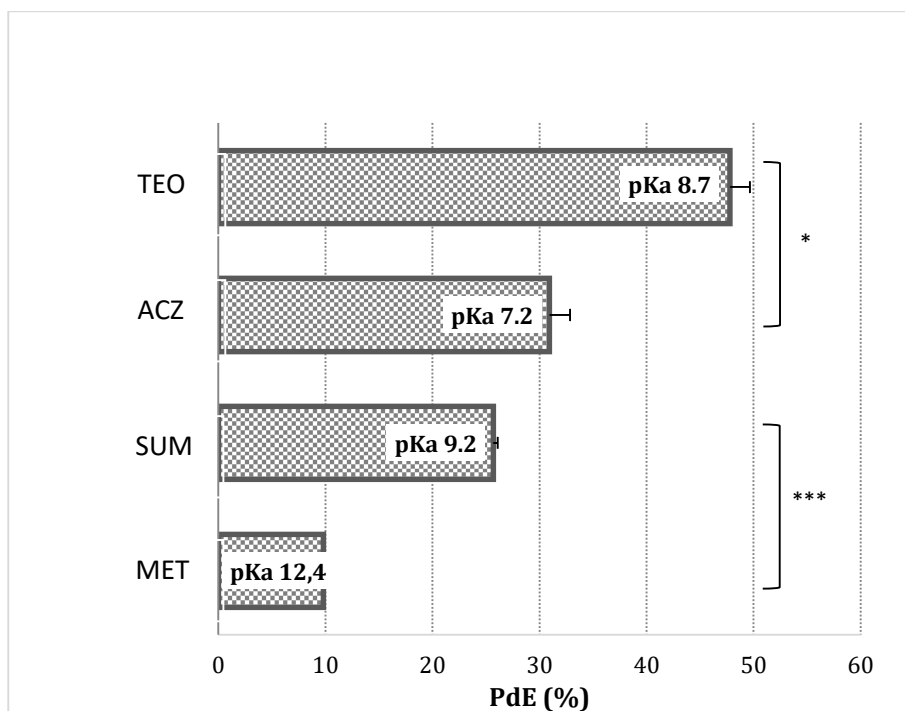
Los tamaños medios estuvieron comprendidos entre 201.2 y 220.7 nm y el IP entre 0.149 y 0.201; ello indica que el paso del fármaco a través de las vesículas no afectó a las características dimensionales de estas. De forma similar, la carga superficial sufrió ligeras modificaciones estando comprendidas entre -17.50 mV en el caso de TEO y -22.7 mV para ACZ.

Sin embargo, cuando se evaluó el PdE de los fármacos se obtuvieron diferencias significativas. La Figura 19 muestra que la TEO fue encapsulada más eficientemente que los otros fármacos.

Analizando los resultados obtenidos, se puede establecer una relación entre la capacidad de atrapamiento del fármaco y las propiedades de ionización de estos, ya que se logró mayor PdE cuando el pKa del fármaco fue menor.

La mayor eficacia de encapsulación fue obtenida para las muestras de TEO (47.8%, pKa 8.7), ACZ (30%, pKa 7.2), después SUM (25.67%, pKa 9.2) y finalmente MET (9.81%, pKa 12.4).

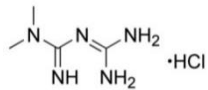
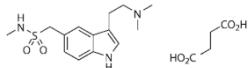
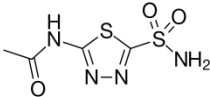
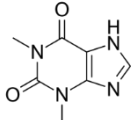
Se sabe que para que ocurra una entrada adecuada del fármaco en el medio amónico, las moléculas han de tener un pKa comprendido entre 2.0 y 11.0, además de tener una elevada solubilidad en agua (Alyane et al., 2016). En nuestro caso, las bases débiles anfipáticas cumplen esos requerimientos y en este caso explica por qué la MET fue encapsulada en mucho menor porcentaje que el resto de los fármacos (Zucker et al., 2009; Eloy et al., 2014), mostrando diferencias estadísticamente significantes con el fármaco siguiente (SUM). Sin embargo, esta relación es menos evidente para las otras formulaciones., Por otra parte, otras propiedades como el pKa, la solubilidad en agua o el coeficiente de partición (Kp) también han de tenerse en cuenta.



**Figura 21.** Porcentaje de fármaco encapsulado (PdE) en los lotes analizados. Los valores son las medias  $\pm$  SEM (n=3). El valor medio fue significativamente diferente comparado por pares (\*P < 0.05, \*\*\* <0.001, test de t-Student). MET: metformina hidrocloreuro. SUM: sumatriptán succinato. ACZ: acetazolamida. TEO: teofilina.

En la Tabla 4 se recogen las propiedades más importantes de las moléculas seleccionadas para este estudio.

**Tabla 4.** Propiedades físico-químicas de los fármacos seleccionados. PM: peso molecular. S: solubilidad. MET: metformina hidrocloreto. SUM: sumatriptán succinato. ACZ: acetazolamida. TEO: teofilina.

	MET	SUM	ACZ	TEO
Est. qca.				
pKa	12.4	9.2	7.2	8.7
Log P	-2.6	1.17	-0.26	-0.02
PM	129.16	295.4	222.25	180.16
S (mg/mL)	1060	21.4	0.98	7.36

Se sabe que el  $K_p$  puede favorecer la difusión pasiva. En estos liposomas, en los que la fase interna es diferente del medio externo debido a la modificación iónica y al pH de la fase acuosa, el  $K_p$  del fármaco puede afectar al comportamiento del liposoma. Además, el  $K_p$  reduce el coeficiente de partición en el interior de la membrana, disminuyendo la tasa de desorción, como fue demostrado por Maurer-Spurej et al. (1999). Esto justifica la elevada eficacia de atrapamiento de TEO ( $\log P$  -0.02) comparado con ACZ ( $\log P$  -0.26).

Por otra parte, la elevada solubilidad en agua de TEO (7.36 mg/mL) en comparación con ACZ (0.98 mg/mL) causa un incremento del gradiente de concentración en el interior y exterior de las vesículas, favoreciendo la encapsulación del fármaco. Los otros fármacos, que no se encuentran ionizados a pH fisiológico, como MET, pueden ser encapsulados mediante otros métodos como con ciclodextrinas. Esta es la razón por la que este fármaco tiene el PdE más bajo; por lo tanto, el método transmembrana no es el más adecuado para encapsular este fármaco, ya que éste no es ionizable (Russo-Spena et al., 2018).

Aparte de todo esto, el peso molecular (PM) constituye otro parámetro que podría influir en el PdE. En este estudio, se demuestra la existencia de una correlación inversa entre el peso molecular y la eficacia de atrapamiento, aumentando a medida que el PM disminuye. La MET es la excepción, probablemente debido a su limitada solubilidad en agua, que

explica su dificultad para ser encapsulada. Esto puede justificarse porque los puentes de hidrógeno entre el fármaco y la fase acuosa disminuyen (Li et al., 2009).

### **3.3. Efecto de la deformabilidad en la carga del fármaco**

Una vez demostrado que TEO es un fármaco adecuado para ser encapsulado en los liposomas mediante el método del gradiente transmembrana, se realiza un estudio para evaluar el efecto de la deformabilidad de la vesícula en la capacidad de la TEO para deformarse. Para esto, se incluyeron tres concentraciones diferentes de DeO-Na en la bicapa lipídica. Los resultados obtenidos (Tabla 5) muestran que la carga superficial de las vesículas no presenta diferencias significativas ni antes, ni tras la extrusión, como ha sido corroborado por otros autores (Bhardwaj y Burgess, 2010).

Sin embargo, el tamaño y el IP disminuyen con la extrusión, como es lógico, y ambos se mantienen constantes en los lotes.

**Tabla 5.** Propiedades físico-químicas de los lotes de TEO antes y después de la extrusión. Se prepararon usando diferentes cantidades de desoxicolato sódico (Deo-Na). NE: no extruido. E: extruido. Las concentraciones de Deo-Na son 5, 10 y 15 (mol%).

<b>Lote</b>	<b>% Deo-Na</b>	<b>Tamaño (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>PdE (%)</b>
<b>NE_Deo5</b>	5	448.96 ± 3.69	0.47 ± 0.03	-20.43 ± 0.95	-
<b>E_Deo5</b>	5	209.23 ± 3.76	0.13 ± 0.01	-18.00 ± 1.15	23.9 ± 3.5
<b>NE_Deo10</b>	10	505.57 ± 6.45	0.45 ± 0.03	-19.57 ± 0.76	-
<b>E_Deo10</b>	10	208.40 ± 3.70	0.15 ± 0.04	-17.90 ± 0.40	33.8 ± 5.6
<b>NE_Deo15</b>	15	495.50 ± 8.86	0.32 ± 0.07	-22.26 ± 0.46	-
<b>E_Deo15</b>	15	206.80 ± 3.35	0.12 ± 0.20	-19.50 ± 2.45	47.8 ± 4.4

Como ya ha sido mencionado previamente, este fenómeno puede ser explicado porque antes de la extrusión, las vesículas se encuentran en un estado de equilibrio, sin estrés en su superficie. Durante la extrusión, la tensión superficial aumenta con respecto a la presión de la membrana, debido a la presión aplicada y al paso de las vesículas a través del filtro, llevando a la ruptura de las vesículas y a la formación de liposomas de menor tamaño. Tras la extrusión, la bicapa reduce su tensión superficial y las vesículas vuelven a un estado de relajación (Zhu et al., 2007).

En términos de IP, los lotes extruidos son siempre iguales o más pequeños que los no extruidos, confirmando que la extrusión favorece la formación de liposomas menos polidispersos en términos de tamaño. Por lo tanto, de acuerdo con la teoría de Mui y Hope (2007) se confirma la idoneidad de este método para la obtención de muestras más homogéneas.

Observando la eficacia de la encapsulación de TEO por el método transmembrana en las vesículas, se encapsuló un mayor porcentaje de fármaco a medida que el porcentaje de Deo-Na aumenta, como se recoge en la Tabla 5. Esto puede ser explicado basándonos en la afinidad de la TEO por la región hidrofóbica en la bicapa lipídica en la que el Deo-Na presente debe solubilizar y encapsular el fármaco.

Por lo tanto, la mayor eficacia de encapsulación se consiguió usando el porcentaje más elevado de Deo-Na (15% del total de lípidos), de acuerdo con Hao et al. (2016). La adición de sales biliares, como el Deo-Na, en formulaciones de liposomas, queda, por tanto, justificada en este estudio. En primer lugar, actúan como activadores del borde, aumentando la deformabilidad de las vesículas. Por otra parte, son derivados anfipáticos del colesterol que aumentan la dispersión lipídica. Para las formulaciones pulmonares, la barrera de surfactante es el primer contacto que la sustancia inhalada encuentra, una vez alcanzado el alveolo. Esta fina barrera cubre el área respiratoria del pulmón, lo que ofrece protección frente a las sustancias tóxicas inhaladas (Zuo et al., 2008). En condiciones normales, la tensión superficial cambia durante el ciclo de respiración, haciendo que respirar sea más fácil. Sin embargo, si se encuentra dañado, la tensión superficial no aumenta durante la compresión espiratoria, pudiendo colapsar el alveolo; además, los bronquiolos respiratorios pueden llenarse de líquido, haciendo el proceso respiratorio complicado. En el tema que nos ocupa, algunos autores (Hildebrand et al., 2003; Sørli, 2015) demostraron que la interacción y solubilización entre las bicapas de PC y las sales biliares colato sódico (CS) y Deo-Na muestran que el comportamiento del proceso de solubilización depende de la concentración de la sal y de la longitud de la cadena de fosfolípidos (Hildebrand et al., 2002).

#### **3.4. Co-encapsulación de teofilina y ciprofloxacino**

Una vez que la formulación de TEO es encapsulada mediante carga remota, el siguiente paso fue incluir CIP en la formulación. Esta fluorquinolona tiene la capacidad de alcanzar elevadas concentraciones en el pulmón y bajas concentraciones sistémicas tras la

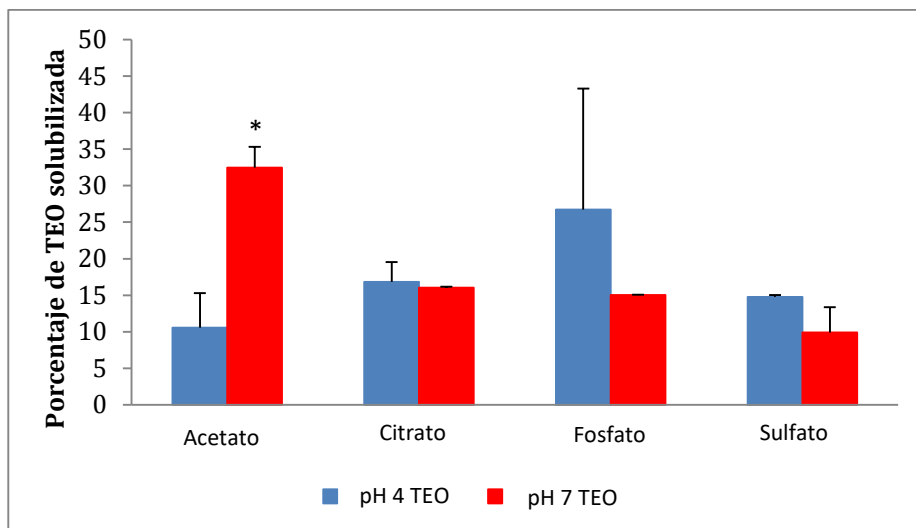
inhalación, comparado con la vía oral o la administración intravenosa. Por otro lado, las formulaciones de liposomas con ambos fármacos, CIP y TEO, podrían mejorar la tolerancia, aumentar el cumplimiento por parte del paciente al reducir la dosis y mejorar la penetración en los biofilms bacterianos, mejorando el tratamiento de las infecciones intracelulares. Como CIP es un ácido débil, la primera etapa consistió en evaluar el efecto de diferentes sales de amonio en la encapsulación de ambos fármacos y en las propiedades de los liposomas.

#### **3.4.1. Efecto de las sales de amonio en la solubilidad de los fármacos**

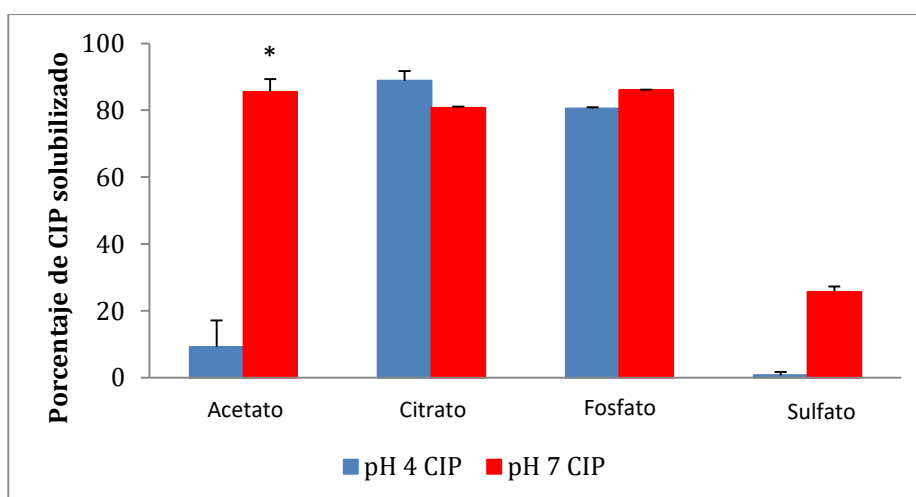
Siguiendo con el propósito de este proyecto de investigación, el siguiente paso consistió en co-encapsular TEO con otro fármaco que hubiese demostrado tener una elevada eficacia en el tratamiento de la FQ, el CIP. Para esto, se llevó a cabo un primer estudio basado en la solubilidad de cada uno de los fármacos en diferentes sales de amonio para seleccionar la sal más adecuada que proporcione mayor nanoprecipitado en el interior del compartimento acuoso de los liposomas.

Las Figuras 22 y 23 muestran que la solubilidad de TEO y CIP en acetato amónico dependen del valor de pH de manera que disminuye con el descenso del valor de pH de esta sal. Sin embargo, se observa un comportamiento diferente con las otras sales (citrato, fosfato y sulfato). Tratándose de TEO, no existen diferencias significativas cuando las sales de amonio se usan a diferentes pH. Parece probable que la cosmotropía (estructura) del contraión contribuye a la solubilidad de TEO. Las sales usadas para la carga, citrato, sulfato y fosfato, son todas componentes de las series liotrópicas o de Hofmeister (Hafez et al., 2000). Estas series reflejan el ranking de iones según su fuerza de unión con el agua pura, y con el descenso concomitante en la hidratación de otros compuestos.





**Figura 22.** Porcentaje de TEO solubilizada usando diferentes sales de amonio a pH 4 y pH 7.



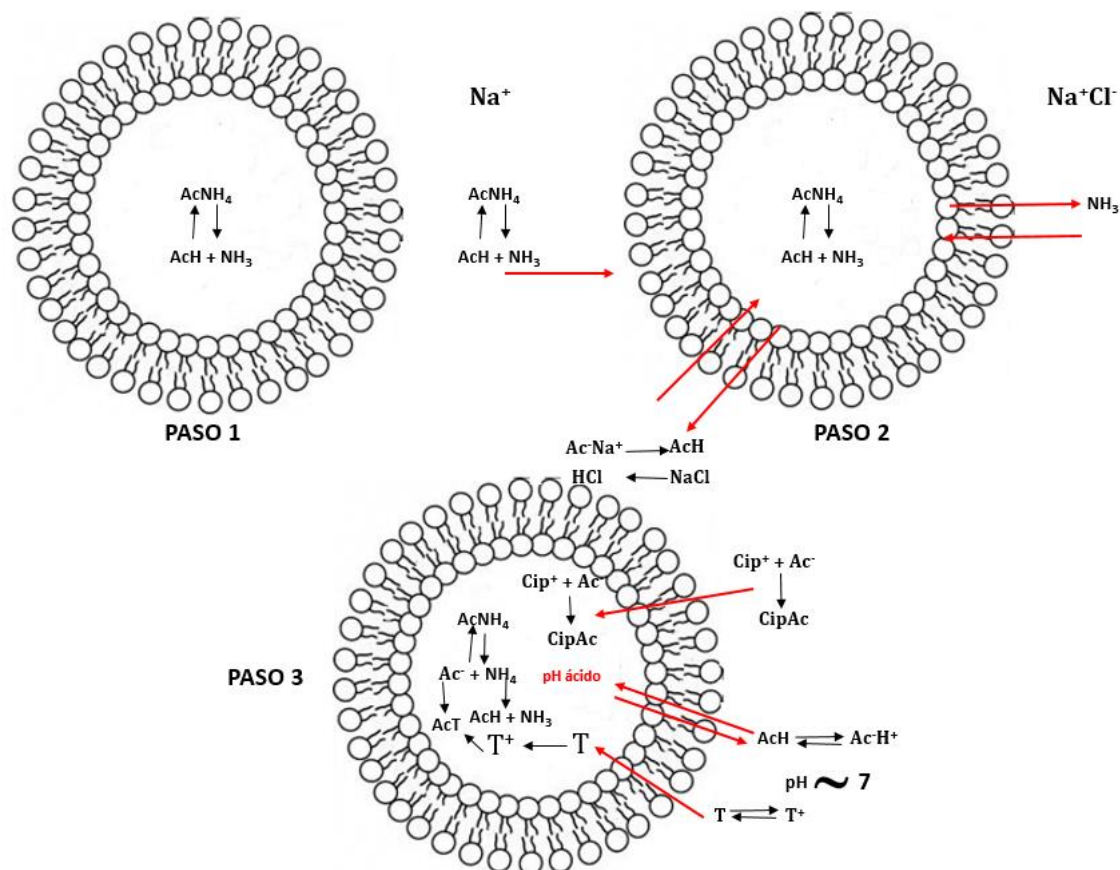
**Figura 23.** Porcentaje de CIP solubilizado usando diferentes sales de amonio a pH 4 y pH 7.

Por otra parte, la solubilidad de CIP en todos los tampones con pH 7 es elevada, mientras que a pH 4 la solubilidad fue baja y se formaron grandes precipitados. Este estudio muestra que la solubilidad del CIP es dependiente del pH, sobre todo con las sales de sulfato y acetato.

Del estudio de solubilidad, se pueden extraer dos conclusiones importantes. En primer lugar, el acetato amónico fue la sal seleccionada como donadora para obtener la fuerza necesaria para crear el gradiente que permita la carga del fármaco. En segundo lugar, las amplias diferencias en la solubilidad de los fármacos entre el pH 4 y el pH 7, refutan la

mayor encapsulación del fármaco, ya que éste permanece solubilizado a pH fisiológico y nanoprecipita a bajo pH en el interior de las vesículas.

En la Figura 24 se recoge un esquema de lo que sería el proceso de atrapamiento de ambas moléculas con gradiente de acetato amónico.



**Figura 24.** Representación esquemática del intercambio iónico para TEO y CIP en el método transmembrana.

La elevada diferencia en los coeficientes de permeabilidad ( $P_d$ ) entre el amoníaco neutro ( $P_d = 0.12 \text{ cm/s}$ ) y el anión acetato ( $P_d = 0.49 \text{ cm/s}$  del ácido acético) combinado con la facilidad de TEO y CIP para penetrar en el interior del liposoma, junto con el bajo coeficiente de partición octanol / fase acuosa liposomal. Todo esto juega un papel importante en el desarrollo de este proceso (Lee et al., 1999; Bandara et al., 2016).

Este proceso se basa en la presencia del anión  $\text{NH}_4^+$ , ya que este se disocia en un protón y el gas neutro amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), que posee un elevado coeficiente de permeabilidad. Esta disociación depende del pH, de manera que cuanto mayor es el pH, mayor es la disociación del ión  $\text{NH}_4^+$ . La carga de bases débiles anfipáticas como TEO requiere de la presencia de  $\text{NH}_3$  en el interior del liposoma, ya que posee un elevado coeficiente de

permeabilidad, difundiendo a través de la membrana hacia la fase acuosa extraliposomal, dejando un exceso de protones y creando un gradiente (Eloy et al., 2014; Fritze et al., 2006).

Tras esto, TEO difundirá a través de la membrana liposomal y alcanzará la fase acuosa intraliposomal en su forma no cargada (no protonada). Una vez que alcanza el interior de la vesícula, se protona usando el exceso de protones, por lo tanto, elevando el pH, y finalmente disociando el  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ , comenzando de nuevo el ciclo (Haran et al., 1993; Barenholzm y Yechezkel, 2007).

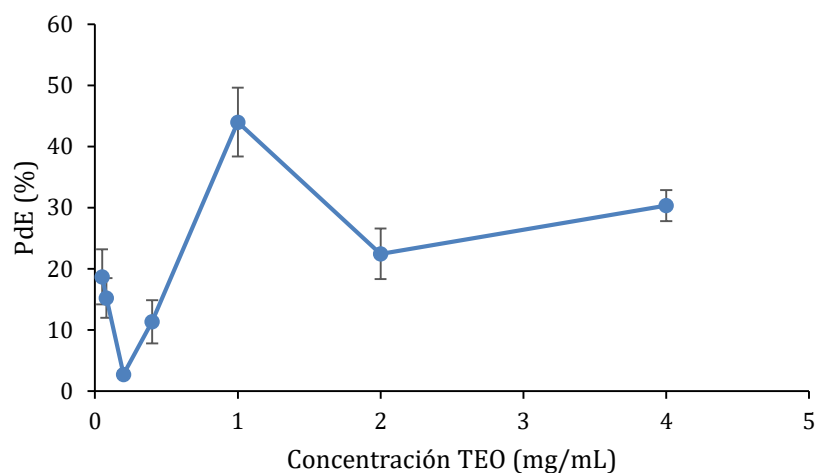
CIP, que es una molécula zwitteriónica, contiene dos sitios protonables (vid. Figura 13). Es soluble en condiciones ácidas y alcalinas, pero es neutro y poco soluble en el rango de pH fisiológico. Esta baja solubilidad resulta en bajos niveles de encapsulación (< 20%) cuando el fármaco se intenta encapsular usando la técnica estándar de citrato.

Algunos autores explican los elevados valores de acumulación de fármaco en el interior de los liposomas basándose en varios factores, incluyendo pH, capacidad tamponadora y solubilidad del fármaco en varias soluciones salinas (Fritze et al., 2006). Con el fin de esclarecer esta situación, a continuación se realizó un estudio de optimización teniendo en cuenta estos factores y otros, como la concentración del fármaco.

#### **3.4.2. Efecto de la concentración de fármaco**

Para optimizar el proceso habitual de encapsulación de TEO y CIP, se estudió la carga remota de varias concentraciones, llevada a cabo por el gradiente transmembrana del acetato amónico.

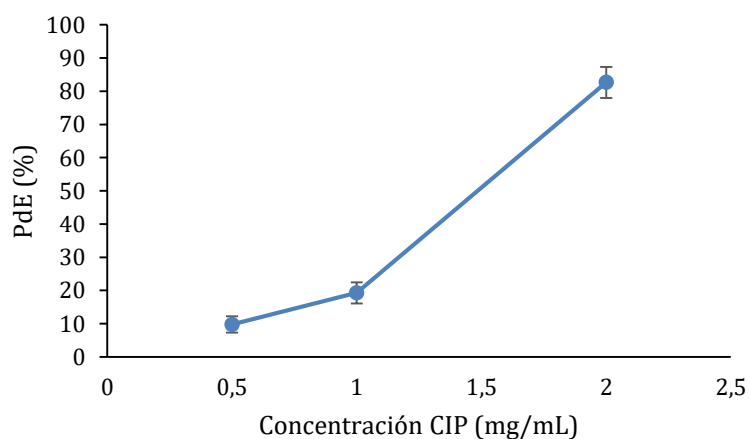
Se obtuvieron características físico-químicas similares en las vesículas de TEO que contenían siete concentraciones diferentes de fármaco que comprendían desde 0.05 a 4 mg/mL, tamaño (192 – 219 nm), PdI (0.13 – 0.17) y potencial zeta (desde -20.9 a -24.2 mV). Sin embargo, para las eficacias de encapsulación (PdE), se observó que el valor más elevado fue para la concentración de 1 mg/mL (Figura 25). Tras éste, la tendencia fue decreciente, probablemente debido a la saturación de las vesículas, disminuyendo la capacidad para encapsular el fármaco.



**Figura 25.** Eficacias de encapsulación de los lotes preparados con TEO.

Analizando las formulaciones con CIP, las propiedades físico-químicas de los lotes que se hicieron a tres concentraciones diferentes (204 – 212 nm), IP (0.11 – 0.17) y potencial zeta (-11.3 a -17.3 mV), mostraron valores ligeramente menores a los elaborados con TEO en lo referente a tamaño y potencial zeta. Estos resultados pueden estar relacionados con el reordenamiento del CIP en la membrana lipídica de los liposomas deformables, lo que lleva a una reducción del tamaño y menor tensión en la superficie de la vesícula, reduciendo el potencial zeta de los liposomas.

El atrapamiento de CIP en el interior de esas vesículas ha demostrado seguir una tendencia ascendente a medida que la concentración aumenta (Figura 26), alcanzando el mayor valor en 2 mg/mL.



**Figura 26.** Eficacia de encapsulación (PdE) de los lotes preparados con CIP.

Por lo tanto, la formulación final estará compuesta por 1 mg/mL de TEO y 2 mg/mL de CIP, usando acetato amónico como sal del proceso para la carga remota eficiente y estable de ambos fármacos en nanoliposomas preformados.

La co-encapsulación de TEO y CIP mediante el método transmembrana lleva a un descenso del PdE de ambos fármacos. Los resultados muestran una reducción del CIP encapsulado a un 70.89% y de TEO al 10%. Como se esperaba en base a los resultados anteriores de la encapsulación de TEO, la presencia del tampón Hepes a pH 7.4 en el exterior de las vesículas puede afectar a la carga del fármaco, ya que la solubilidad de ambos fármacos y de sus formas ionizadas es limitada. Además, la carga del fármaco en vesículas unilaminares fue llevada a cabo extruyendo las muestras después de encapsular para comprobar si las características lipídicas de las vesículas pueden influir en la encapsulación de estos fármacos.

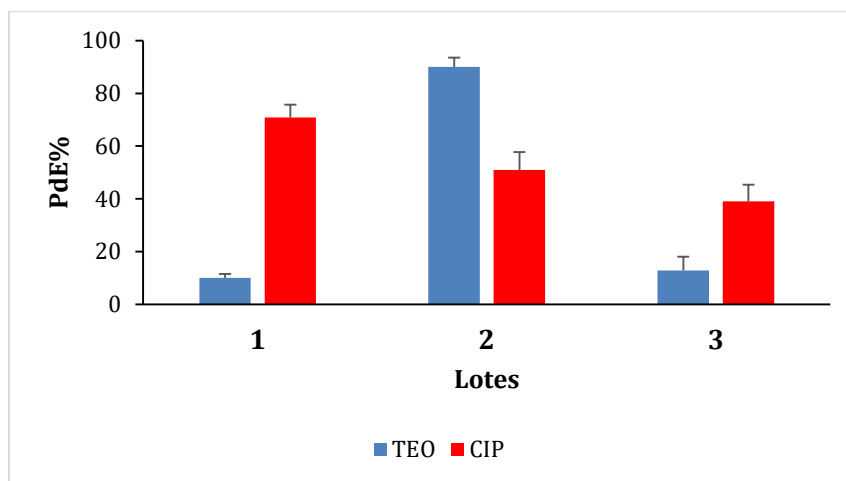
Con el propósito de mejorar la calidad del proceso, decidimos analizar cómo la presencia de NaCl como medio externo sin capacidad tamponadora puede interferir en la capacidad de carga del proceso. También se estudió el efecto de las vesículas extruidas antes de encapsular con la finalidad de comprobar si el proceso de extrusión influía sobre la encapsulación y las características físico-químicas de las vesículas.

### **3.4.3. Efecto del NaCl como medio externo no tamponador y extrusión antes de cargar**

Este método de encapsulación se basa en el intercambio de iones entre el interior del liposoma y el medio externo que normalmente es una solución tampón (Alyane et al., 2016).

El cambio del medio externo a una solución sin capacidad tamponadora (NaCl 0.9% p/v), hace que se incremente el PdE de ambos fármacos como puede apreciarse en la Figura 27. Ciertas cantidades de amoníaco neutro difundirán al exterior de la vesícula, creando un medio ácido interior sin capacidad tamponadora con un  $\text{pH} \cong 2.7$  (Fenske y Cullis, 2007). Cualquier fármaco sin ionizar que difunda al interior de la vesícula consumirá un protón y, por lo tanto, el fármaco será encapsulado posteriormente tras ser cargado. Si este fenómeno se realiza de forma continua, la captación del fármaco lleva al consumo de los protones disponibles y a la difusión del resto del amonio neutro desde las vesículas, lo que llevará a la creación de más protones para conseguir captar el fármaco. Esto

continúa hasta que ambos fármacos son cargados esperando a que se complete la entrada de protones, dejando el pH final en 5.1 unidades (Fenske y Cullis, 2007).



**Figura 27.** Eficacia de encapsulación (PdE) de los lotes que contenían ambos fármacos, 1: Ambos fármacos y HEPES como medio externo, 2: ambos fármacos y NaCl como medio externo, 3: ambos fármacos y NaCl como medio externo y extrusión antes de encapsular.

La TEO libre difunde al interior de los liposomas donde se ioniza, quedando atrapada en el interior; esto inhibe su posterior salida a través de la membrana y resulta en acumulación en el interior del liposoma. En el caso del CIP, que presenta más dificultades para ser co-encapsulado, el uso de estas condiciones le favorece, porque el fármaco se intercambia por la sal con HCl, quedando a su vez ionizado y acumulándose en el interior del liposoma, quedando finalmente ambos fármacos encapsulados.

Finalmente, este paso de optimización fue concluido confirmando que encapsular el fármaco tras la extrusión lleva a peores resultados en términos de PdE y propiedades físico-químicas. Ciertamente, a pesar de que el tamaño y la carga superficial fueron similares usando ambos métodos modificados, el IP aumentó significativamente cuando se cargó después de la extrusión (0.29 versus 0.71). Además, el PdE no mejoró con esta modificación. Cuando la muestra fue extruida después de encapsular, el PdE de ambos fármacos aumentó. Esto puede ser justificado en base a las propiedades de solubilidad de ambas sustancias, la distribución de las áreas concéntricas multilaminares acuosa-lipídica en el interior de las vesículas (Kp), la presencia de un activador del borde en la bicapa lipídica y el tamaño de los liposomas antes de extruir, que fue mayor para mejorar la carga

del fármaco. Por lo tanto, podemos concluir que la estructura multilaminar proporciona condiciones favorables para favorecer la encapsulación de CIP y TEO.

#### 3.4.4. Carga remota transmembrana versus TLE

Durante el presente capítulo, el método transmembrana ha sido presentado como un método mejorado para co-encapsular una base débil (TEO) junto con un ácido débil (CIP) en una única formulación.

A continuación, se compararon las condiciones óptimas alcanzadas con el método convencional (TLE) para encapsular fármacos hidrofílicos y lipofílicos. Los resultados, que se muestran en la Tabla 6, mostraron mejores PdE con el método propuesto (gradiente transmembrana). Además, las propiedades físico-químicas de las vesículas por TLE nos hacen decidirnos por el método transmembrana como alternativa para co-encapsular fármacos de diferente naturaleza.

**Tabla 6.** Parámetros de caracterización y PdE% de ambos fármacos encapsulados por TLE y por el método del pH transmembrana.

Método	CIP	TEO	PdE% CIP	PDE% TEO	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
TLE	A	L	35.1±3.1	9.1±2.2	1495± 67	0.57±0.30	-2.3±0.39
TLE	A	A	61.3±5.4	34.3±5.1	107±1	0.27±0.27	-20.3±0.66
TM	A	A	90.0±6.5	50.9±4.8	174± 1	0.29 ± 0.075	-16.6 ± 0.75

El método transmembrana constituye una técnica de carga de fármacos menos agresiva que el TLE, evitando las elevadas temperaturas y el vórtex, que puede desnaturalizar algunos compuestos, como las proteínas (Khodaverdian et al., 2018). Estas condiciones pueden llevar a la pérdida de sus propiedades, causando consecuencias indeseables (Alyane et al., 2016).

### 3.5. Evaluación de la viabilidad celular

En Nanomedicina, se está invirtiendo mucho tiempo y esfuerzo en desarrollar sistemas de liberación de fármacos eficientes que puedan superar los obstáculos para ser capaces de llegar al tejido o células diana causando los mínimos efectos adversos y protegiendo al fármaco encapsulado de su eliminación por el sistema inmune (Etheridge et al., 2013). Los liposomas y las micelas son candidatos ideales para este propósito. En los liposomas, las bicapas fosfolipídicas que envuelven al compartimento acuoso se emplean para cargar

el fármaco, mientras que las micelas formadas por copolímeros anfifílicos tienen cubiertas hidrofílicas y núcleos hidrofóbicos para transportar fármacos poco solubles. Normalmente, el tamaño, la composición y las modificaciones en la superficie son claves para conocer su función y sus posibles efectos adversos (Moghimi et al., 2012). Es crucial que los sistemas de liberación de fármacos sean seguros y que cumplan su propósito causando la menor toxicidad posible (Nel et al., 2013).

En este apartado de la Tesis Doctoral, lo que se pretende es evaluar la citotoxicidad que puedan causar las formulaciones desarrolladas, con el fin de optimizar la composición para futuros estudios en animales de experimentación. Para ello, se realizarán estudios con la formulación optimizada en los apartados anteriores (lo denominaremos como proporción 100% lípidos/fármacos) para después reducir esta proporción al 75% y 50% con el fin de aumentar el denominado *drug loading*.

### **3.3.1. Evaluación de la viabilidad celular de las formulaciones con el 100% de fosfolípidos**

El MTT, previamente detallado en la parte experimental de la memoria, evalúa la actividad metabólica de las células mediante la exposición de éstas a nuestras muestras, y se ha usado a menudo en el estudio de fármacos encapsulados en nanotransportadores (Rodrigues et al., 2015). Evalúa la capacidad que tienen las células para reducir el MTT a sales de tetrazolio, una acción que depende del metabolismo mitocondrial. De esta forma, una reducción de la actividad metabólica es aceptado como un indicador de daño celular (Scherliess, 2011).

En este trabajo, las células A549 fueron cultivadas y expuestas a diferentes concentraciones de TEO y CIP, en solitario y en combinación, así como liposomas blancos y cargados con fármacos. Los fármacos se usaron a 1 mg/mL (TEO) y a 2 mg/mL (CIP), ya que fueron las concentraciones que alcanzaron la mayor eficacia de encapsulación. Se parte de la premisa de que la encapsulación ha de ser la mayor posible para reducir la toxicidad celular para aumentar la ratio fármacos / lípidos. Además, ambas formulaciones se testaron durante un período de tiempo corto (3 horas) y durante un tiempo más largo (24 horas).

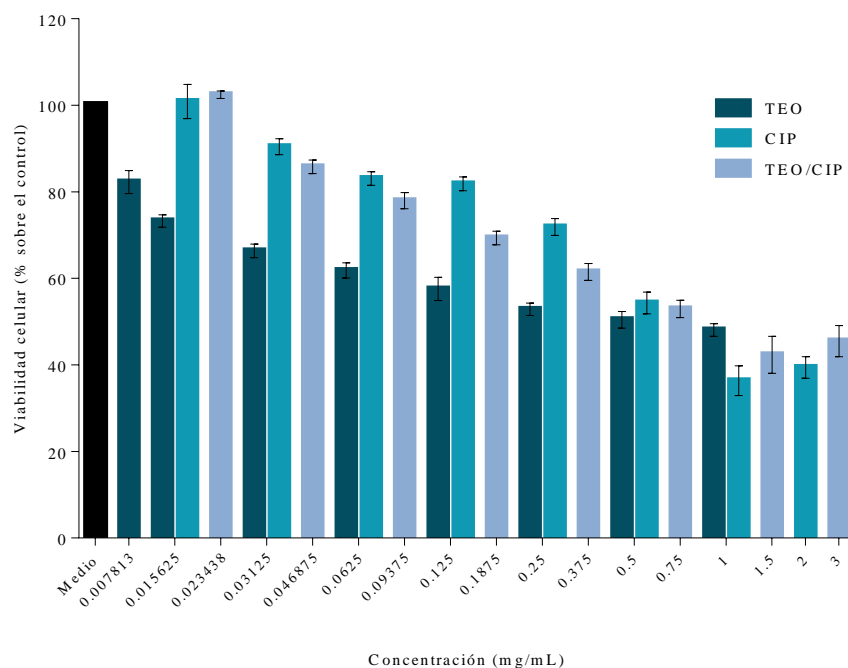
La norma ISO 10993 considera que el efecto citotóxico existe cuando la viabilidad celular desciende por debajo del 70%. Por lo tanto, este fue el valor a tener en cuenta para los ensayos.



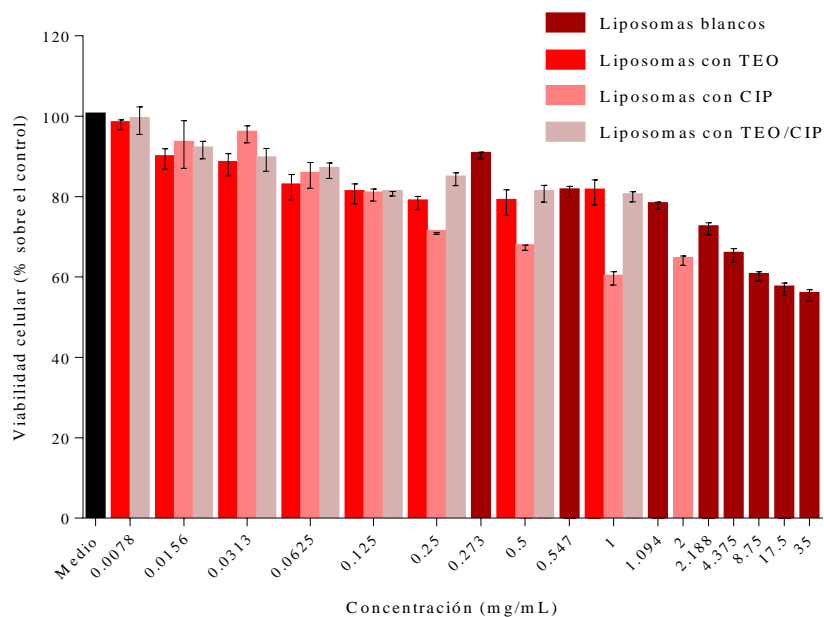
Los resultados expuestos en la Figura 28 mostraron que, tras una exposición de 3 horas, los fármacos libres presentaban toxicidad celular a las concentraciones más elevadas, donde la viabilidad celular fue menor del 70%.

En los fármacos libres, TEO mostró mayor toxicidad. Como se ha explicado anteriormente, su rango terapéutico es muy estrecho, situándose entre 30 - 100  $\mu$ M (Buhecha et al., 2019). Casi todas las concentraciones probadas demostraron ser tóxicas alcanzando el 60% de la viabilidad celular registrada con respecto al control de las células incubadas en el medio de cultivo (100%,  $p < 0.05$ ). CIP, de forma general, induce mayores niveles de viabilidad celular a las mismas concentraciones que TEO, pero esto solo se mantiene hasta 0.5 mg/mL. Superada esta concentración, la situación se invierte, alcanzando CIP una viabilidad en torno al 40% para 2 mg/mL, una concentración que no fue probada para TEO. La combinación de los dos fármacos siguió un perfil dirigido esencialmente por el contenido de CIP, con resultados similares al fármaco en solitario.

En cuanto al efecto de los liposomas blancos y cargados (Figura 29), la viabilidad celular tras 3 horas de exposición fue generalmente más alta en comparación con los fármacos libres.



**Figura 28.** Viabilidad celular de los fármacos en estudio para 3 horas.



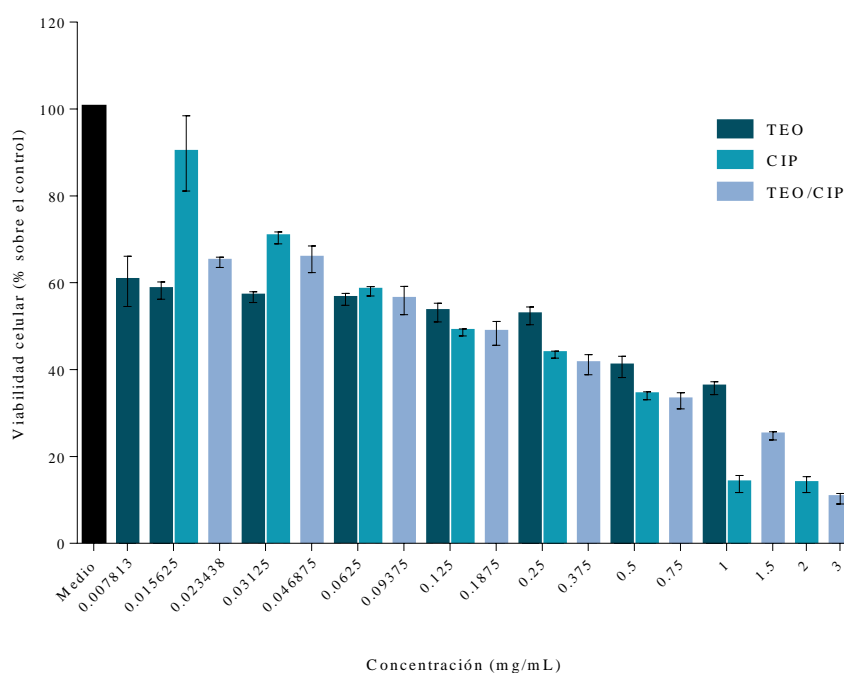
**Figura 29.** Viabilidad celular de los liposomas con el 100% de fosfolípidos cargados con los fármacos en estudio para 3 horas.

De hecho, solo en dos casos, los valores se acercan al 60% de la viabilidad celular, nunca yendo más allá de este valor. Por lo tanto, se puede sugerir que los liposomas tienen un efecto protector para las células, permitiendo una mejora del perfil de seguridad del fármaco. Los estudios se llevaron a cabo testando liposomas cargados con CIP a una

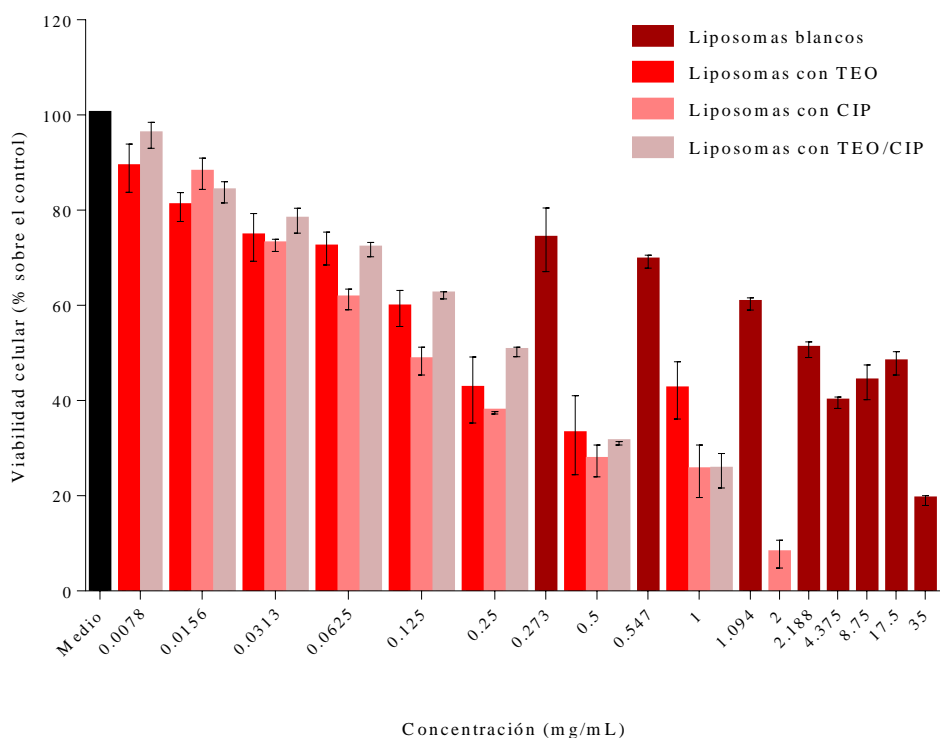
concentración máxima de 2 mg/mL, los de TEO a un máximo de 1 mg/mL y los liposomas de CIP/TEO a una concentración máxima de 3 mg/mL (que corresponde a 2 mg/mL para CIP y a 1 mg/mL para TEO). Los tests con TEO fueron priorizados debido a su elevada toxicidad ya que, según la literatura, su rango terapéutico es muy estrecho, causando toxicidad por encima de 1 mg/mL (Buhecha et al., 2019).

La exposición prolongada de hasta 24 horas (Figura 30) indujo mayor variabilidad en la viabilidad celular, en algunos casos aumentando la toxicidad identificada en el ensayo de 3 horas. Con la excepción de las concentraciones más bajas de CIP (hasta 0.03 mg/mL), todas las muestras de fármaco libre produjeron niveles de viabilidad celular inferiores al 70% (Figura 30).

También se observó un aumento de la toxicidad en las formulaciones de liposomas. La Figura 31 muestra que la viabilidad celular decrece significativamente cuando las células fueron expuestas a liposomas blancos y cargados, con una viabilidad celular menor al 70% a partir de la concentración de 0.0625 mg/mL. Sin embargo, hasta esta concentración, fue visible el efecto protector de los liposomas, como fue comprobado también en el test de 3 horas. En general, se observa un efecto tiempo-concentración dependiente en la viabilidad celular producido por los fármacos libres y las formulaciones liposomales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 30.** Viabilidad celular de los fármacos en estudio para 24 horas.



**Figura 31.** Viabilidad celular de los liposomas con el 100% de fosfolípidos cargados con los fármacos en estudio para 24 horas.

A concentraciones bajas, la toxicidad de ambos fármacos fue similar; sin embargo, cuando alcanzan 1 mg/mL, CIP incrementa su toxicidad. Una posible explicación podría ser la fototoxicidad de CIP, ya que las fluoroquinolonas inducen la peroxidación de la membrana lipídica y la citotoxicidad de cultivos celulares (Haddad y Kümmerer, 2014). Además, cuando CIP fue encapsulado en los liposomas, la viabilidad celular descendió un poco, particularmente a partir de 0.25 mg/mL y concentraciones mayores. Posiblemente, la presencia de los lípidos aceleró el proceso de degradación de los fármacos, alterando los procesos de degradación y llevando a la formación de diferentes productos de degradación. La composición de las bicapas lipídicas tuvo, por tanto, un impacto significativo en este proceso; la presencia de cadenas de ácidos grasos insaturados llevó a la pérdida de CO<sub>2</sub> y aumentó la frecuencia de deshidrogenación, seguida de una pérdida del átomo de flúor (Zgadzaj et al., 2019). Según la literatura existente, las vías de transformación del CIP durante la fotodegradación en soluciones acuosas ocurre principalmente por la sustitución del átomo de flúor, hidroxilación del núcleo de la quinolona, degradación oxidativa del anillo de piperazina o transformación de la amina en amida (Haddad y Kümmerer, 2014).

Cuando los fármacos se encuentran en su forma libre, como se ha explicado anteriormente, TEO muestra un efecto concentración-dependiente, aunque no muy acentuado. CIP muestra un efecto más pronunciado concentración-dependiente. A las 24 horas, ambos fármacos muestran un efecto tiempo-dependiente, manteniendo TEO solo el 60% de la viabilidad celular a las concentraciones más bajas ensayadas (0.008 mg/mL). Sin embargo, de forma general, la encapsulación en liposomas generalmente parece reducir la toxicidad de estos fármacos. Esto podría ser explicado porque el contacto entre el fármaco y la célula se produce a medida que éste es liberado del liposoma. Sin embargo, el fármaco libre es captado rápidamente por la membrana celular (Ron-Doitch et al., 2016). Por ello, se confirma por qué los liposomas son los sistemas de liberación más empleados en la práctica clínica (Zhang et al., 2019).

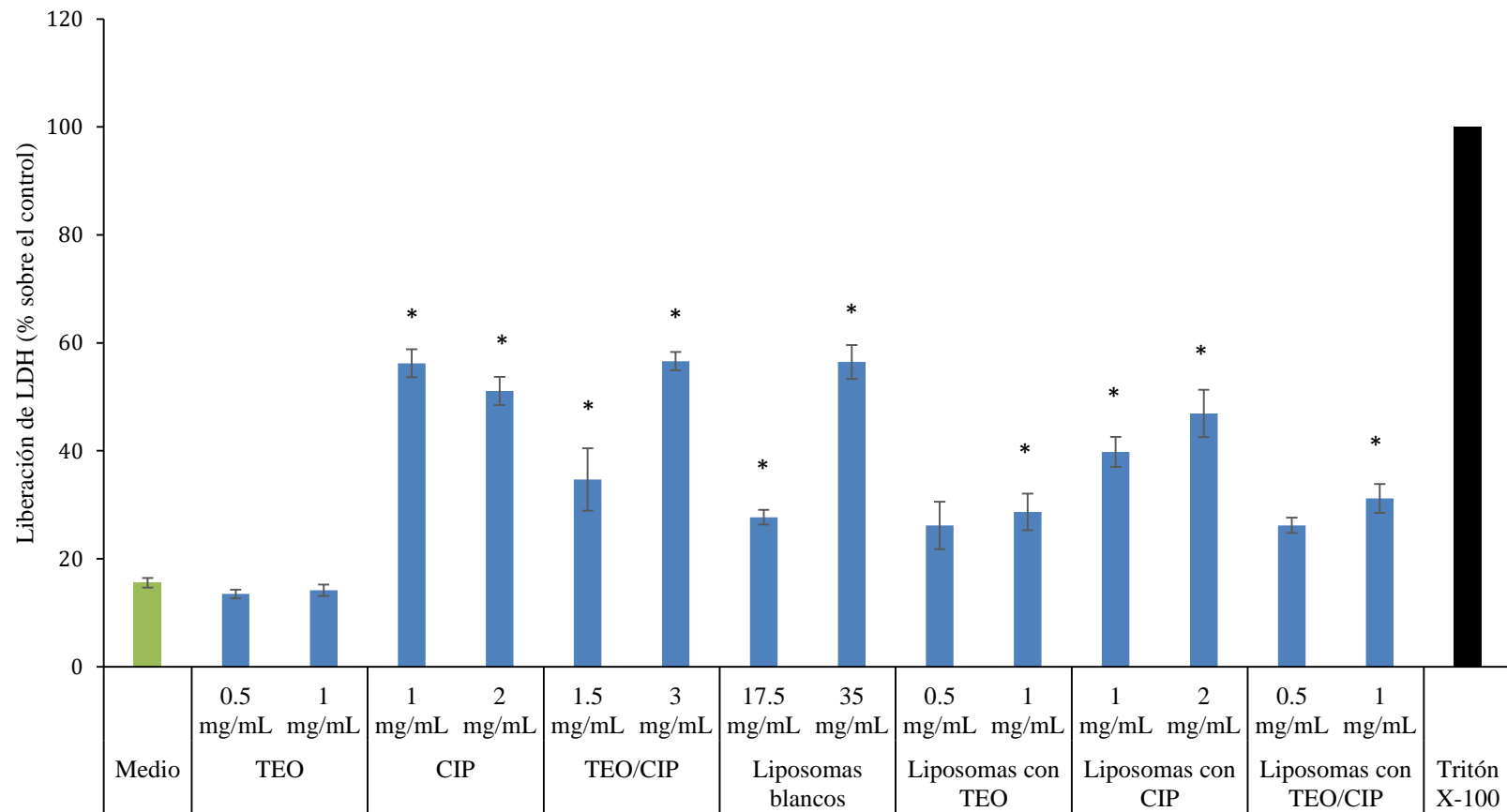
Como test complementario para evaluar la citotoxicidad, se determinó la cantidad de **LDH** liberada de las células tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de los materiales. La Figura 32 recoge los resultados obtenidos, mostrando que todas las muestras ensayadas inducen una liberación significativamente menor de LDH en comparación con el control positivo (Tritón X-100). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para casi todas las muestras ensayadas en comparación con el control negativo, lo que significa que la exposición a las muestras impactó en la integridad de la membrana celular. De hecho, a excepción de TEO libre, TEO encapsulada y los liposomas de CIP/TEO, las dos últimas a la concentración de 0.5 mg/mL, el resto de muestras indujeron una liberación de LDH estadísticamente significativa respecto al control negativo.

Los resultados de los fármacos libres indican que TEO muestra un perfil más seguro, aunque esta tendencia no es coincidente con los resultados previos de MTT. Además, la combinación de los dos fármacos también resultó en una respuesta ligeramente mejor en comparación con CIP libre, con menor liberación de LDH a la concentración de 1.5 mg/mL ( $p < 0.05$ ).

Por su parte, las formulaciones liposomales a 1 mg/mL generaron respuestas similares entre los grupos analizados. Además, la liberación de LDH aumentó como consecuencia de la exposición a liposomas blancos, de una forma concentración-dependiente. Curiosamente, se observó que, tanto CIP como la combinación de este con TEO, generaron un aumento de la liberación de LDH. La encapsulación de ambos fármacos en liposomas mejoró la viabilidad celular, ya que se obtuvieron valores más bajos de LDH

( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , en comparación con la solución de CIP y la CIP/TEO respectivamente). Sin embargo, para TEO, que en este ensayo indujo resultados similares al control cuando se analizó como fármaco libre, la encapsulación resultó en un aumento de la toxicidad ( $p < 0.05$ ), posiblemente como consecuencia de los propios lípidos. De hecho, la respuesta celular a los materiales expuestos es claramente dependiente de su composición.

Los resultados obtenidos en este ensayo refuerzan los obtenidos en el ensayo MTT, indicando un considerable nivel de toxicidad proveniente de los propios lípidos, al menos a las concentraciones empleadas. Una aproximación terapéutica sería la optimización de la formulación para asegurar una mayor carga y permitiendo la liberación de las dosis empleadas usando menor cantidad de lípidos.



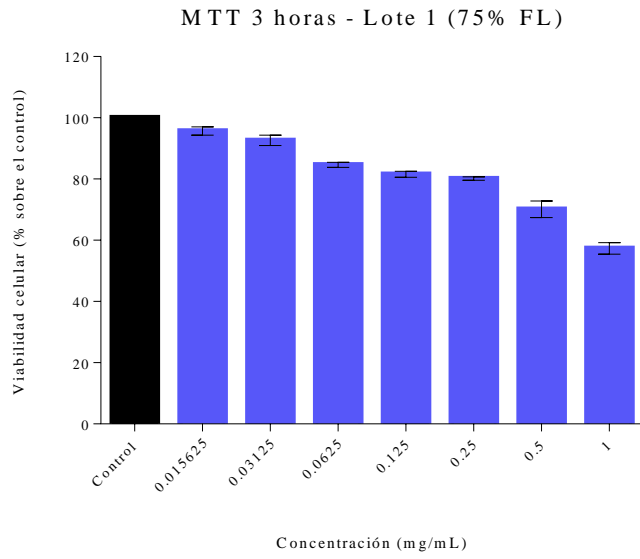
**Figura 32.** Ensayo MTT de las formulaciones con el 100% de fosfolípidos.

### **3.3.2. Evaluación de la viabilidad celular de las formulaciones con el 75% y 50% de fosfolípidos**

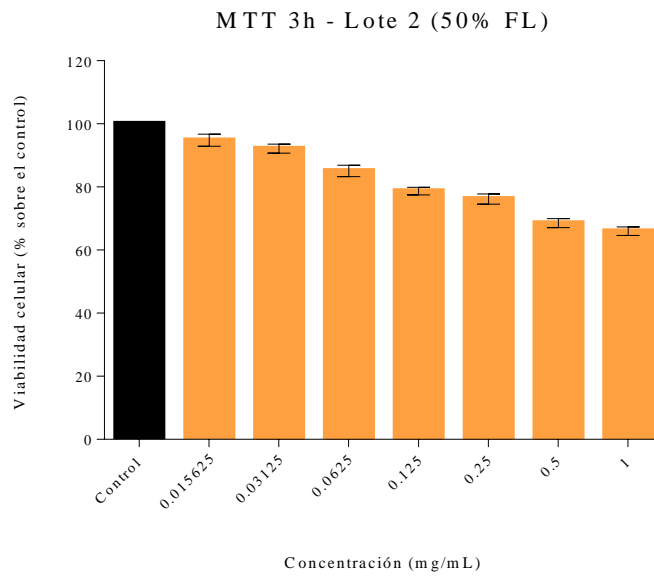
Como quedó planteado en el apartado anterior, se redujeron las concentraciones de fosfolípidos empleadas, al 75 y 50% con el objetivo de comprobar si la viabilidad celular mejoraba. En este trabajo, las células A549 fueron cultivadas y expuestas a diferentes formulaciones de liposomas con el 75 y el 50% de la formulación inicial de fosfolípidos, conteniendo 1 mg/mL (TEO) y 2 mg/mL (CIP), ya que como se ha expuesto anteriormente, fueron las concentraciones que alcanzaron la mayor eficacia de encapsulación y ésta ha de ser la mayor posible para reducir la toxicidad celular. Además, ambas formulaciones se probaron durante un período de tiempo corto (3 horas) y durante un tiempo más largo (24 horas). Igualmente, se consideró el 70% como el límite de viabilidad celular.

Los resultados obtenidos mostraron que, tras una exposición de 3 horas, la viabilidad celular fue inferior al 70% para 1 mg/mL de ambas formulaciones, alcanzando valores en torno al 60%; concretamente, la formulación con un 50% de carga en fosfolípidos mostró una viabilidad en torno al 66% y en la del 75% fue de un 58% aproximadamente (Figuras 33 y 34). Teniendo en cuenta que la formulación inicial (100%) demostró una toxicidad de aproximadamente un 60%, la reducción de la cantidad de fosfolípidos resultó en una mayor viabilidad celular. Esto queda contrastado con los resultados de estudios llevados a cabo recientemente, como el de Rezaei et al. (2020) en el que se demostró que un aumento de la concentración lipídica llevó a una reducción de la viabilidad celular.





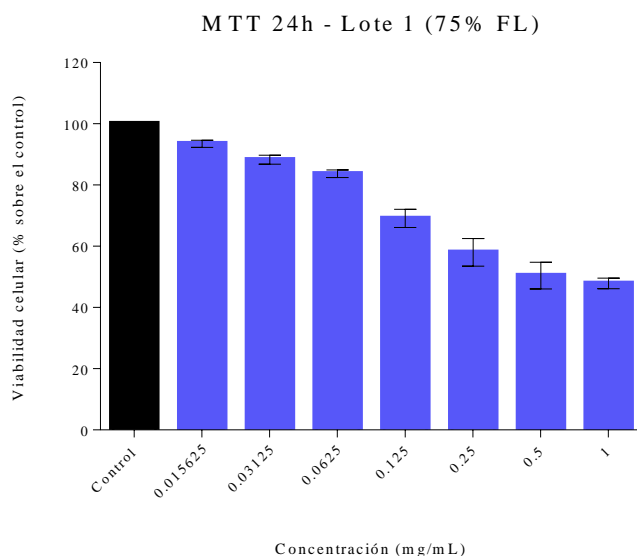
**Figura 33.** Viabilidad celular del lote 1 (75% de FL) en estudio para 3 horas.



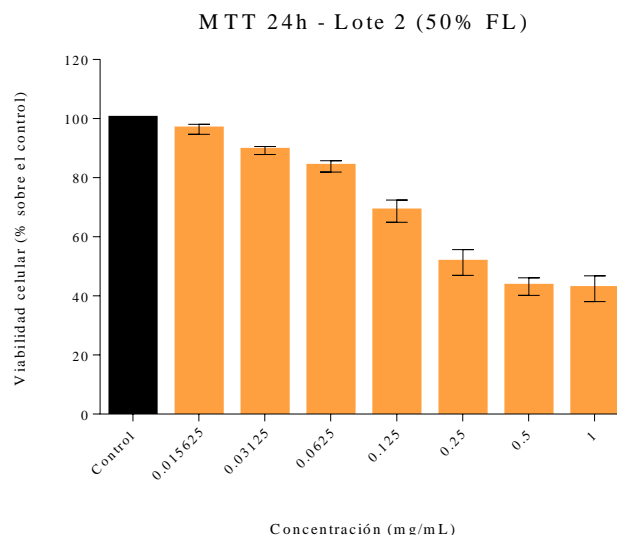
**Figura 34.** Viabilidad celular del lote 2 (50% de FL) en estudio para 3 horas.

En cuanto a la exposición prolongada de hasta 24 horas (Figuras 35 y 36), se indujo mayor variabilidad en la viabilidad celular, de forma que en algunos casos aumentaba la toxicidad identificada en el ensayo de 3 horas. Tras una exposición de 24 horas, la viabilidad celular fue menor del 50% para 1 mg/mL, aunque los resultados mejoraron con respecto a la formulación con el 100% de fosfolípidos, donde la viabilidad celular fue inferior al 30%. Por tanto, una vez más queda demostrado que al reducir la ratio lípido/fármaco, la viabilidad celular mejoró sustancialmente. Esto corrobora lo que se ha demostrado anteriormente en el estudio de 3 horas.

Además, hay que tener en cuenta también que el lípido mayoritario utilizado es la fosfatidilcolina, y que para su disolución se emplea normalmente cloroformo (como en este caso). Dicho disolvente orgánico es conocido por su elevada toxicidad hasta para pequeños volúmenes (Bernardo et al., 2019); por tanto, cuanto menos lípidos haya que disolver, menos cloroformo se emplea y por tanto, menor probabilidad de toxicidad.

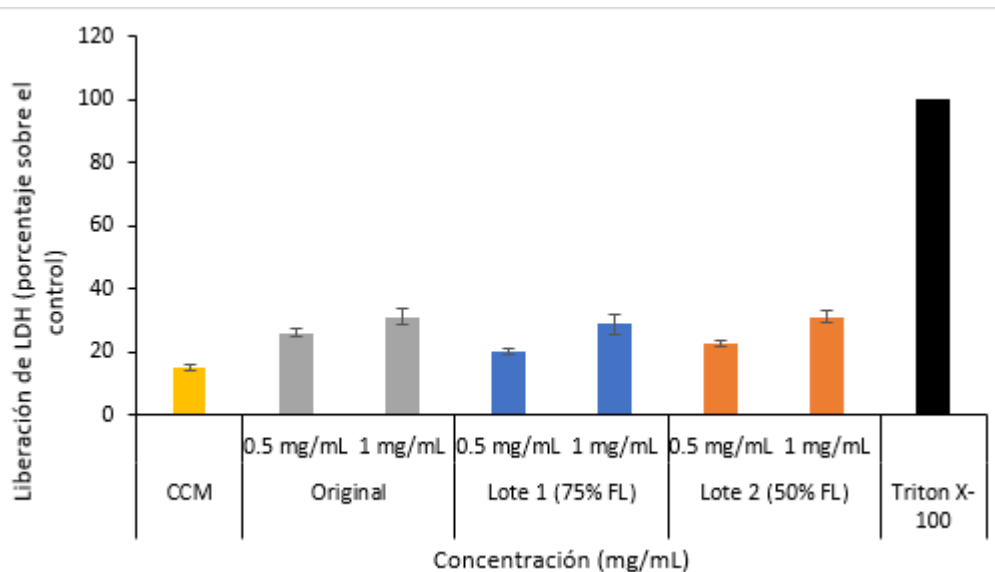


**Figura 35.** Viabilidad celular del lote 1 (75% de FL) en estudio para 24 horas.



**Figura 36.** Viabilidad celular del lote 2 (50% de FL) en estudio para 24 horas.

Como test complementario para evaluar la citotoxicidad, se determinó la cantidad de LDH liberada de las células tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de los materiales. La Figura 37 describe los resultados obtenidos, mostrando que todas las muestras ensayadas inducen una liberación significativamente menor de LDH en comparación con el control positivo (Tritón X-100). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para casi todas las muestras estudiadas en comparación con el control negativo, lo cual significa que la exposición a las muestras impactó en la integridad de la membrana celular. Los resultados fueron similares para los tres lotes, independientemente de la concentración de fosfolípidos de las formulaciones. En este caso, los resultados obtenidos no permiten reforzar los obtenidos en el ensayo MTT. Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales, empleando diferentes concentraciones de lípidos para refutar lo obtenido en el test MTT.



**Figura 37.** Ensayo MTT de las formulaciones con el 75% y el 50% de fosfolípidos.

#### 4. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados sugieren que el método del gradiente transmembrana puede ser útil para la preparación de vesículas liposomales para cargar bases y ácidos débiles anfipáticos en liposomas preformados, pudiéndose describir las condiciones óptimas para el gradiente con acetato amónico.
- Se ha demostrado que ciertas condiciones del proceso, como la temperatura, el pH, la naturaleza del fármaco, la concentración intraliposomal de sal y la naturaleza del solvente pueden modificar la eficacia de encapsulación y las características de las vesículas.
- La utilización de activadores del borde como desoxicolato sódico permite mejorar las características físico-químicas de las vesículas, así como incrementar la eficacia de encapsulación.
- Este método ha demostrado ser más eficaz para la encapsulación de este tipo de fármacos que el método tradicional de elaboración TLE.

- El método transmembrana parece ofrecer resultados prometedores en términos de eficacia de encapsulación y estabilidad de las formulaciones siendo idóneo para la encapsulación conjunta de bases y ácidos débiles anfipáticos.
- Los estudios de citotoxicidad sugieren que la encapsulación de los fármacos en los liposomas reduce la toxicidad de los fármacos libres. Por otra parte, a las concentraciones a las que se prepararon las formulaciones liposomales (1 y 2 mg/mL) se produjo toxicidad, contribuyendo a ella la concentración de fosfolípidos empleada. De hecho, el incremento de la ratio fármaco:lípidos mantuvo la eficacia de encapsulación similar para ambos fármacos reduciendo la toxicidad de las formulaciones, aumentando la viabilidad celular.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Abra RM, Bankert RB, Chen F, Egilmez NK, Huang K, Saville R, Slater JL, Sugano M, Yokota SJ. 2002. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients. *Journal of Liposome Research* 12(1–2):1–3. <https://doi.org/10.1081/LPR-120004770>.

Abraham SA, Edwards K, Karlsson G, Hudon N, Mayer LD, Bally MB. 2004. An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes. *Journal of Controlled Release* 96(3):449–61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.017>.

Alyane M, Barratt G, Lahouel M. 2016. Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24(2):165–75. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2015.02.014>.

Barenholz Y. 2003. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *Journal of Liposome Research* 13(1):1–8. <https://doi.org/10.1081/LPR-120017482>.

Barnes PJ. 2013. Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188(8):901–6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0388PP>.

Bertolotto JA, Corral GM, Farias de La Torre EM, Roston GB. 2010. Electric dichroism transients of aqueous solutions of DNA. *Journal of Physics Condensed Matter: An Institute of Physics*

*Journal* 22(49):494101. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/49/494101>.

Bi H, Xue J, Jiang H, Gao S, Yang D, Fang Y, Shi K. 2019. Current developments in drug delivery with thermosensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 4:365-379. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.07.006>.

Bouriche S, Cózar-Bernal MJ, Rezgui F, Rabasco Álvarez AM, González-Rodríguez ML. 2019. Optimization of preparation method by w/o/w emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51(9):419–29. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.011>.

Buhecha MD, Lansley AB, Somavarapu S, Pannala AS. 2019. Development and characterization of PLA nanoparticles for pulmonary drug delivery: co-encapsulation of theophylline and budesonide, a hydrophilic and lipophilic drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53:101128. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101128>.

Cern A, Golbraikh A, Sedykh A, Tropsha A, Barenholz Y, Goldblum A. 2012. Quantitative structure - property relationship modeling of remote liposome loading of drugs. *Journal of Controlled Release* 160(2):147–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.029>.

Chamseddin C, Jira T. 2011. Comparison of the chromatographic behavior of levofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin on various HPLC phases. *Pharmazie* 66(4):244–48. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.0314>.

Chou TH, Chen SC, Chu IM. 2003. Effect of composition on the stability of liposomal irinotecan prepared by a pH gradient method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(4):405–8. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80076-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80076-2).

Cios A, Wyska E, Szymura-Oleksiak J, Grodzicki T. 2014. Population pharmacokinetic analysis of ciprofloxacin in the elderly patients with lower respiratory tract infections. *Experimental Gerontology* 57(9):107–13. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.05.013>.

Cipolla D, Blanchard J, Gonda I. 2016. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics* 8(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010006>.

Clerc S, Barenholz Y. 1995. Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to

transmembrane calcium acetate gradients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1240(2):257–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541297>.

Darweesh RS, Sakagami M. 2018. In vitro lung epithelial cell transport and anti-interleukin-8 releasing activity of liposomal ciprofloxacin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 115:68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.018>.

Das K, Jain B, Dube A, Gupta PK. 2005. pH-dependent binding of chlorin-p6 with phosphatidyl choline liposomes. *Chemical Physics Letters* 401(1–3):185–88. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.11.051>.

Eloy JO, Claro de Souza M, Petrilli R, Abriata Barcellos JP, Lee RJ, Maldonado Marchetti J. 2014. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123:345–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>.

Erickson ML, Little JP, Gay JL, McCully KK, Jenkins NT. 2017. Effects of postmeal exercise on postprandial glucose excursions in people with type 2 diabetes treated with add-on hypoglycemic agents. *Diabetes Research and Clinical Practice* 126(4):240–47. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.02.015>.

Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. 2013. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 9(1):1-14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>.

Fan Y, Chen C, Huang Y, Zhang F, Lin G. 2017. Study of the pH-sensitive mechanism of tumor-targeting liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 151(3):19–25. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2016.11.042>.

Fatima MT, Islam Z, Ahmad E, Barreto GE, Ashraf GM. 2018. Ionic gradient liposomes: recent advances in the stable entrapment and prolonged released of local anesthetics and anticancer drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 107(4):34–43. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.138>.

Fenske DB, Wong KF, Maurer E, Maurer N, Leenhouts JM, Boman N, Amankwa L, Cullis PR.

1998. Ionophore-mediated uptake of ciprofloxacin and vincristine into large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane ion gradients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1414(1–2):188–204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804953>.

Fritze A, Hens F, Kimpf A, Schubert R, Peschka-Süss R. 2006. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758:1633–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.028>.

Ghosh S, Qi R, Carter KA, Zhang G, Pfeifer BA, Lovell JF. 2019. Loading and releasing ciprofloxacin in photoactivatable liposomes. *Biochemical Engineering Journal* 141(1):43–48. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2018.10.008>.

Gobrecht A, Bendoula R, Roger JM, Bellon-Maurel V. 2015. Combining linear polarization spectroscopy and the representative layer theory to measure the beer-lambert law absorbance of highly scattering materials. *Analytica Chimica Acta* 853(1):486–94. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.014>.

Gregoriadis G. 2016. Liposomes in drug delivery: how it all happened. *Pharmaceutics* 8(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020019>.

Haddad T , Kümmerer K. 2014. Characterization of photo-transformation products of the antibiotic drug ciprofloxacin with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with accurate mass determination using an LTQ-Orbitrap. *Chemosphere* 115(1):40–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.013>.

Halwani M, Yebio B, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Omri A. 2008. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(6):1291–97. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn422>.

Haoi F, He Y, Sun Y, Zheng B, Liu Y, Wang X, Zhang Y, Lee RJ, Teng L, Xie J. 2016. Improvement of oral availability of ginseng fruit saponins by a proliposome delivery system containing sodium deoxycholate. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(1):S113–25. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.024>.

Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. 1993. Transmembrane ammonium sulfate gradients in



liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *BBA - Biomembranes* 1151(2):201–15. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90105-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90105-9).

Hildebrand A, Beyer K, Neubert R, Garidel P, Blume A. 2003. Temperature dependence of the interaction of cholate and deoxycholate with fluid model membranes and their solubilization into mixed micelles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32(4):335–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.08.001>.

Hildebrand A, Neubert R, Garidel P, Blume A. 2002. Bile salt induced solubilization of synthetic phosphatidylcholine vesicles studied by isothermal titration calorimetry. *Langmuir* 18(7):2836–47. <https://doi.org/10.1021/la011421c>.

Huang Z, Li X, Zhang T, Song Y, She Z, Li J, Deng Y. 2014. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(4):176–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>.

Karant H, Murthy RSR. 2007. pH-sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(4):469–83. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.4.0001>.

Kim S, Jacobs RE, White SH. 1985. Preparation of multilamellar vesicles of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 812(3):793–801. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90274-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90274-3).

Knorr RL, Steinkühler J, Dimova R. 2018. Micron-sized domains in quasi single-component giant vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860(10):1957–64. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2018.06.015>.

Korang-Yeboah M, Rahman Z, Shah D, Mohammad A, Wu S, Siddiqui A, Khan MA. 2016. Impact of formulation and process variables on solid-state stability of theophylline in controlled release formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 499(1–2):20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.046>.

Kuroiwa T, Kiuchi H, Noda K, Kobayashi I, Nakajima M, Uemura K, Sato S, Mukataka S, Ichikawa S. 2009. Controlled preparation of giant vesicles from uniform water droplets obtained by microchannel emulsification with bilayer-forming lipids as emulsifiers. *Microfluidics and*

*Nanofluidics* 6(6):811–21. <https://doi.org/10.1007/s10404-008-0354-9>.

Larkin A, Chang M, Whitworth G, Imperiali B. 2015. Origins of cystic fibrosis lung disease. *New England Journal of Medicine* 9(6):367–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1300109>.Origins.

Li W, Wang Q, Yang Z, Wang W, Cao Y, Hu N, Luo H, Liao Y, Yang J. 2016. Impacts of electrical parameters on the electroformation of giant vesicles on ITO glass chips. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140(4):560–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.020>.

Lv M, Du M, Li X, Yue Y, Chen X. 2019. Mechanism of microbiologically influenced corrosion of x65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria. *Journal of Materials Research and Technology* 8(5):4066-4078. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.07.016>.

Marasini N, Ghaffar KA, Skwarczynski M, Toth I. 2017. Liposomes as a vaccine delivery system. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development* 1:221–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00012-9>.

Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, Esposito S, Carafa M. 2014. Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science* 205:187-206. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.018>.

Moghimi SM, Parhamifar L, Ahmadvand D, Wibroe PP, Andresen TL, Farhangrazi ZS, Hunter AC. 2012. Particulate systems for targeting of macrophages: basic and therapeutic concepts. *Journal of Innate Immunity* 4(5-6):509-28. <https://doi.org/10.1159/000339153>.

Mohammed AR, Weston N, Coombes AGA, Fitzgerald M, Perrie Y. 2004. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics* 285(1–2):23–34. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.07.010>.

Mugabe C, Azghani AO, Omri A. 2005. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(2):269–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh518>.

- Nichols JW, Deamer DW. 1976. Catecholamine uptake and concentration by liposomes maintaining pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455(1):269–71. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90169-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90169-3).
- Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, Zhang H. 2013. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Accounts of Chemical Research* 46(3):607–21. <https://doi.org/10.1021/ar300022h>.
- Oliveira EJ, Claro De Souza M, Petrilli R, Palma J, Barcellos A, Lee RJ, Maldonado- Marchetti J. 2014. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123:345–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>.
- Pando DG, Gutiérrez JC, Pazos C. 2013. Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol. *Journal of Food Engineering* 117(2):227–34. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.02.020>.
- Principi N, Esposito S. 2015. Appropriate use of fluoroquinolones in children. *International Journal of Antimicrobial Agents* 45(4):341-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.01.004>.
- Qiu L, Jing N, Jin J. 2008. Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method. *International Journal of Pharmaceutics* 361(1–2):56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.010>.
- Rezaei N, Mehrnejad F, Vaezi Z, Sedghi M, Asghari SM, Naderi-Manesh H. 2020. Encapsulation of an endostatin peptide in liposomes: stability, release, and cytotoxicity study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 185:110552. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110552>.
- Rodrigues S, Cordeiro C, Seijo B, Remuñán-López C, Grenha A. 2015. Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: stability and toxicological evaluation. *Carbohydrate Polymers* 123:369–80. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.048>.
- Rodriguez N, Pincet F, Cribier S. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42(2):125–30. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2005.01.010>.

- Ron-Doitch S, Sawodny B, Kühbacher A, David MMN, Samanta A, Phopase J, Burger-Kentischer A, Griffith M, Golomb G, Rupp S. 2016. Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV. *Journal of Controlled Release* 229:163–71. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.025>.
- Roy S, Pal K, Anis A, Pramanik K, Prabhakar B. 2009. Polymers in mucoadhesive drug-delivery systems: a brief note review. *Designed Monomers and Polymers* 12(6):483–95. <https://doi.org/10.1163/138577209X12478283327236>.
- Russo SC, De Stefano L, Palazzolo S, Salis B, Granchi C, Minutolo F, Tuccinard T. 2018. Liposomal delivery of a Pin1 inhibitor complexed with cyclodextrins as new therapy for high-grade serous ovarian cancer. *Journal of Controlled Release* 281(7):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.055>.
- Sadegh N, Deckers R, Ozbakir B, Akthar S, Kok RJ, Lammers T, Storm G. 2018. Influence of cholesterol inclusion on the doxorubicin release characteristics of lysolipid-based thermosensitive liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 548(2):778–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.002>.
- Scherliess R. 2011. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* 411(1–2):98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.053>.
- Shohda K, Takahashi K, Suyama A. 2015. A method of gentle hydration to prepare oil-free giant unilamellar vesicles that can confine enzymatic reactions. *Biochemistry and Biophysics Reports* 3(9):76–82. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2015.07.005>.
- Smet JD, Boussery K, Colpaert K, De Sutter P, De Paepe P, Decruyenaere J, Van Bocxlaer J. 2009. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: a bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877(10):961–67. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.039>.
- Sørli J. 2015. An in vitro method for predicting inhalation toxicity of impregnation spray

products. *ALTEX* 32(2):101-11. <https://doi.org/10.14573/altex.1408191>.

Swaminathan J, Ehrhardt C. 2012. Liposomal delivery of proteins and peptides. *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(12):1489-503. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.735658>.

Taladrid D, Marín D, Alemán A, Álvarez-Acero I, Montero P, Gómez-Guillén MC. 2017. Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International* 100(10):541–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.07.052>.

Villasmil-Sánchez S, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. 2013. Thermal and <sup>31</sup>P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative <sup>31</sup>P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 105(5):14–23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.019>.

Viridén A, Abrahmsén-Alami S, Wittgren B, Larsson A. 2011. Release of theophylline and carbamazepine from matrix tablets: consequences of HPMC chemical heterogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78:470–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.003>.

Ye T, Sun S, Sugianto TD, Tang P, Parumasivam T, Chang YK, Astudillo A, Wang S, Chan HK. 2018. Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Pharmaceutics* 552(1–2):130–38. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.09.061>.

Zgadżaj A, Giebułtowiec J, Gubernator J, Podbielska M, Sommer S, Zaremba-Czogalla M, Nałęcz-Jawecki G. 2019. Multi- and unilamellar liposomal encapsulation of ciprofloxacin as ways to modify its phototoxicity and photodegradation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 129:181–89. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.01.006>.

Zhang T, Luo J, Peng Q, Dong J, Wang Y, Gong T, Zhang Z. 2019. Injectable and biodegradable phospholipid-based phase separation gel for sustained delivery of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 176:194–201. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.01.003>.

Zhou QT, Leung SSY, Tang P, Parumasivam T, Loh ZH, Chan HK. 2014. Inhaled formulations

and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections. *Advanced Drug Delivery Reviews* 85:83-99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.022>.

Zucker D, Marcus D, Barenholz Y, Goldblum A. 2009. Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 139(1):73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.036>.

Zuo YY, Ruud AW, Veldhuizen A, Neumann W, O. Petersen N, Possmayer F. 2008. Current perspectives in pulmonary surfactant — inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(10):1947–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.021>.



# CAPÍTULO II

La vía pulmonar constituye una vía interesante para la administración de fármacos, debido a su elevada área superficial ( $100 \text{ m}^2$ ), su extensa vasculatura y su absorción favorecida. Sin embargo, el aclaramiento por parte de los macrófagos hace que a veces no todas las formulaciones puedan administrarse por esta vía. Los sistemas nanoparticulares, en concreto los liposomas, son candidatos ideales para la administración por esta ruta debido a su similitud con el surfactante pulmonar. Para simular el comportamiento de las nanopartículas en las vías aéreas con fines de investigación, se utilizan dispositivos multifase en cascada. En nuestro estudio se ha utilizado el *Twin Impinger*. Para validar su uso, se emplearon soluciones de salbutamol y una formulación comercial de éste, para ser nebulizadas, analizando sus propiedades físico-químicas y su deposición en los compartimentos del dispositivo. Seguidamente, se nebulizaron soluciones de teofilina y ciprofloxacino, tanto libres como encapsulados en las formulaciones de liposomas previamente estudiadas en el capítulo 1, comprobando que se repetía el comportamiento de las soluciones de salbutamol.



## ÍNDICE DEL CAPÍTULO II

1. INTRODUCCIÓN.....	131
1.1. Administración de medicamentos por vía pulmonar.....	131
1.2. Sistemas de administración de medicamentos vía inhalatoria.....	135
1.2.1. Tipos de inhaladores.....	136
1.2.2. Deposición de partículas y mecanismos de aclaramiento de las vías aéreas.....	143
1.3. Uso de nanopartículas por vía inhalatoria.....	148
1.3.1. Sistemas nanoparticulares de administración pulmonar.....	149
1.4. Hipótesis y objetivos.....	154
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	155
2.1. Equipos e instrumentación.....	155
2.2. Productos y reactivos.....	156
2.3. Montaje del dispositivo <i>Twin Impinger</i> .....	156
2.4. Estudios de pulverización.....	161
2.4.1. Formulaciones a pulverizar.....	161
2.4.2. Variables de respuesta ensayadas.....	162
2.5. Validación del proceso con el <i>Twin Impinger</i> .....	165
2.6. Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido.....	166
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	167
3.1. Formulaciones de salbutamol.....	167
3.1.1. pH y conductividad.....	167
3.1.2. Análisis dimensional y carga superficial.....	175
3.1.3. Contenido de salbutamol en las cámaras de deposición.....	179
3.2. Formulaciones de teofilina y ciprofloxacino.....	183
3.2.1. pH y conductividad.....	183
3.2.2. Contenido de ciprofloxacino y teofilina en las cámaras de deposición.....	187
4. CONCLUSIONES.....	192
5. BIBLIOGRAFÍA.....	193

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las vías aéreas. ....	131
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo del intercambio gaseoso en el alveolo. ....	133
<b>Figura 3.</b> Reducción de la tensión superficial mientras se comprime el alveolo. ....	134
<b>Figura 4.</b> Partes de un inhalador presurizado .....	137
<b>Figura 5.</b> Inhalador de polvo seco de cápsulas.....	140
<b>Figura 6.</b> Nebulizador tipo “jet” .....	142
<b>Figura 7.</b> Nebulizador ultrasónico.....	143
<b>Figura 8.</b> Mecanismos de deposición de partículas y zona de las vías aéreas donde se depositan según ese mecanismo .....	144
<b>Figura 9.</b> Inhalación y actividad de los macrófagos.....	145
<b>Figura 10.</b> Esquema del canal CFTR en una persona sana (izquierda) y defecto de la secreción de iones cloruro con aumento de reabsorción de sodio y de agua en un paciente con fibrosis quística (derecha). ....	147
<b>Figura 11.</b> Distribución de los liposomas en los diferentes órganos.....	149
<b>Figura 12.</b> Esquema del dispositivo <i>Twin Impinger</i> .....	157
<b>Figura 13.</b> Estructura y componentes del <i>Twin Impinger</i> con el que se realizaron los ensayos. ....	159
<b>Figura 14.</b> Fases de los procesos llevados a cabo en nuestro estudio. ....	160
<b>Figura 15.</b> Valores de pH de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones impares). ....	168
<b>Figura 16.</b> Valores de pH de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones pares).....	168
<b>Figura 17.</b> Valores de conductividad de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones impares). ....	169
<b>Figura 18.</b> Valores de conductividad de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones pares).....	169
<b>Figura 19.</b> Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz®.....	171
<b>Figura 20.</b> Fotografía del dispositivo <i>Twin Impinger</i> , donde se aprecia cómo se va colmatando la pieza que simula la vía orofaríngea a medida que se incrementa el número de pulverizaciones (imagen de la derecha). ....	172
<b>Figura 21.</b> Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz® ampliando intervalo del número de pulverizaciones. ....	172
<b>Figura 22.</b> Resultados de los valores de conductividad en el matraz superior. ....	173
<b>Figura 23.</b> Resultados de los valores de conductividad en el matraz inferior. ....	173
<b>Figura 24.</b> Resultados de los valores de pH en el matraz superior.....	174
<b>Figura 25.</b> Resultados de los valores de pH en el matraz inferior.....	174
<b>Figura 26.</b> Microfotografías obtenidas por SEM de Salbutamol Sandoz® presurizado (A) y Salbutamol nebulizado (B).....	175
<b>Figura 27.</b> Influencia del número de pulsaciones o volumen inhalado de formulaciones de salbutamol sobre la recuperación (%) del fármaco en el matraz superior.....	182
<b>Figura 28.</b> Influencia del número de pulsaciones o volumen inhalado de formulaciones de salbutamol sobre la recuperación (%) del fármaco en el matraz inferior. ....	182
<b>Figura 29.</b> Valores de pH según el volumen nebulizado para la solución de CIP (ciprofloxacino). ....	184
<b>Figura 30.</b> Valores de conductividad según el volumen nebulizado para la solución de CIP (ciprofloxacino).....	185
<b>Figura 31.</b> Valores de pH según el volumen nebulizado para la solución de TEO (teofilina). ....	185
<b>Figura 32.</b> Valores de conductividad según el volumen nebulizado para la solución de TEO (teofilina).....	186

## ÍNDICE DE TABLAS

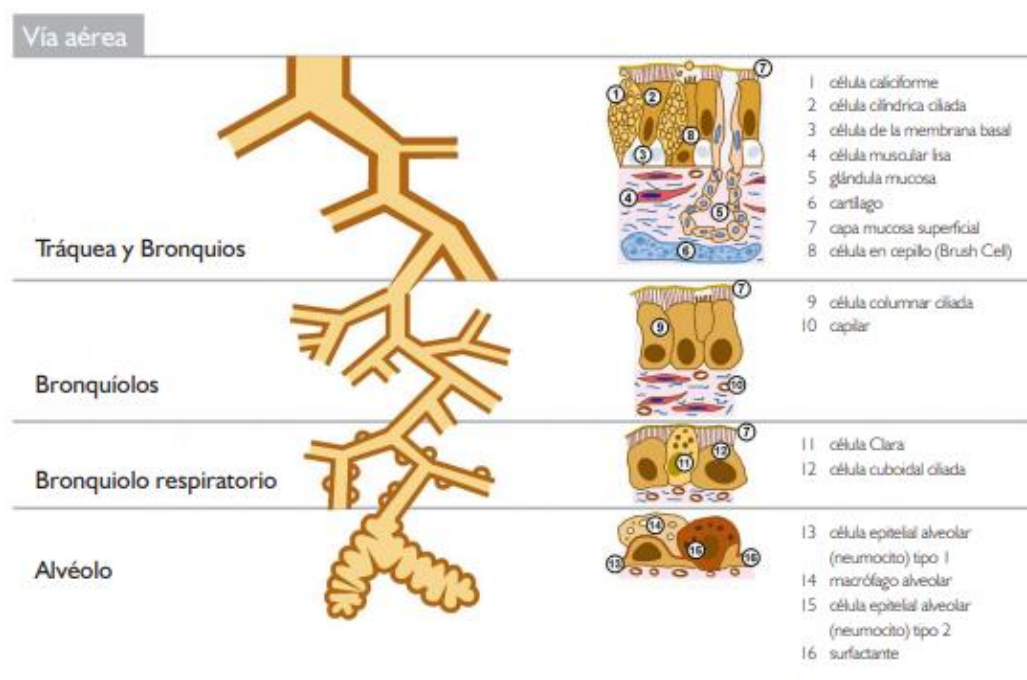
<b>Tabla 1.</b> Recopilación de los principales sistemas nanoparticulares de administración pulmonar.....	150
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones (mg/mL) los fármacos incluidos en diferentes formulaciones ensayadas para ser nebulizadas con el volumen equivalente a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 80 y 100 pulverizaciones .....	162
<b>Tabla 3.</b> Rangos de linealidad recomendados por tipo de ensayo .....	166
<b>Tabla 4.</b> Equivalencia en el número de pulverizaciones efectuadas con Salbutamol Sandoz <sup>®</sup> con el volumen pulverizado (mL).....	170
<b>Tabla 5.</b> Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con Salbutamol Sandoz <sup>®</sup> .....	176
<b>Tabla 6.</b> Valores medios y medidas de error de los parámetros evaluados en Salbutamol Sandoz <sup>®</sup> .....	177
<b>Tabla 7.</b> Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con salbutamol nebulizado .....	178
<b>Tabla 8.</b> Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones del salbutamol presurizado.....	179
<b>Tabla 9.</b> Salbutamol (mg) comercial recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones en el aerosol presurizado.....	180
<b>Tabla 10.</b> Salbutamol (mg) nebulizado recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones con el nebulizador.....	180
<b>Tabla 11.</b> Valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de salbutamol a partir de los dos inhaladores empleados. ....	181
<b>Tabla 12.</b> Datos de pH y conductividad en las cámaras del <i>Twin Impinger</i> tras inhalar 5 mL de soluciones de teofilina (TEO) y ciprofloxacino (CIP) .....	183
<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de recuperación de CIP y TEO en las cámaras de deposición en función del volumen administrado. ....	187
<b>Tabla 14.</b> Tamaños, IP y potencial zeta de ambos fármacos antes y después de extruir. ....	188
<b>Tabla 15.</b> Tamaños, IP y potencial zeta de ambos fármacos por separado incluidos en liposomas, y sometidos a nebulización dentro de las cámaras del <i>Twin Impinger</i> .....	188
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de fármaco recuperado en cada una de las cámaras de nebulización, junto con la eficacia de nebulización final para cada fármaco. ....	189
<b>Tabla 17.</b> Valores de tamaño vesicular, IP y potencial zeta de los lotes analizados con diferentes concentraciones de fosfolípidos.....	190
<b>Tabla 18.</b> Tamaños, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta de ambos fármacos en la misma formulación de liposomas, y sometidos a nebulización dentro de las cámaras del <i>Twin Impinger</i> .....	191
<b>Tabla 19.</b> Eficacias de encapsulación y nebulización de los tres lotes con diferentes concentraciones de fosfolípidos. ....	191
<b>Tabla 20.</b> Porcentaje recuperado de los dos fármacos en los diferentes compartimentos del <i>Twin Impinger</i> .....	192

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Administración de medicamentos por vía pulmonar

### 1.1.1. Aspectos anatomofisiológicos

La vía pulmonar posee una primera zona de entrada que comprende nariz, boca, faringe y laringe por donde, al inspirar el aire, se introduce el medicamento hasta el árbol respiratorio inferior, dividiéndose éste fundamentalmente en zona de conducción y zona de intercambio gaseoso, como se recoge en la Figura 1 (Wilton et al., 2015).



**Figura 1.** Estructura de las vías aéreas (adaptada de Iñiguez y Sánchez, 2008).

La zona de conducción posee una región traqueobronquial, que incluye tráquea, bronquios y bronquiolos terminales. Los componentes de la porción conductora presentan un esqueleto óseo y/o cartilaginoso que permite mantener su luz permeable al aire, el cual está constituido a su vez por un epitelio de revestimiento. Dicho epitelio secreta mucus para mantener su hidratación, el cual tiene efecto protector al captar partículas inhaladas no deseadas, y no participa en el intercambio gaseoso. No obstante, cabe destacar que puede darse cierta absorción en los bronquiolos terminales, como es el caso de salbutamol (Sologuren, 2009).

En cuanto a la zona de transición o zona de intercambio gaseoso, ésta posee un área de contacto de unos 100-140 m<sup>2</sup> aproximadamente y comprende los alvéolos pulmonares,

los cuales se encuentran recubiertos por una fina capa de surfactante con propiedades tensioactivas, con la principal finalidad de prevenir el colapso de la pared alveolar. Esta zona está compuesta tanto por una amplia capa de células ciliadas, cuya función es el aclaramiento, como de células no ciliadas, que segregan moco. Este moco resulta ser la principal fuente de surfactante pulmonar que recubre los neumocitos tipo I y tipo II, aunque también cuenta con inhibidores de la proteasa, células lisas y mastocitos (Deng et al., 2018).

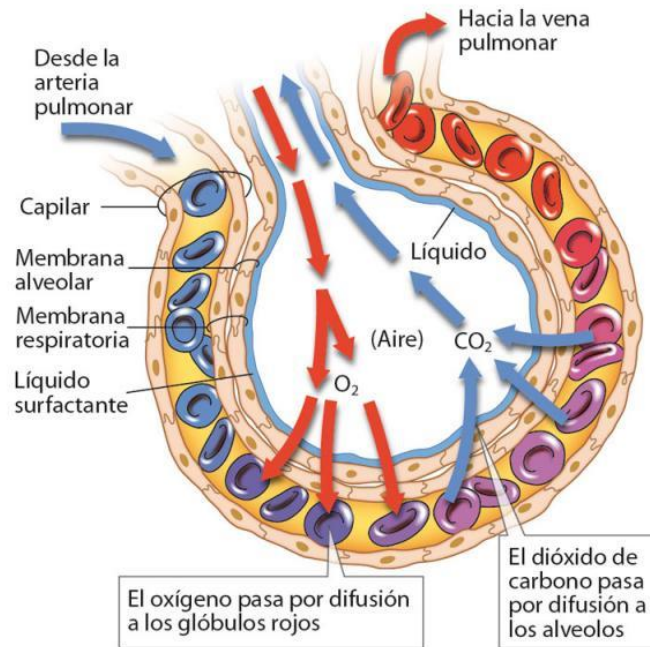
La vía pulmonar supone una alternativa no invasiva a la inyección subcutánea y a la inyección intravenosa, como vía de administración de ciertos fármacos. Los pulmones poseen una extensa superficie de deposición de partículas y gotículas, así como una amplia vascularización para la liberación sistémica de moléculas activas. Además, la liberación a nivel pulmonar a través de la inhalación previene la degradación del principio activo en el tracto gastrointestinal y evita el metabolismo del primer paso hepático. Sin embargo, a pesar de estas ventajas tan atractivas, los sistemas de inhalación para administrar activos no se han empleado mucho (Chan et al., 2014). La posible toxicidad de los fármacos y su degradación por parte de los macrófagos pulmonares, el riesgo de daño pulmonar y la adherencia al tratamiento que conlleva el uso adecuado de los dispositivos de inhalación, limitan el entusiasmo por esta vía para utilización sistémica de fármacos. Por otra parte, el uso de fármacos por vía pulmonar para tratar infecciones pulmonares, en la mayoría de los casos ha demostrado baja eficiencia y efectos adversos potenciales en otros órganos (Haidl et al., 2016).

### **1.1.2. El surfactante pulmonar**

El sistema respiratorio es responsable de la ventilación, la cual se encuentra asegurada por el proceso cíclico de inspiración-exhalación. Asimismo, este aparato también es responsable del intercambio gaseoso de oxígeno y dióxido de carbono entre el medio externo y el alveolo.

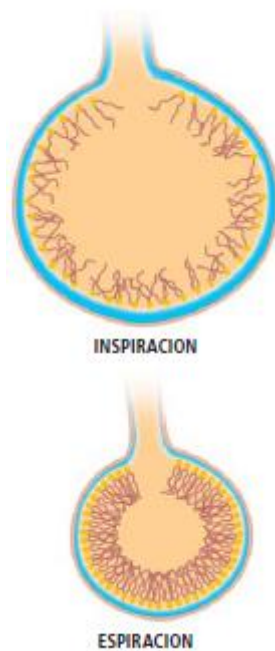
El intercambio respiratorio tiene lugar a través de una barrera física relativamente compleja, que consiste en una fina capa acuosa que rodea al alveolo, seguida de las células alveolares epiteliales, la barrera intersticial, las células endoteliales que forman los capilares sanguíneos, el plasma sanguíneo y finalmente la membrana eritrocitaria (Figura 2). Debido al revestimiento líquido del alveolo, que es consecuencia del metabolismo celular, los pulmones deben cooperar con la tensión superficial de la interfaz entre el fluido y el aire. Para disminuir dicha tensión superficial, los alveolos tipo II secretan

surfactante pulmonar, compuesto que se encarga de minimizar las fuerzas mecánicas que llevan a los pulmones a colapsar, sobre todo al final de la espiración (Guagliardo et al., 2018).



**Figura 2.** Esquema representativo del intercambio gaseoso en el alveolo. Figura obtenida de <https://www.youbioit.com/es/article/23504/intercambio-gaseoso-en-los-alveolos>.

El surfactante se compone mayoritariamente de moléculas anfipáticas que forman películas estables en la interfaz aire-agua, capaz de reducir notablemente la tensión superficial, desde aproximadamente 70 mN en agua pura a temperatura fisiológica hasta un valor cercano a cero (Figura 3).



**Figura 3.** Reducción de la tensión superficial mientras se comprime el alveolo. Adaptado de Andreassen et al. (2010).

El mecanismo llevado a cabo para ello es el establecimiento de interacciones entre los grupos polares de las moléculas del surfactante con las moléculas de agua interfaciales, reduciendo las fuerzas intermoleculares reticulares cohesivas (Possmayer et al., 2010). Por lo tanto, siguiendo con el ciclo respiratorio, el esfuerzo de respirar se minimiza durante la inspiración, lo que facilita la exposición de un área bastante elevada para el intercambio gaseoso, mientras la superficie alveolar queda protegida frente al colapso que existe durante el proceso de espiración.

A la estabilidad de la membrana alveolar contribuyen equitativamente tanto las características del tejido pulmonar como las propiedades del surfactante, lo que se encuentra relacionado con la prevención de diferentes disfunciones respiratorias y patologías (Andreassen et al., 2010). Cabe mencionar que la deficiencia de éste puede deberse a problemas en el desarrollo pulmonar de ciertos bebés, lo que lleva a causar el síndrome de distrés respiratorio neonatal; así mismo, la inactivación de compuestos activos del surfactante como consecuencia de un daño pulmonar agudo, puede contribuir al síndrome de distrés respiratorio, tanto en adultos como en niños; de forma similar, la inactivación del surfactante puede producir en el bebé, al hacer éste su primera inhalación, el denominado síndrome aspiratorio del meconio (Parra y Pérez-Gil, 2015).

Por otra parte, se sabe que el surfactante no solo estabiliza la membrana alveolar creando una única bicapa de moléculas anfipáticas en la interfaz líquido-aire, sino también estabiliza la red de membranas comprendidas entre la superficie alveolar y las estructuras de superficie que allí se encuentran (Alonso et al., 2005).

La composición del surfactante pulmonar define la estructura de la membrana alveolar, sus propiedades y sus funciones. Este se encuentra compuesto mayoritariamente de lípidos (en torno a un 90% del total del surfactante). De estos lípidos, predominan los fosfolípidos, especialmente las fosfatidilcolinas zwitteriónicas (consisten en el 60-79%) y especies aniónicas como el fosfatidilglicerol y el fosfatidilinositol, que constituyen el 8-15% del total. Otra fracción importante la constituyen ciertos lípidos neutros, mayoritariamente colesterol, en un 8-10%, el cual es crucial para las propiedades del surfactante y cuyo contenido es clave para optimizar la actividad del mismo (Possmayer et al., 2010). En los mamíferos, la especie lipídica más común es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que es un fosfolípido disaturado indispensable para permitir una reducción extrema de la tensión superficial en la interfaz alveolar agua-aire. El resto de fosfatidilcolinas y fosfolípidos ácidos son mayoritariamente insaturados, conteniendo ácidos grasos monoenoicos y dienoicos que están esterificados en la posición n-2 del grupo glicerol. Por otro lado, otra fracción importante del surfactante la componen las proteínas, en torno a un 10% del total, en las que se incluyen SP-A (es la más abundante) y SP-D, ambas implicadas en mecanismos de defensa innata del alveolo (hidrofílica), y SP-B y SP-C (hidrofóbicas), las cuales son cruciales para la función biofísica del surfactante (Possmayer et al., 2010).

## **1.2. Sistemas de administración de medicamentos vía inhalatoria**

Para mejorar la eficacia de los tratamientos de ciertas enfermedades pulmonares y reducir el límite de exposición de ciertos órganos a fármacos potencialmente tóxicos, parece lógico pensar en una liberación directamente a los pulmones mediante inhalación (Lehofer et al., 2014). Esta vía de administración debe proporcionar una liberación específica en las células diana, limitar el tiempo de exposición de las células pulmonares sanas y evitar la salida del fármaco a la circulación sistémica (Reis y Damgé, 2012). A pesar de que existen varios dispositivos de liberación de fármacos en el mercado, que se encuentran probados e implementados en la práctica clínica, algunos grupos terapéuticos



de fármacos para la liberación local a través de la vía pulmonar siguen aún en fase de desarrollo e investigación.

El término liberación local por vía inhalatoria, en la mayoría de los casos se refiere al uso de esta vía para liberar fármacos u otras entidades externas directamente a los pulmones con una acumulación preferente en áreas específicas del pulmón o células, y con una entrada limitada en el torrente circulatorio. La liberación de fármacos a los pulmones mediante inhalación presenta varias ventajas, como una gran biodisponibilidad, rápido inicio de acción debido a su elevada área superficial para la absorción, una administración propia, lo que aumenta la complicidad con el paciente, naturaleza no invasiva, escasa pérdida de fármaco y elevada permeabilidad de los solutos. Este tipo de sistemas de inhalación son especialmente útiles para tratar enfermedades pulmonares. El objetivo que se persigue con ello es el transporte del principio activo al sitio de acción y que realice allí su efecto durante un tiempo determinado. La eficacia dependerá principalmente de la aerodinámica pulmonar, las condiciones respiratorias, el tamaño de partícula y los métodos de inhalación y dispositivos usados (Sagalla y Smaldone, 2014), ya que para ser inhalado, el líquido o sólido pulverizado debe ser suspendido en un medio gaseoso para formar un aerosol (Hasenpusch et al., 2011).

### **1.2.1. Tipos de inhaladores**

Para lograr un acceso adecuado de la formulación a los pulmones, es necesario superar la barrera física y fisiológica, que incluye la enorme bifurcación del aparato respiratorio, así como la respuesta inmunológica innata. Además, para conseguir que las partículas lleguen a estos niveles del sistema respiratorio, estas deben poseer un tamaño comprendido entre 1 y 7  $\mu\text{m}$  (Nanjwade et al., 2011). Los aerosoles monodispersos con una población muy estrecha de tamaños pueden ir específicamente a áreas del pulmón donde son más efectivas. Sin embargo, como las partículas más pequeñas son más fácilmente absorbidas hacia la circulación vía alveolar, estas formulaciones pueden asociarse con una mayor incidencia de efectos adversos (Lötvall, 2001).

Para un uso correcto de los dispositivos, es importante enseñar a los pacientes la técnica de inhalación y entrenar adecuadamente a las personas con enfermedades pulmonares. El rápido inicio de acción y la reducción de los efectos adversos son algunas de las ventajas del uso de la vía pulmonar en lugar de la sistémica. La elección del dispositivo inhalatorio

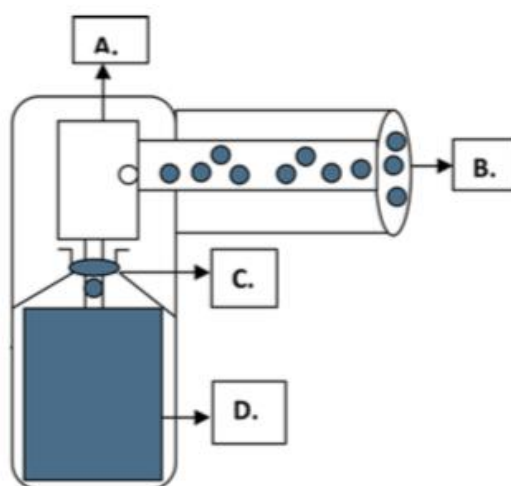
se basa en la mejora de la respuesta clínica junto con la mejora de la colaboración del paciente al usar los diferentes dispositivos.

El proceso de inhalación, a pesar de lo que se piensa, no es nuevo; la conocida como fumigación mediante inhalación se conocía en el siglo primero y la terapia con el aerosol antiséptico fue popular a mediados del siglo XX (Pandey y Khuller, 2005). Los tres sistemas de administración que permiten una inhalación eficaz de fármacos por vía pulmonar son: los sistemas dosificadores presurizados, los nebulizadores y los inhaladores de polvo seco.

#### 1.2.1.1. Sistemas dosificadores presurizados

Los aerosoles presurizados son los sistemas mayormente empleados para administrar los fármacos por vía inhalatoria. Estos ofrecen múltiples ventajas, como la portabilidad, no necesidad de ninguna fuente externa y precisión en la dosificación (Hess y Faarc 2000). Se utilizan para administrar fármacos como broncodilatadores, esteroides, agentes antiinflamatorios y anticolinérgicos.

El dispositivo consiste en un sistema presurizado compuesto de propelentes, agentes saborizantes, surfactantes, conservantes y el fármaco, que comprende aproximadamente un 1% del contenido total. La liberación tiene lugar cuando la mezcla sale del dispositivo inhalatorio a través de una válvula que se inserta en un sistema a presión, como se aprecia en la Figura 4. Los cambios en el diseño del pulsador pueden afectar a las características del pulverizador (García-Contreras et al., 2015).



**Figura 4.** Partes de un inhalador presurizado. A: cámara expansiva donde el “actuador” activa la aerosolización del fármaco. B: pieza de la boca responsable de la liberación a alta velocidad del aerosol. C: válvula dosificadora, responsable de liberar la cantidad de dosis necesaria. D: formulación líquida que contiene el propelente (adaptado de Chandel et al., 2019).

Los pulverizadores son considerados adecuados en términos de beneficio terapéutico en condiciones ambientales y la forma de administrarlos no varía ni la dosis ni la consistencia. A pesar de esto, su efectividad depende de su diseño y de la técnica de inhalación. Su desarrollo actual intenta mejorar el patrón de administración, lo que determinará su eficacia. Además de poseer un adecuado diseño técnico, deben ser fáciles de usar, respetuosos con el medio ambiente, mantener estable su contenido durante un determinado periodo de tiempo y ser seguros.

Están diseñados para pulsar y liberar la dosis adecuada, aunque se podría producir una dosificación inadecuada si hubiera cambios en las propiedades fisicoquímicas, el diámetro de partícula, en el tiempo de evaporación del propelente, etc. Aunque existen varios inhaladores disponibles en el mercado, ninguno de ellos es capaz de alcanzar las necesidades específicas en términos de resultados clínicos, complicidad con el paciente, impacto económico y suficiente adherencia terapéutica para alcanzar los efectos terapéuticos óptimos. Hoy día, la terapia inhalatoria ofrece beneficios clínicos importantes en patologías respiratorias como asma o EPOC, logrados tras la evolución del nebulizador de atropina y adrenalina (Price et al., 2006), y en la administración de péptidos y proteínas para su favorecer su acceso a circulación sistémica (Frijlink y de Boer, 2004). La evidencia clínica demuestra que estos dispositivos funcionan en la mayoría de ocasiones, incluyendo las exacerbaciones y el tratamiento diario (Geller, 2005), aunque debe haber una selección racional del dispositivo según las variaciones interindividuales entre pacientes y los factores ambientales (Ari y Fink, 2011).

Los pulverizadores más recientes pueden clasificarse en dispositivos de coordinación o de respiración activa. Los de respiración activa, como el Easibreathe<sup>®</sup>, están diseñados para superar el problema de la falta de coordinación entre la respiración del paciente y el dispositivo, de forma que funcionan según la respiración del paciente, la cual activa la sensibilidad del pulsador para la activación del dispositivo. Estos se coordinan con la respiración, y están diseñados para sincronizar la tasa de inspiración y la descarga desde el inhalador.

### 1.2.1.2. Inhaladores de polvo seco

Estos dispositivos liberan la formulación a los pulmones en forma de polvo seco, lo cual requiere una coordinación mínima entre la respiración del paciente y la actuación del dispositivo.

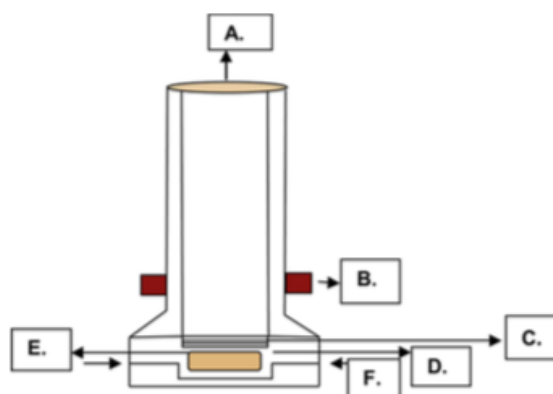
Una vez liberado el polvo, la formulación es sometida a fuerzas potentes de dispersión que desaglomeran los posibles agregados de partículas hasta convertirlos en partículas individuales. Cabe mencionar dispositivos como el Clickhaler<sup>®</sup>, el Multihaler<sup>®</sup>, y el Diskus<sup>®</sup>, que tienen la capacidad de introducir el polvo en un flujo de aire a elevada velocidad capaz de romper los agregados, consiguiendo partículas respirables. Por su parte, los dispositivos Spinhaler<sup>®</sup> y Turbuhaler<sup>®</sup> dependen de los mecanismos de desaglomeración debido al impacto de las partículas con la superficie del dispositivo (Borgström et al., 2005).

El diseño de inhaladores de polvo seco presenta algunas limitaciones, como es el mantenimiento del balance entre el flujo y la resistencia del inhalador. Así, en este tipo de inhaladores, es necesario un flujo más rápido para conseguir la desagregación del polvo, y es posible que mediante impactos más fuertes se consiga una fracción más fina de partículas. No obstante, ocurre que un flujo rápido puede aumentar las probabilidades de deposición en la región de la orofaringe y también reducir la liberación en los pulmones (Chougule et al., 2007).

Para conseguir la máxima dosis del dispositivo, el flujo inhalatorio debe generarse de forma apropiada, lo cual es difícil debido al aumento de la resistencia de dicho dispositivo. En este campo, el desarrollo y la aplicación de la dinámica de fluidos computacional ha sido útil en el abordaje y aplicación de dispositivos de polvo seco, ya que comprende el efecto de los cambios en el sistema de flujo junto con la desagregación en el dispositivo inhalatorio (Terzano, 2008). Existen algunos retos clínicos de los inhaladores de polvo seco, particularmente los relacionados con la edad, la condición clínica y el flujo inspiratorio (Islam y Gladki, 2008).

Los dispositivos modernos incluyen inhaladores individuales o multidosis. Los individuales han sido diseñados también para la liberación sistémica y oral del fármaco, resultando muy económicos (Friebel y Steckel, 2010). Los inhaladores múltiples ofrecen también un coste reducido y una liberación adecuada de fármacos en un dispositivo compacto y transportable (Sims, 2011). Hoy día, entre las opciones disponibles, la

mayoría de polvos secos consisten en un fármaco constituido de un polvo fino (con un tamaño de partícula  $< 5 \mu\text{m}$ ) incluidos en soportes de partículas, generalmente de lactosa. La presencia de lactosa ayuda a mejorar el flujo de los componentes de la formulación. En la Figura 5 se incluye el esquema de un dispositivo inhalador de polvo seco de cápsulas. Los elementos aparecen referidos en la misma.



**Figura 5.** Inhalador de polvo seco de cápsulas. A. Pieza de la boca, que sirve para la salida del aire y liberación de la formulación. B. Botón diseñado para la activación del dispositivo. C. Filtro / rejilla que produce cambios en la resistencia interna. D. Cámara de la cápsula para que ésta se mantenga dentro del dispositivo. E. Cápsula: la liberación de la dosis después de la compresión de la misma tiene lugar a través de la boquilla del dispositivo. F. Salida del aire, que impacta significativamente en la aerosolización del polvo (adaptado de Chandel et al., 2019).

Todos los estudios concluyen que las formulaciones deben ser transportadas correctamente a través de las vías aéreas, depositándose en las regiones del pulmón donde mejoran su actividad (Lavorini et al., 2017). Las partículas con un tamaño comprendido entre 1 y  $5 \mu\text{m}$  se depositan en los bronquiolos de menor tamaño, mientras que las dimensiones apropiadas para lograr llegar a la región del epitelio alveolar (un objetivo importante para la liberación / absorción de los compuestos inhalados vía oral) y las vías aéreas menores (un objetivo anatómico importante para el tratamiento de asma y EPOC), deben estar comprendidas entre 1–2  $\mu\text{m}$ .

El hecho de que los inhaladores de polvo seco sean intercambiables es motivo de confusión para los pacientes que reciben terapia inhalatoria, si bien existen estudios previos que indican que no existe relación entre el tipo de inhalador y la respuesta (Chrystyn, 2005). Durante un estudio cuantitativo llevado a cabo por Booker (2005) con 499 pacientes asmáticos, se analizó este aspecto y aproximadamente la mitad de los pacientes (51%) respondió positivamente al cambio del inhalador de polvo seco por otro

dispositivo. Además, otro de los resultados del estudio reveló que aproximadamente el 50% de los pacientes no tomaba su medicación debido a la falta de adherencia, por no saber utilizar el dispositivo.

Los inhaladores de polvo seco presentan varias cualidades para ser inhaladores ideales pero, sin embargo, ningún dispositivo muestra todas las funcionalidades para mostrar una respuesta positiva en las enfermedades respiratorias. El adecuado diseño del dispositivo basado en la función pulmonar del paciente es clave para conseguir una respuesta terapéutica efectiva, que puede modificarse según el tipo de inhalador, con diferentes mecanismos de acción, uso de una pieza específica para la boca y una correcta educación del paciente.

Los nuevos inhaladores de polvo seco han sido usados en la EPOC para maximizar la concentración de fármaco en las vías aéreas, minimizando a su vez la exposición sistémica y su toxicidad asociada (Onoue et al., 2009). El ritmo de respiración de los inhaladores de polvo seco tiene un diseño operacional que indica que se debe producir una inhalación antes de usar el spray. En estos dispositivos se combina la resistencia junto con el flujo inhalatorio para generar la energía turbulenta que causa la disgregación de la formulación del fármaco produciendo una dosis eficiente. En los inhaladores de polvo seco, comparando un inhalador con bajo flujo y una elevada resistencia y uno con un flujo rápido y baja resistencia se crea la misma energía turbulenta. Por lo tanto, existen variaciones en los diferentes dispositivos. En la guía de Chandel et al. (2019) se concluyó que no existían diferencias significativas en los resultados clínicos obtenidos empleando los diferentes inhaladores (Geller, 2005).

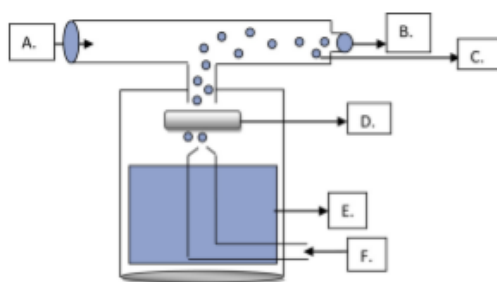
#### 1.2.1.3. Nebulizadores

Constituyen un tipo de dispositivos menos empleado. Convierten, utilizando energía mecánica o ultrasonidos, una disolución o una suspensión de un fármaco en un aerosol niebla, formado por gotículas de tamaño muy reducido, que son inhaladas de forma inmediata por el paciente (Ari, 2014). Estos sistemas presentan ciertas limitaciones, como su utilización con fármacos que posean una solubilidad acuosa limitada, ya que pueden cristalizar o precipitar, haciendo difícil la nebulización. Además, los nebulizadores son menos efectivos que los sistemas presurizados para conseguir una dosis adecuada y una medicación consistente. Por otra parte, la nebulización suele generar más residuos y se desperdicia más fármaco, por lo que los costes se incrementan.

No obstante, el nebulizador aporta eficacia *in vitro*, ya que este dispositivo no requiere coordinación ni pausa respiratoria, y se puede hacer de manera continua, permitiendo administrar diferentes fármacos juntos o por separado, así como modificar la concentración de éstos, aportando bastante información en el laboratorio. La eficacia del dispositivo también es variable, según el nebulizador, y dependiente de la técnica y de factores del propio dispositivo utilizado.

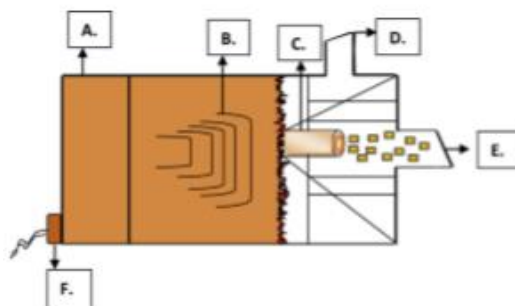
Básicamente, los nebulizadores pueden ser de tres tipos:

- *Tipo “jet”*: se usan normalmente para el tratamiento de pacientes con enfermedades pulmonares: son voluminosos y requieren una fuente de energía. Debido a las gotas aerosolizadas y al solvente que satura el aire que sale, los nebulizadores de este tipo enfrían la solución de fármaco en el nebulizador y aumenta la concentración de soluto en el volumen residual (Abdelbary et al., 2012).



**Figura 6.** Nebulizador tipo “jet”. A) Aire inhalado adicional. B) Pieza para la boca: está pensada para la inhalación por parte del paciente. C) Liberación del aerosol a través del orificio mediante el paso del gas a través de él. D) Deflector del aerosol que tiene lugar tras el choque del aire con éste. E) Reservorio del fármaco. F) Fuente de aire externa. Adaptada de Chandel et al. (2019).

- *Ultrasónicos*: son más eficientes y compactos que el tipo “jet”, pero no se pueden utilizar para la liberación de proteínas o suspensiones por su posible desnaturalización y desestabilización, respectivamente (Geller, 2005). Son los que se usan preferentemente para la liberación de partículas aerosolizadas.



**Figura 7.** Nebulizador ultrasónico. A) Generador responsable de la generación de ondas ultrasónicas. B) Las ondas ultrasónicas se forman a través del generador. C) El aire se genera a través de la boquilla. D) Ventilador. E) Pieza para la boca diseñada para la inhalación. F) Cable al que se conecta la fuente de alimentación. Adaptada de Chandel et al. (2019).

- *De "malla vibrante"*: usan ondas de menor frecuencia, eliminando temperaturas elevadas y otros factores que provocan la desnaturalización proteica. También han demostrado ser útiles para la liberación de suspensiones de liposomas y ácidos nucleicos (Rüegger y Bassler, 2019).

### 1.2.2. Deposición de partículas y mecanismos de aclaramiento de las vías aéreas

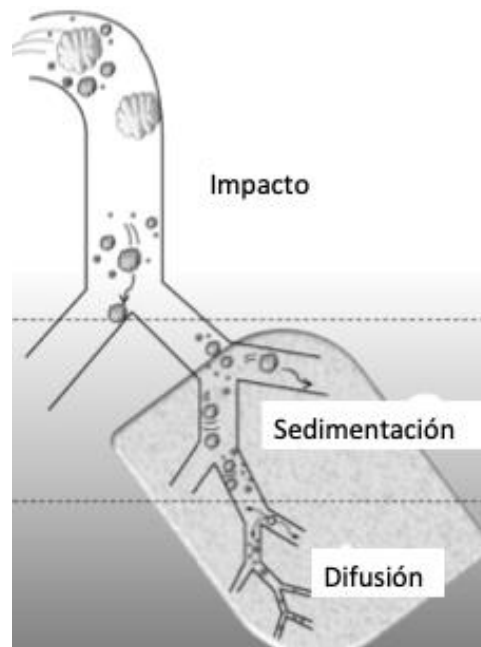
Otra razón que contribuye a ello es la incapacidad del paciente para cooperar con los diferentes tipos de inhaladores. La mejora en la terapia de aerosoles requiere una correcta comprensión por parte del paciente y un diseño favorable del inhalador para conseguir resultados favorables para los desórdenes respiratorios. La deposición pulmonar de la medicación inhalada difiere según los diferentes inhaladores que se encuentran disponibles en el mercado. Estudios realizados sobre la deposición pulmonar de la medicación inhalada indican que la respuesta terapéutica depende de la mezcla fármaco-propelente, del patrón respiratorio del paciente y del diseño del dispositivo (Tronde et al., 2003).

A lo largo de las vías respiratorias, las partículas o gotículas de la formulación administrada por inhalación, se depositan en una zona determinada, siendo esta región en la que se retienen las partículas donde se produce la acción del principio activo (Deng et al., 2019).

Una vez inhalada la formulación por la boca, existen tres mecanismos de deposición para las partículas o gotículas que se dirigen hacia el pulmón: impacto por inercia, sedimentación gravitacional y difusión browniana, como se recoge en la Figura 8. El



impacto y la sedimentación tienen un papel primordial en la deposición de micropartículas y agregados de nanopartículas. Por ejemplo, aquellas micropartículas con tamaños superiores a  $5\ \mu\text{m}$ , se depositan en la orofaringe debido a su gran tamaño, que resulta en una elevada gravitación e inercia (Williams et al., 2011). El comportamiento de las nanopartículas se encuentra afectado por difusión, mientras que la influencia del impacto y la sedimentación es casi nula. La respiración profunda lleva a la deposición porque confiere más tiempo para la difusión de las nanopartículas. Sin embargo, el aclaramiento mucociliar juega un papel fundamental en el aclaramiento pulmonar de las partículas depositadas: las células ciliadas del epitelio mueven el moco y a las partículas hacia la faringe, siendo deglutidas o expectoradas (Tronde et al., 2003).

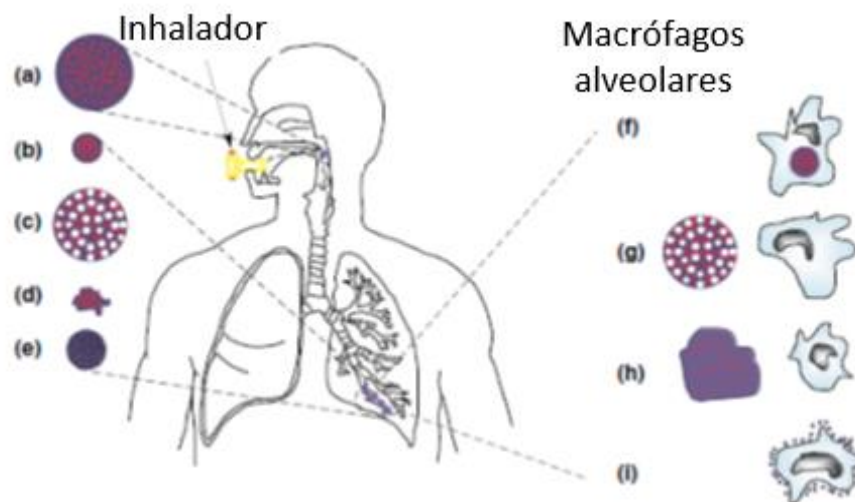


**Figura 8.** Mecanismos de deposición de partículas y zona de las vías aéreas donde se depositan según ese mecanismo (adaptado de Williams et al., 2011).

El aclaramiento mucociliar tiende a tener un mayor impacto en partículas insolubles con un diámetro mayor de  $6\ \mu\text{m}$ . En cambio, las partículas pequeñas tienden hacia la deposición alveolar, estando disueltas o retenidas durante más tiempo en el pulmón que las grandes insolubles. Mientras que las partículas pequeñas depositadas en el alveolo tienden a ser fagocitadas por los macrófagos alveolares, parece que las partículas de  $1.5 - 3.0\ \mu\text{m}$  tienden a ser más susceptibles a la fagocitosis. En la Figura 9 quedan recogidos

estos acontecimientos sobre el área de deposición de determinados sistemas micro y nanoparticulares, así como sus posibilidades de captación por determinadas células.

Por otra parte, los fármacos con una acción local pueden ser transportados de forma activa o pasiva a la red de capilares sanguíneos para ser absorbidos y pasar a circulación sistémica siendo aclarados desde el tejido pulmonar. Otra barrera que impide o dificulta la liberación pulmonar es el aclaramiento por degradación enzimática pulmonar. Y es que, aunque la actividad metabólica es muchísimo menor en el pulmón que en el hígado, existen familias del citocromo P450 que actúan como barrera frente a cuerpos extraños. Las más comunes son CYP1B1, CYP2B6, CYP2E1, CYP2J2 y CYP3A5 (Liang et al., 2015).



**Figura 9.** Inhalación y actividad de los macrófagos. Tras la inhalación (a), las partículas no porosas con tamaños grandes (normalmente  $> 5 \mu\text{m}$ ) tienden a depositarse en la orofaringe; (b) las partículas no porosas con tamaños adecuados (normalmente  $1\text{-}5 \mu\text{m}$ ) pueden alcanzar una deposición pulmonar profunda pero son engullidas fácilmente por los macrófagos alveolares (f); (c) las partículas grandes porosas pueden depositarse en el pulmón profundo debido a su baja densidad y escapar de la fagocitosis debido a su elevado diámetro (g); (d) el tamaño de las micropartículas deglutidas aumenta significativamente una vez se llega al pulmón y el aclaramiento mucociliar es mitigado (h); (e) las nanopartículas porosas en agregados pueden alcanzar el pulmón profundo y disociarse en nanopartículas (i). Adaptado de Liang et al. (2015).

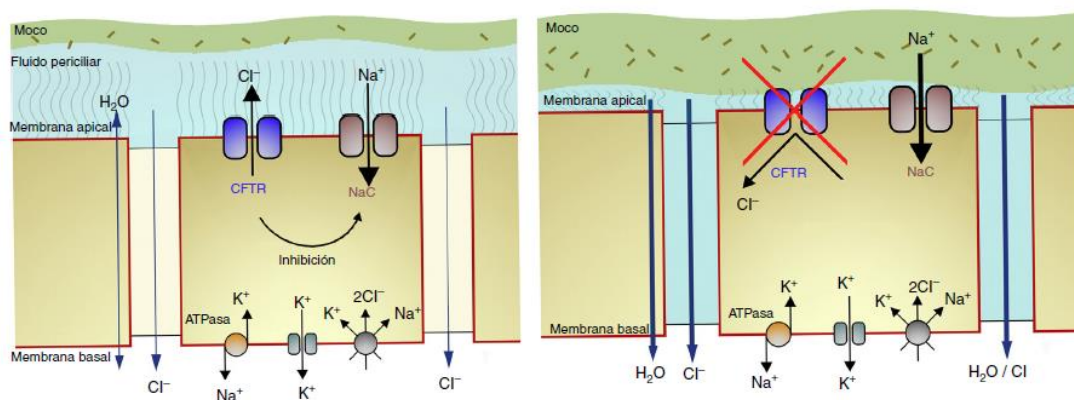
Existen múltiples factores que intervienen en el mecanismo y la deposición de las partículas a lo largo del sistema respiratorio. Entre ellos, la técnica del paciente en cuanto la manera de inhalar el medicamento va a influir en el grado y la localización de la partícula.

El ritmo impulsado por el paciente condiciona la deposición en la garganta, en la que finalmente se deglute, eliminándose y considerándose, por tanto, una dosis no terapéutica. Con estos condicionantes se determinará la dosis final que llegará al pulmón (Kadota et al., 2018). Adicionalmente, la deposición en boca y garganta presenta una gran variabilidad según el paciente, por lo que una técnica de inhalación adecuada puede mejorar sustancialmente la eficacia. Por ejemplo, Haidl et al. (2016) han demostrado que una inhalación más lenta por parte del paciente reduce la deposición en la garganta, reduciendo así la intervariabilidad entre los pacientes. No obstante, mientras que esta forma de inhalación es aplicable para métodos de inhalación pasivos (nebulizadores), no es adecuada para dispositivos como inhaladores de cartucho presurizado (PMDI), que producen el aerosol a una elevada velocidad en la que el paciente debe controlar su respiración. Por lo tanto, una temporización correcta y una presión de inspiración puede aumentar la deposición pulmonar en este tipo de aerosoles de un 7 a un 20% (Luczak-Wozniak et al., 2018). De forma similar, velocidades demasiado lentas no son las más apropiadas para inhaladores de polvo seco, donde se necesita suficiente flujo de aire para generar el aerosol. Por lo tanto, para cada dispositivo debe elegirse el método apropiado para minimizar la deposición y aumentar la dosis en el pulmón. Los ciclos de inspiración-espирación profunda crean enormes variaciones en los patrones de flujo aéreo.

Además del método de inhalación, la morfología de cada individuo influirá en el éxito de la deposición y liberación de fármacos. Las variaciones en el diámetro y la longitud de las vías aéreas entre individuos crean diferencias estructurales y volumétricas entre ellos. Por otra parte, estas diferencias anatómicas pueden alterarse según el estado de salud del individuo.

Las diferencias físicas en la estructura junto con las variaciones en la tasa de respiración crean volúmenes tidales de 460 a 900 mL en adultos, capaces de producir una diferencia de hasta dos veces en la deposición de partículas. Así, mientras las partículas grandes se depositan por inercia en la curva de 90 grados que se encuentra en la transición entre boca y garganta, las partículas pequeñas pueden utilizar el periodo de transición entre inspiración y espiración y sedimentar en el espacio orofaríngeo. El tiempo de residencia en cada porción del tracto respiratorio puede ser secundario, y la dinámica final influye en la deposición de partícula en cada región, lo que depende de la aerodinámica de cada persona, determinada asimismo por la morfología local y los cambios en el flujo aéreo local, según respiración (Van de Moortele et al., 2019).

Debido al contacto directo existente con el medio externo a través del aire inspirado, el pulmón es susceptible a las infecciones bacterianas. Aunque existan defensas del organismo a nivel pulmonar, la infección es posible, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Tal es el caso de la fibrosis quística, en la que la superficie de las vías aéreas se encuentra deshidratada, aumentando la viscosidad del moco y reduciendo el aclaramiento mucociliar (Figura 10). Como resultado de ello, aumenta considerablemente el riesgo de infección en la población afectada por esta patología (Hassett et al., 2009).



**Figura 10.** Esquema del canal CFTR en una persona sana (izquierda) y defecto de la secreción de iones cloruro con aumento de reabsorción de sodio y de agua en un paciente con fibrosis quística (derecha). Tomada de Barreiro y Marín (2015).

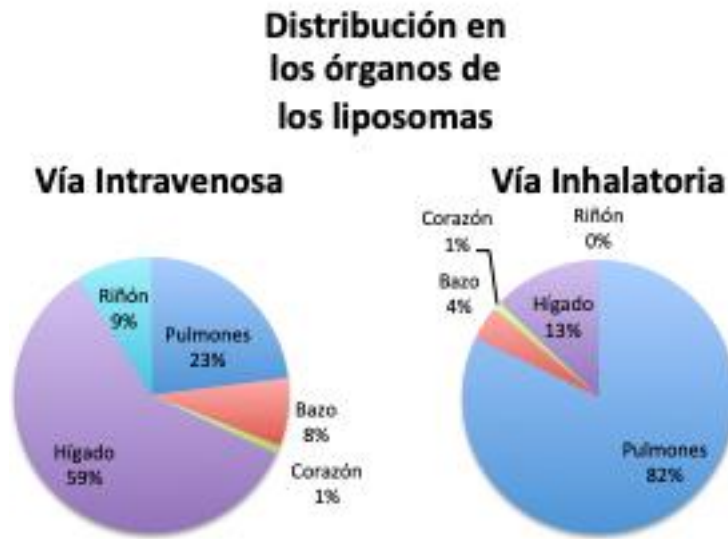
En cualquier caso, la función pulmonar puede verse alterada por síntomas comunes como la disnea aguda, dolor pleurítico de pecho, inflamación crónica y taquiapnea. También el volumen tidal puede verse comprometido, reduciendo la capacidad de inhalación. *Pseudomonas aeruginosa* puede causar daño celular e inhibir el transporte de iones a través de la membrana, alterando los mecanismos de aclaramiento mucociliar (Waters y Smyth, 2015). Enfermedades como la tuberculosis pueden causar un daño importante en los tejidos pulmonares, invadiendo de líquido las regiones infectadas y haciéndolas vulnerables en el sujeto. Este medio líquido no mantiene a los macrófagos pulmonares, reduciendo la inmunidad innata (Tarique et al., 2017). Se ha comprobado que una liberación exacta en el lugar de la infección resulta en concentraciones más elevadas de fármaco, reduciendo la circulación sistémica de éstos. Esto es deseable en el caso de infecciones bacterianas. Además, la administración sistémica mediante la vía pulmonar es posible para infecciones que no se hayan diseminado aún. Sin embargo, debido a las

dificultades nombradas anteriormente, conseguir una cantidad suficiente de fármacos inhalados puede ser complicado. La reducción del volumen tidal, las alteraciones de la fisiología, de la mucosa y de la función epitelial, así como un bloqueo de la superficie debido a la colonización, pueden inhibir una deposición adecuada. En aquellos casos en los que no exista suficiente aclaramiento mucociliar, el líquido adicional hace que el moco sea más espeso, dificultando la difusión y aumentando las propiedades adhesivas indeseables (Waters y Smyth, 2015).

### **1.3. Uso de nanopartículas por vía inhalatoria**

Los avances recientes en la Nanotecnología abren una puerta para mejorar la eficacia del tratamiento por vía inhalatoria de varias enfermedades pulmonares. Las aplicaciones de la Nanotecnología en el diseño de sistemas de liberación eficientes para la liberación de fármacos a tejidos específicos y células afectadas por la enfermedad permiten obtener resultados satisfactorios y prevenir efectos adversos severos en esos tejidos y células, incluyendo tanto los pulmones como otros órganos (Cortez-Jugo et al., 2015). En este sentido, se puede decir que la liberación local de fármacos vía inhalatoria, en la mayoría de los casos, cambia la distribución en los órganos con respecto a una liberación, por ejemplo, oral o parenteral. Aunque hay modificaciones según el nanotransportador empleado en cuanto a la distribución en el organismo, la tendencia general para aquellos de tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , consiste en que tras la liberación sistémica, la mayoría de las moléculas inyectadas se acumulan en hígado, riñón y bazo (Savla y Minko, 2013; Ivanova et al., 2013), mientras que aproximadamente un cuarto de la dosis inyectada se acumula en los pulmones (Figura 11). Por lo tanto, en torno al 75% de la dosis inyectada se pierde en el tratamiento de las enfermedades pulmonares. Este comportamiento no reduce la eficacia del tratamiento, pero se requerirá una mayor dosis de fármaco para compensar la distribución desfavorable de fármaco, pudiendo, por lo tanto, inducir efectos adversos severos en otros órganos. Por el contrario, ciertos tipos de partículas como liposomas o nanoestructuras lipídicas, se acumulan preferentemente en los pulmones tras la inhalación (Taratula et al., 2011). Por lo tanto, incluso si las nanopartículas no se dirigen específicamente hacia las células cancerosas (liberación pasiva), por ejemplo, este tipo de nanotransportadores mejorará la distribución en los órganos (Minko et al., 2004). Por tanto, las nanopartículas inhaladas dirigidas hacia el pulmón cambiarán la distribución habitual en los órganos y es por ello que se defiende que la liberación local vía inhalatoria

de nanopartículas mejoraría el perfil de distribución, ofreciendo ventajas importantes frente a una administración sistémica (Kuzmov y Minko, 2015; Zununi et al., 2017).



**Figura 11.** Distribución de los liposomas en los diferentes órganos (adaptado de Kuzmov y Minko, 2015).

### 1.3.1. Sistemas nanoparticulares de administración pulmonar

Se han desarrollado varios tipos de liberación de moléculas activas para la terapia inhalatoria. La mayoría de estos tipos de sistemas incluyen dispersiones coloidales, así como diferentes tipos de micropartículas y nanopartículas. A continuación, se llevará a cabo una breve reseña de algunos de ellos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Recopilación de los principales sistemas nanoparticulares de administración pulmonar.

<b>Tipo de nanopartículas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Cita</b>
<b>Dispersiones coloidales</b>	Sistema heterogéneo que consiste en una fase dispersa (sólida o líquida) distribuida homogéneamente en un medio disperso que suele ser agua	Dispersión de tacrolimus para administrar de forma local en el trasplante de pulmón de roedores	Efectividad para prevenir el rechazo del injerto y limitación de los efectos adversos	(Watts et al., 2011)
<b>Nanopartículas</b>	Según la IUPAC: una nanopartícula ha de tener un tamaño entre $1 \times 10^{-7}$ y $1 \times 10^{-4}$ m, aunque concretamente se usa este término para aquellas que tienen un tamaño inferior a 0.5 $\mu\text{m}$	Nanopartículas de alginato que contienen paclitaxel, fármaco antitumoral empleado en el cáncer de pulmón	El alginato es un polímero biocompatible y biodegradable que se une al tejido pulmonar	(Montaseri, y Tafaghodi, 2010)
<b>Polímeros</b>	Se consideran como fármacos poliméricos aquellos que tienen un polímero lineal conjugado con componentes activos del sistema directamente o vía espaciadores con diferente arquitectura	Liberación local de etopósido empleando un polímero de polietilenglicol - ácido copolisebáceo para formulaciones de polvo seco en el tratamiento del cáncer de pulmón	Mejora del cáncer de pulmón y rápida difusión a través de la barrera mucosa	(Tang et al., 2010)
<b>Dendrímeros</b>	Estructura altamente ramificada cuyo tamaño varía de 4 a 20 nm	Uso de doxorubicina con un dendrímero de lisina de 56 kDa de PEG para el tratamiento del cáncer de pulmón	La administración intratraqueal del fármaco (dos veces a la semana) llevó casi a la completa eliminación del tumor pulmonar	(Kaminskas et al., 2014)

<b>Nanoesferas</b>	Consisten en una nueva clase de nanotransportadores sintetizados usando cuatro bloques de polietileno / polipropileno con una etilendiamina en el centro.	Nanoesferas de ADN/poloxamina de una quimiocina llamada fractalquina para el tratamiento del cáncer de pulmón	Mejora de la metástasis pulmonar en ratones	(Pitard et al., 2004).
<b>Complejos con ácidos nucleicos</b>	Se liberan de dos formas diferentes: la primera consiste en un complejo cargado negativamente con moléculas de ácido nucleico y transportadores cargados positivamente. La segunda comprende una conjugación directa de un ácido nucleico con el transportador a través de un enlace biodegradable	Nanopartículas mesoporosas de sílica han sido probadas para la inhalación simultánea de fármacos anticáncer y ARN	Presentan poros internos sellados que pueden proteger al fármaco de la degradación y conjugar ácidos nucleicos en su superficie	(Taratula et al., 2011)
<b>Nanopartículas magnéticas</b>	Estas presentan elementos químicos magnéticos como hierro o níquel	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con budesonida encapsulada para el tratamiento del cáncer de pulmón	Demostró ser adecuado para su liberación sostenida y para su liberación en el pulmón	(Upadhyay et al., 2012).



### 1.3.1.1. Nanopartículas lipídicas

Estas se usan extensivamente para varios tipos de vías de administración y se caracterizan porque permiten una sencilla incorporación de fármacos lipofílicos en su interior o en la membrana. La naturaleza anfifílica de la mayoría de lípidos les permite formar varias estructuras e incorporar a su vez moléculas hidrofílicas. Además, los transportadores lipídicos pueden fabricarse a partir de lípidos biocompatibles, similares a los que componen la membrana. Aparte de limitar la toxicidad de estos nanotransportadores, les permite penetrar fácilmente en células diferentes. Además, la naturaleza lipofílica de los transportadores permite cruzar la barrera hematoencefálica bajo ciertas condiciones, permitiendo la liberación cerebral de fármacos. En términos de inhalación y liberación pulmonar, las partículas lipídicas pueden ser aerosolizadas fácilmente y son bien captadas por los pulmones permitiendo una retención más prolongada (Ivanova et al., 2013).

- **Nanopartículas lipídicas**

Parece natural escoger lípidos que sean similares a aquellos que contiene el surfactante pulmonar para formar transportadores para la terapia inhalatoria. DPPC y DPPC-PEG se usan a menudo con esos propósitos. Por ejemplo, se desarrolló un sistema micro/nanoparticular DPPC/DPPE-PEG para la inhalación de polvo seco que contenía el fármaco anticancerígeno paclitaxel (Etzerodt et al., 2012). Se prepararon diferentes polvos secos a base de micro/nanopartículas del tamaño de 0.6-3.4  $\mu\text{m}$  y se caracterizaron. Estos sistemas de inhalación demostraron una elevada capacidad de carga y un elevado potencial para la quimioterapia inhalatoria.

- **Liposomas**

Son probablemente los sistemas más ampliamente usados y los mejor caracterizados. En la mayoría de los casos, un liposoma contiene una única bicapa lipídica (liposomas unilaminares) o varias (multilaminares). La superficie externa de estas vesículas suele encontrarse modificada por polímeros (principalmente PEG), que permiten enmascarar su presencia ante el sistema retículoendotelial, y conjugar componentes adicionales al sistema (Etzerodt et al., 2012). En la mayoría de los casos, el tamaño ideal para los liposomas oscila entre 50-500 nm, aunque pueden emplearse tamaños mayores.

Los liposomas han sido estudiados extensivamente como vehículos para la inhalación de fármacos, vitaminas y ácidos nucleicos para el tratamiento de varias enfermedades y condiciones patológicas (Willis et al., 2012). Se ha de tener en cuenta que variando la

composición de la membrana liposomal, se pueden obtener liposomas neutros, aniónicos y catiónicos. Así por ejemplo, los catiónicos se suelen emplear para formar complejos con los ácidos nucleicos, los cuales se encuentran cargados negativamente (Betigeri et al., 2011).

Por otra parte, se han ensayado diferentes técnicas para la administración de inhaladores de polvo seco (Lehofer et al., 2014). En la mayoría de los casos, tras seleccionar cuidadosamente la composición de los liposomas así como los métodos de nebulización, los liposomas preservan su tamaño, su carga y no se agregan tras la aerosolización. Como se ha visto anteriormente, han demostrado una acumulación principal en los pulmones, una adecuada retención durante bastante tiempo y penetración en las células pulmonares tras la inhalación, además de una liberación activa en las células pulmonares (Ivanova et al., 2013). En la mayoría de los casos, no se apreciaron efectos adversos tras la aplicación de liposomas neutros o cargados negativamente. Sin embargo, los liposomas catiónicos han resultado ser tóxicos para las células humanas, introduciendo aberraciones genéticas. Además, los efectos adversos de los liposomas catiónicos aumentan a medida que aumenta la carga positiva de las nanopartículas. Sin embargo, estos liposomas catiónicos normalmente se usan para la formación de complejos neutros que, junto con los ácidos nucleicos, posibilitan la modificación de la carga superficial, previniendo de los efectos adversos en las células (Shah et al., 2013).

- Nanopartículas híbridas de lípidos-polímeros

Además de modificar diferentes tipos de nanopartículas lipídicas, los polímeros pueden utilizarse para formar híbridos de lípidos-polímeros como alternativa a los liposomas (Wang et al., 2012). Se han ensayado nanopartículas de ácido poliláctico glicólico recubiertas con fosfatidilcolina o fosfatidilcolina-estearilamina como híbridos de lípido-polímero para la terapia inhalatoria. Las nanopartículas presentaban forma esférica y se adsorbieron sobre las nanopartículas de quitosano. Además, se sugirió que las partículas resultantes debían tener un diámetro aerodinámico entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , ya que las de menor tamaño pueden ser exhaladas, mientras que las mayores de 5  $\mu\text{m}$  pueden quedarse en la boca y en las regiones de la garganta, en lugar de acceder a los pulmones. Sin embargo, esta información contradice los datos de la literatura, que muestran que las nanopartículas con un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  se depositan satisfactoriamente y quedan retenidas en los tejidos pulmonares pudiendo penetrar también en las células pulmonares.

Otro híbrido polímero-lipídico de nanopartículas, adecuado para la terapia inhalatoria llamado “Janus”, se desarrolló en el laboratorio de Garbuzenko (Garbuzenko et al., 2014). Estas nanopartículas poseen dos fases: la polimérica, que puede ser cargada con un fármaco soluble en agua, como doxorubicina, y la fase lipídica, que puede ser cargada con un fármaco insoluble como curcumina. Estas nanopartículas preservaron su forma, la distribución de tamaño y la carga de fármaco durante la nebulización.

- **Sistemas lipídicos nanoestructurados (NLC)**

Estos representan una nueva generación de nanopartículas lipídicas adecuadas para sistemas de inhalación de diferentes fármacos y de ARN (Taratula et al., 2013). Consisten en una mezcla de sólidos y lípidos en estado líquido (aceites), dispersos en una solución acuosa con la ayuda de un surfactante. Estos presentan grandes ventajas como una elevada biocompatibilidad, un elevado contenido de fármaco encapsulado, aumento de la estabilidad del fármaco y posibilidad de ser utilizadas por diferentes vías aparte de la pulmonar (Beloqui et al., 2016).

#### **1.4. Hipótesis y objetivos**

Existe una estrecha relación entre la mejora de la función aérea y las concentraciones tisulares de teofilina, de manera que a concentraciones inferiores de 10 mg/mL, los efectos broncodilatadores se reducen, y por encima de 25 mg/mL, los beneficios adicionales son superpuestos por los efectos secundarios. Asimismo, la dosis de teofilina requerida para lograr concentraciones terapéuticas varía entre pacientes, principalmente por problemas en el aclaramiento (Barnes, 2013).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que ciprofloxacino almacenado en liposomas presenta más efectividad que solo en la prevención y tratamiento de las infecciones bacterianas intracelulares del tracto respiratorio (Torge et al., 2017) ya que, una vez alcanzado el sitio de acción, mostraban una liberación sostenida del fármaco, siendo estas formulaciones prometedoras para reducir la frecuencia de administración.

Según estas premisas y basándonos en los resultados del capítulo anterior y los antecedentes expuestos en el apartado anterior, el **OBJETIVO PRINCIPAL** del presente capítulo se centra en poner a punto en el laboratorio un dispositivo denominado *Twin Impinger* para determinar la eficacia de nebulización de las formulaciones optimizadas en el capítulo 1 y evaluar su viabilidad celular para posteriores estudios de eficacia.

Este objetivo se desglosa en los siguientes **objetivos parciales**:

**Objetivo 1.** Llevar a cabo el montaje, la puesta a punto y la calibración del *Twin Impinger*.

**Objetivo 2.** Administrar formulaciones nebulizadas de salbutamol (como formulación de referencia) utilizando el dispositivo puesto a punto anteriormente, utilizando técnicas de pH, conductividad, tamaños de partícula, potencial zeta e índice de polidispersión, comparando los resultados obtenidos con una formulación comercial de salbutamol (pDMI) y con el número de pulverizaciones.

**Objetivo 3.** Extrapolar el estudio a formulaciones de teofilina y ciprofloxacino, fármacos seleccionados en el desarrollo de la nueva formulación en liposomas para el tratamiento de la FQ, cuya composición fue optimizada previamente, evaluando en estas soluciones, la relación de la concentración de fármaco que accede a las cámaras de deposición en función del número de pulverizaciones.

**Objetivo 4.** Administrar formulaciones liposomales nebulizadas de ciprofloxacino y teofilina, tanto por separado como de forma conjunta, evaluando en estas dispersiones la relación de la concentración de fármaco que accede a las cámaras de deposición en función del número de pulverizaciones.

**Objetivo 5.** Evaluar la influencia de la diferente concentración en fosfolípidos sobre la eficacia de encapsulación y nebulización de las formulaciones.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Equipos e instrumentación**

Los equipos utilizados para desarrollar el trabajo fueron los siguientes:

- Agitador magnético (*Ret Basic IKA*® - *WERKE*)
- Balanza analítica de precisión (*Explorer*® *Pro*)
- Bomba de vacío (*Millipore*)
- Centrífuga (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*)
- Conductivímetro (*Hanna*)
- Cromatógrafo (*Hitachi HPLC Elite Lachrom*)
- Nebulizador aerosol, “Coryneb Plus” (*Corysan*)

- pH-metro (*Crison pH-meter Basic 20+*)
- Zetasizer Nano ZS (*Malvern Zetasizer*)

## **2.2. Productos y reactivos**

Cloruro de sodio (NaCl), ácido oleico y teofilina (TEO) fueron adquiridos en Acofarma (España). Acetonitrilo (ACN), cloroformo, metanol, etanol, ácido 2-[4(2-hidroxi-etil)-1-piperacil] etanosulfónico (Hepes) y acetato amónico se obtuvieron de Panreac Química (España). L- $\alpha$  fosfatidilcolina de la yema de huevo (PC), colesterol (CH), desoxicolato sódico (Deo-Na), y dicetilfosfato (DCP) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Italia). Ciprofloxacino (CIP) fue adquirido en Fagron (Terrassa, Barcelona). El hidróxido sódico (NaOH) fue proporcionado por Applichem (Darmstadt, Alemania). El ácido clorhídrico (HCl) fue adquirido en T3Q Química (Sentmenat, Barcelona) y Salbutamol Sandoz<sup>®</sup> en Laboratorios Sandoz (Madrid, España).

Se utilizó agua desionizada purificada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore). Las membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 800 y 400 nm se adquirieron en Millipore (Condado de Cork, Irlanda).

## **2.3. Montaje del dispositivo *Twin Impinger***

Los grupos de investigación que tienen entre sus líneas, la administración de medicamentos por vía pulmonar, han mostrado en los últimos años un gran interés por desarrollar y adaptar técnicas de medición del tamaño de partículas *in vitro* para predecir adecuadamente el comportamiento de éstas en el organismo. Dichas técnicas no están exentas de cierta complejidad, ya que la bomba que impulsa el aire debe tener un flujo constante simulando así el ciclo respiratorio.

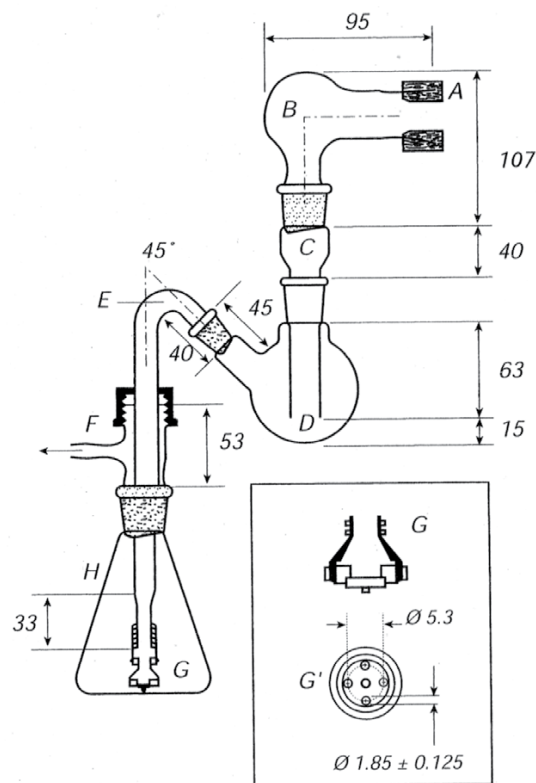
Para evaluar el comportamiento de las partículas en la vía inhalatoria se emplean normalmente dispositivos multifase en cascada, que están definidos por la Farmacopea Europea y la Farmacopea de Estados Unidos para la medida de la distribución aerodinámica de tamaños de las partículas inhaladas a través de un aerosol (Sato et al., 2019). Estos dispositivos se emplean porque presentan las siguientes características:

- Operan por el principio de división por inercia, haciendo posible determinar el tamaño aerodinámico directamente.

- Las partículas recolectadas sirven para cuantificar la cantidad de fármaco disponible mediante diferentes técnicas analíticas.

Se utilizan para el desarrollo y el control de calidad de los productos inhalados disponibles en el mercado, junto con la cuantificación de lotes para uso clínico, así como para comprobar cómo afectan otros dispositivos como los espaciadores y las cámaras a éstos. Aunque el principio por el que se usan es simple, su implementación práctica es complicada, requiriendo una elevada destreza manual.

Entre este tipo de dispositivos se encuentra el denominado *Twin Impinger*, cuya estructura simula las vías respiratorias humanas. Desarrollado inicialmente por los laboratorios GSK en Reino Unido, el *Twin Impinger* es relativamente fácil de montar y su uso es muy simple (Chimote y Banerjee, 2010).



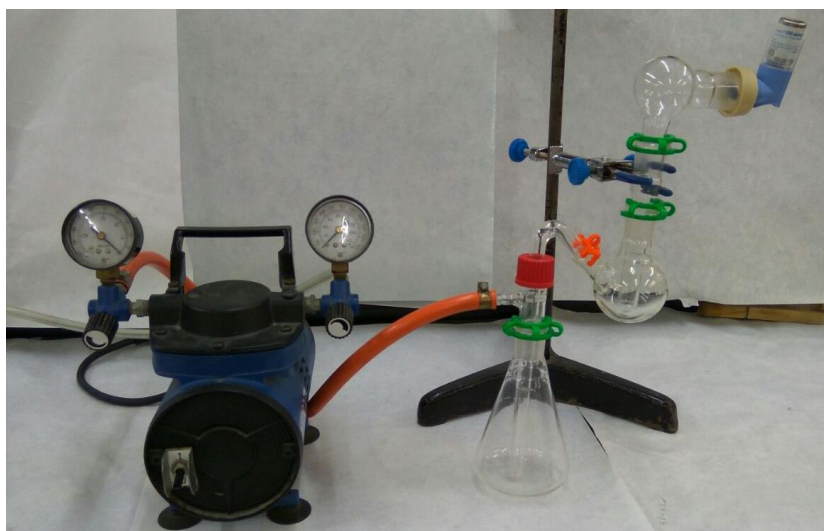
**Figura 12.** Esquema del dispositivo *Twin Impinger*. Las dimensiones están en mm. Figura obtenida de Geuns et al. (1997).

La principal ventaja que presenta el dispositivo es que es fabricado a partir de vidrio; por lo tanto, no es sensible a fenómenos de corrosión, a diferencia de otros impactadores metálicos convencionales. Con su diseño (Figura 12), se consigue diferenciar la dosis emitida de un fármaco desde el inhalador en cantidad de partículas que llegarían a las vías

respiratorias inferiores depositándose a nivel pulmonar, y cantidad de partículas que se depositan antes de alcanzar dicho órgano. En este dispositivo, una bomba insufla aire a través del aparato dispersando la nube de aerosol generada en el aparato. Esta se va depositando en diferentes partes según sus propiedades aerodinámicas, su densidad y la velocidad de impacto (Miller et al., 1992).

Por tanto, globalmente se diferencian dos secciones: la primera representa la cantidad de dosis que no consigue alcanzar el pulmón chocando en lo que se considera la parte posterior de la garganta de vidrio, que simula la zona de la orofaringe, que tiene un tamaño mínimo de paso de  $6.4 \mu\text{m}$ , y posteriormente ingiriéndose y otra zona que es la cámara superior que simula las vías respiratorias superiores. La segunda etapa representa la cantidad de dosis que consigue alcanzar los pulmones recogiendo en la cámara inferior. La cámara de impactación superior está diseñada de tal manera que a un caudal de  $60 \text{ L/min}$ , las partículas que impactan presentan un tamaño mínimo de  $6 \mu\text{m}$ . En cambio, las partículas con menores dimensiones de tamaño pasan a la cámara inferior.

En ambas cámaras se coloca un volumen determinado de un solvente que, habitualmente, es agua destilada, metanol o etanol (Figura 12). En nuestro caso, se colocaron  $5 \text{ mL}$  y  $7 \text{ mL}$  de agua destilada en los compartimentos superior e inferior, respectivamente. El agua destilada posee un elevado porcentaje de retención de partículas y además, no se evapora, a diferencia de metanol y etanol. Además, el *Twin Impinger* requiere un especial adaptador de boquilla, una bomba de vacío y un medidor de flujo para completar el sistema, como se aprecia en la Figura 13.



**Figura 13.** Estructura y componentes del *Twin Impinger* con el que se realizaron los ensayos.

La adaptación de la bomba de vacío, con presión variable, al compartimento inferior se llevó a cabo para simular el ejercicio de la inspiración.

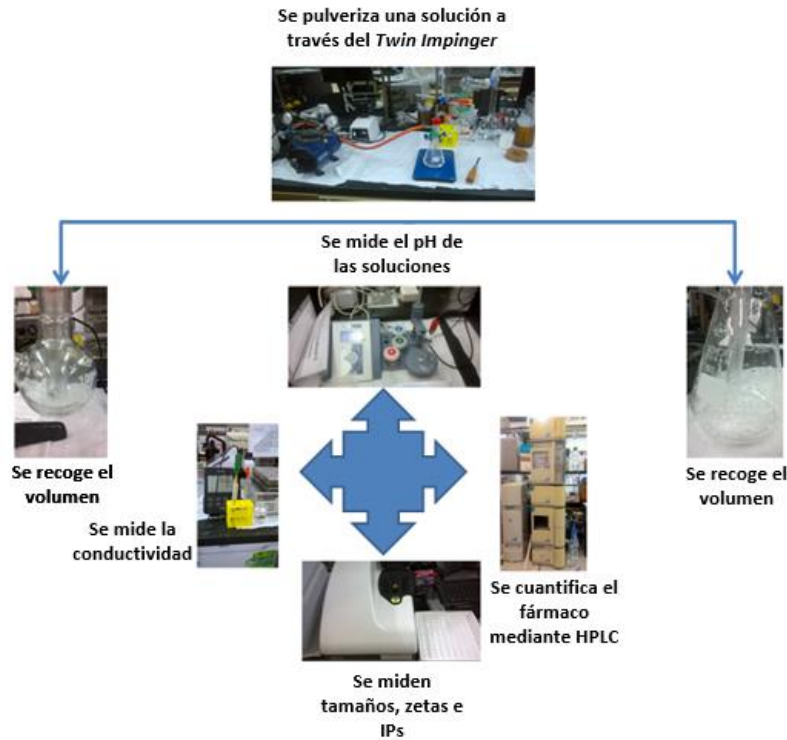
Una vez montado el *Twin Impinger*, se procedió a administrar las formulaciones y caracterizarlas, con el fin de evaluar la efectividad del dispositivo mediante la determinación de la eficacia de nebulización *in vitro* de las formulaciones, según la expresión:

$$EN(\%) = \frac{Q_I}{Q_T} \cdot 100$$

Siendo EN(%) la eficacia de nebulización,  $Q_I$  la cantidad de fármaco depositada en el compartimento inferior y  $Q_T$  la cantidad total de fármaco en la formulación ensayada.

Una vez pulverizadas las formulaciones, se llevaron a cabo ensayos de caracterización que se esquematizan en la Figura 14 y que serán descritas a continuación.





**Figura 14.** Fases de los procesos llevados a cabo en nuestro estudio.

En este estudio, se empleó como sistema inhalador de las muestras experimentales un nebulizador de alto flujo con un sistema compresor de pistón, tipo neumático o Jet (*Corysan*). Este tipo de dispositivos convierte un líquido en pequeñas gotas (atomización) como una niebla que normalmente está dentro del rango de las partículas respirables (Chandel et al., 2019) (1-5  $\mu\text{m}$ ) mediante la fuerza de un gas comprimido (aire u oxígeno). El tamaño de las partículas depende de la solución, así como de la velocidad y el flujo del gas, de manera que un aumento de la velocidad del gas disminuye el tamaño de las partículas (Abdelaziz et al., 2017).

Algunas de las ventajas que presenta este sistema es su facilidad de inhalación, capacidad de administrar diferentes fármacos juntos y a diferentes dosis, ser compatible con oxigenoterapia y ventilación asistida y proporcionar humidificación de las vías aéreas. Sin embargo, también son importantes sus limitaciones, como que solo un 2-10% de la dosis se deposita en el pulmón, la duración del tratamiento cambia según enfermedad y paciente y puede ser prolongado (10-20 minutos por dosis), es complicado utilizarlo en casa y requiere una limpieza adecuada (Kuzmov y Minko, 2015).

Este inhalador, en el cual se introducirá la formulación, será adaptado al *Twin Impinger* y se realizará un estudio comparativo con un inhalador presurizado con la misma formulación que el anterior. El inhalador presurizado contiene el fármaco disuelto o en suspensión en un propelente que, al ser expuesto a la presión atmosférica, se transforma de líquido en gas produciendo el aerosol y pudiendo ser inhalado por el paciente (García-Contreras et al., 2015). Entre sus ventajas destaca su bajo coste, facilidad de uso, precisando un flujo inspiratorio bajo, permitiendo la percepción de la inhalación y además la dosis administrada es exacta, estéril y reproducible. Entre sus limitaciones cabe citar que cuando se utiliza sin cámara espaciadora disminuye en gran parte su eficacia. Una mala técnica de utilización da lugar al fracaso terapéutico, el propelente puede causar broncoespasmo, la media de deposición en pulmón es 10–25% de la dosis total, y el uso de cámaras espaciadoras encarece el tratamiento (Chandel et al., 2019).

## **2.4. Estudios de pulverización**

### **2.4.1. Formulaciones a pulverizar**

Se partió de la formulación comercial Salbutamol Sandoz<sup>®</sup>. El principio activo es salbutamol que se presenta como sulfato. Una dosis fija contiene 100 µg de sulfato de salbutamol (AEMPS). Como excipientes de la formulación se emplearon: ácido oleico (0.0046 mg), etanol (0.72 mg), composición extraída de CIMA ([https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/70869/Prospecto\\_70869.html#6-contenido-del-envase-e-informaci-n-adicional](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/70869/Prospecto_70869.html#6-contenido-del-envase-e-informaci-n-adicional)). Se obvió de la composición norflurano (33.86 mg) por la dificultad de su adquisición.

Por tanto, los estudios realizados con salbutamol se llevaron a cabo reproduciendo la formulación comercial, a excepción del gas. Esta formulación se administró utilizando el nebulizador *Coryneb Plus* y calculando, en primer lugar, la equivalencia entre número de pulverizaciones y volumen equivalente. De esta forma, se estableció que 20 pulverizaciones equivalían a 1 mL.

Las soluciones de CIP se prepararon a una concentración de 2 mg/mL mientras que las soluciones de TEO se ensayaron a una concentración de 1 mg/mL, ambas en agua Milli Q.

A continuación, con el fin de determinar si la relación entre el número de pulverizaciones y la concentración en cada cámara de deposición era lineal, se prepararon diferentes

soluciones de los principios activos en estudio (salbutamol, TEO y CIP), que se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Concentraciones (mg/mL) los fármacos incluidos en diferentes formulaciones ensayadas para ser nebulizadas con el volumen equivalente a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 80 y 100 pulverizaciones. S: solución. L: liposomas. T: teofilina. C: ciprofloxacino. E: extruidos. 100, 75 y 50 hacen referencia a la proporción de lípidos totales respecto a la formulación inicial.

Nº pulverizaciones	20	25	30	25	40	45	60	80	100
Salbutamol	2	2	2	2	2	2			
S_T	1	1	1	1	1		1	1	
S_C	2	2	2	2	2		2	2	
L_T									1
L_C									2
L_T/C_E_100									1/2
L_T/C_E_75									1/2
L_T/C_E_50									1/2

Por otra parte, una vez optimizado el procedimiento de nebulización con las soluciones anteriores, se procedió a nebulizar las formulaciones obtenidas de liposomas de TEO, de CIP y de ambos. Finalmente, el estudio se completó con el análisis del comportamiento de las formulaciones de liposomas evaluadas en los estudios de cultivos celulares, que fueron obtenidas con diferentes ratio lípidos:fármacos.

#### 2.4.2. Variables de respuesta ensayadas

Se seleccionaron diferentes variables relacionadas con las muestras y se determinaron los valores obtenidos en las distintas formulaciones, así como en las cámaras inferior y superior del dispositivo *Twin Impinger*, conforme se incrementaba el número de pulverizaciones.

##### 2.4.2.1. pH y conductividad

El pH, o “potencial de hidrógeno”, es una medida de la concentración de hidrogeniones, una medida de la acidez o alcalinidad de una solución. Esta propiedad fisicoquímica fue

medida en el pH-metro tras administrar las formulaciones en el *Twin Impinger*. La muestra se midió introduciendo el electrodo del pH-metro hasta conseguir una medida estable, procediendo al lavado del electrodo con agua MilliQ entre medidas consecutivas (Clerc y Barenholz, 1995).

La conductividad está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones positivos y negativos denominados electrolitos, capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. Al igual que el pH, se midió la conductividad de los medios acuosos correspondientes a las dos cámaras, lo cual se llevó a cabo en el conductivímetro. La muestra se midió introduciendo la celda del conductivímetro hasta el manguito correspondiente hasta conseguir que se estabilizara la medida y se anotó el valor numérico (mS/cm). Entre medida y medida se procedió a lavar la celda con agua MilliQ.

#### 2.4.2.2. Contenido de principio activo

Para cuantificar de forma exacta y precisa los fármacos empleados en este estudio, salbutamol, CIP o TEO, el método de elección fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación se llevó a cabo por HPLC de fase reversa mediante un cromatógrafo compuesto de: bomba isocrática L-2130, inyector automático de muestras L-2200, detector de diodo L-2455 y horno Elite LaChrom Hitachi L-2350. El equipo se encuentra conectado a un ordenador, con el programa EZChrom para procesar los resultados.

La cuantificación de salbutamol en las distintas formulaciones se determinó empleando las siguientes condiciones cromatográficas: columna ODS Agilent (150 mm x 4.6 mm, 5 µm). La fase móvil estaba compuesta de una solución dihidrogenofosfato de sodio 0.08 mol/L, pH ajustado valor a  $3.10 \pm 0.05$  con ácido fosfórico y metanol (85:15 v/v). La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante el análisis, y la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 276 nm (Zhang et al., 2014). Salbutamol presentó un tiempo de retención de 3 min aproximadamente (Sutariya, 2006).

El método de cuantificación de CIP presentó las siguientes condiciones: columna ZORBAX SB C-18 150 x 4.6 mm (Viridén et al. 2011). Como fase móvil del método isocrático se utilizó metanol 25 mM y tampón fosfato 28/72 (v/v) ajustado a pH 3. El flujo fue de 1 mL/min. La señal fue detectada a 278 nm a temperatura ambiente de 25 °C. CIP presentó un tiempo de retención de 3.4 min.

El método de cuantificación de TEO se llevó a cabo en las siguientes condiciones columna Lichrospher C-18, 125×4 mm, 5 µm, Merck. Como fase móvil del método isocrático se utilizó agua MilliQ y ACN 9/91 a pH 4 ajustado con ácido acético glacial. El flujo fue de 1 mL/min. La señal fue detectada a 273 nm a temperatura ambiente de 25 °C. La teofilina presentó un tiempo de retención de 5.5 min (Barnes, 2013).

La determinación de la linealidad del método analítico se llevó a cabo mediante una recta de calibrado, utilizando el área de los picos que proporcionaron las diferentes concentraciones del fármaco utilizadas. La respuesta del analito “y” se comparó con las concentraciones correspondientes “x” (Zhang et al., 2014).

Así, partiendo de las soluciones o las diferentes formulaciones preparadas, se pudo calcular la cantidad (mg) de fármaco que llegó a la cámara inferior del *Twin Impinger*, que simulaba los pulmones, relacionándola con las correspondientes según el número de pulverizaciones o volumen nebulizado. Conociendo la cantidad real y la cantidad teórica que debería llegar, se calcularon los rendimientos (%) correspondientes en función del número de pulverizaciones o volumen nebulizado.

#### 2.4.2.3. Distribución de tamaños de partícula

El tamaño de partícula o vesícula se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica analiza la cantidad de luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, la cual está relacionada con el tamaño y la forma de las partículas.

El índice de polidispersión (IP) es un parámetro que hace referencia a la homogeneidad/heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población analizada y por tanto, más heterogéneas serán las partículas inhaladas.

El equipo utilizado fue un zetalyzer Nano ZS (Malvern Instrument) que va a medir la distribución de los tamaños. Las medidas se realizaron por triplicado.

#### 2.4.2.4. Carga superficial

Las propiedades eléctricas de la superficie de las partículas podrían tener gran influencia sobre la estabilidad física de las suspensiones o soluciones, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células.

El potencial zeta ( $\zeta$ ) consiste en una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas.

Este parámetro resulta de especial interés en los preparados coloidales, ya que constituye un importante indicador de la estabilidad física de la dispersión. Según la teoría DLVO, un sistema será estable en una solución electrolítica simple cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas sean mayores a sus fuerzas de atracción de Van der Waals.

El equipo utilizado fue un zetalyzer Nano ZS (Malvern Instrument) que va a medir la distribución de cargas superficiales de las partículas. Las medidas se realizaron por triplicado.

## **2.5. Validación del proceso con el *Twin Impinger***

Tradicionalmente, se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito seleccionado (rango de trabajo) (Barba-Meseguer et al., 2015).

El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método, y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta. Habitualmente, los criterios de aceptación implican una prueba de la “bondad de ajuste” y con frecuencia, se utiliza como criterio de linealidad un coeficiente de correlación ( $r$ ) igual o superior a 0.99. Sin embargo, este criterio no basta para demostrar la relación lineal, por lo que cabe considerar que se puede utilizar un método que no permita establecer un coeficiente de correlación tan alto como el 0.99 pero permita cumplir los fines previstos. Con ello, se dice que la linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado (Kurangi et al., 2019). En la Tabla 3 se recogen las recomendaciones oficiales en este sentido.

**Tabla 3.** Rangos de linealidad recomendados por tipo de ensayo. Adaptado de Wehr-Carl (2010).

<b>Ejemplo de rangos mínimos recomendados</b>	
<b>Tipo de método</b>	Rango mínimo recomendado
<b>Ensayo</b>	80 - 120% de la concentración objetivo
<b>Impurezas</b>	Desde el nivel informado de cada impureza, al 120% de la especificación
<b>Uniformidad de contenido</b>	70 - 130% del test o de la concentración objetivo
<b>Disolución</b>	± 20% alrededor del rango específico del test de disolución

En este ensayo, se utilizó como variable independiente el número creciente de pulsaciones o volumen nebulizado, según el dispositivo, y como variables dependientes la medida del pH, conductividad y contenido de fármaco.

## **2.6. Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido**

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, aportando información morfológica del material analizado. Permite la ampliación de la muestra 20-130000×, así como la obtención de imágenes con una elevada resolución. Estas se crean mediante el bombardeo de la muestra con electrones de forma focalizada para generar una imagen en blanco y negro a partir de los electrones que rebotan en la muestra. Estos se detectan usando detectores cargados positivamente, se obtienen imágenes en tres dimensiones (Eberle et al., 2015).

El estudio de las características morfológicas de las distintas formulaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico Philips XL-30, que posee un detector de electrones secundarios mediante el cual fue posible observar la superficie de las muestras.

Las muestras analizadas se sometieron a deshidratación en presencia de vacío y posteriormente fueron recubiertas con oro (*sputtering*) utilizando una cámara Edwards, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

Las condiciones de trabajo y el procedimiento operativo seguido fue el utilizado para analizar muestras no conductoras, siendo el voltaje de aceleración de 15 kV.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Formulaciones de salbutamol**

El primer estudio realizado se centró en analizar el comportamiento de un medicamento comercializado de salbutamol, en forma de aerosol (Salbutamol Sandoz®) con el fin de dilucidar el efecto que tenía la variación del número de pulverizaciones efectuadas en el *Twin Impinger* sobre las propiedades fisicoquímicas de los medios líquidos incluidos en las cámaras de deposición. A continuación, se realizó un análisis comparativo de dicho comportamiento con el que ofrece el nebulizador utilizado para administrar nuestra formulación, de composición similar a la aerosolizada a excepción del gas propelente.

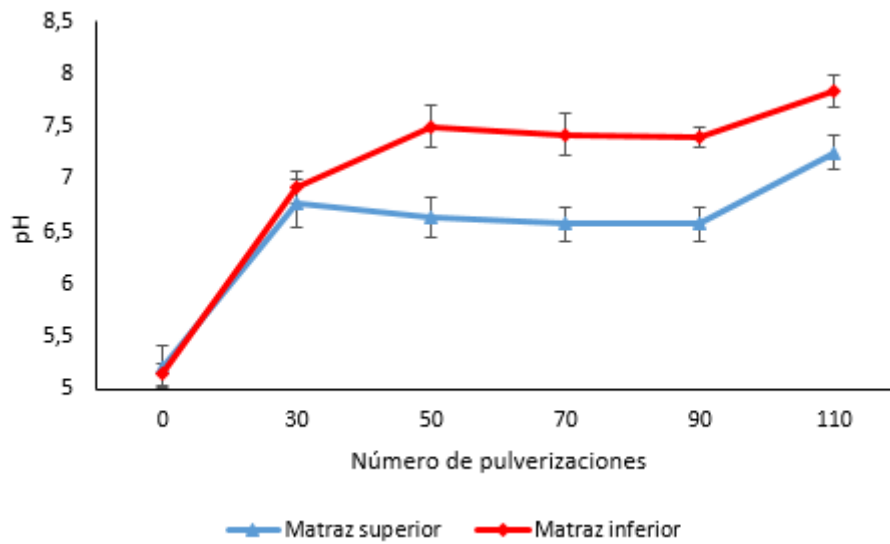
El montaje y la preparación del *Twin Impinger* se realizó siguiendo la metodología indicada en el apartado correspondiente de la *Parte Experimental* del presente trabajo.

##### **3.1.1. pH y conductividad**

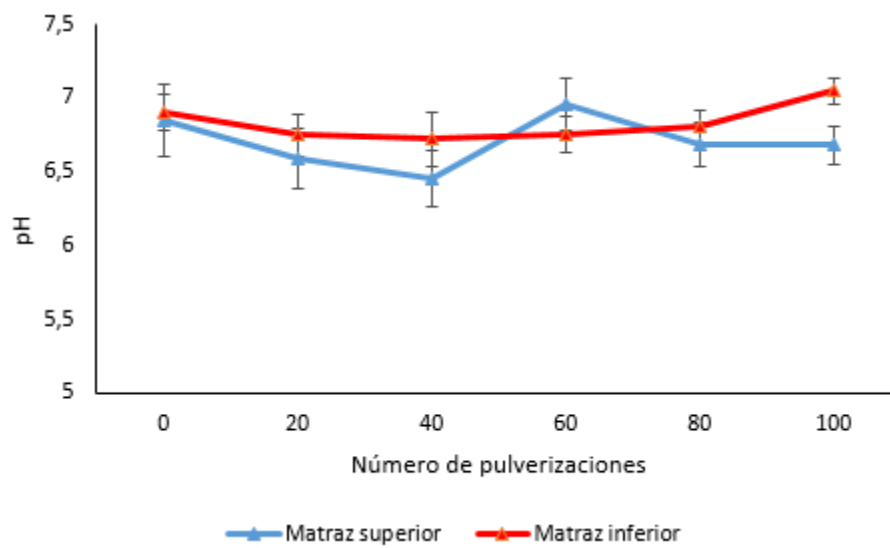
La determinación de pH y conductividad (mS/cm) para la detección de muestra correspondiente a la cantidad de salbutamol atomizada (Salbutamol comercial) o nebulizada (nuestra formulación de salbutamol) se desarrolló siguiendo la metodología indicada en el apartado 2.4.2.1 de Metodología del presente trabajo.

Se procedió realizando una batería de ensayos con números impares de pulverizaciones y seguidamente, con números pares de pulverizaciones. Los resultados correspondientes al inhalador comercial se recogen en las Figuras 15 a 18.

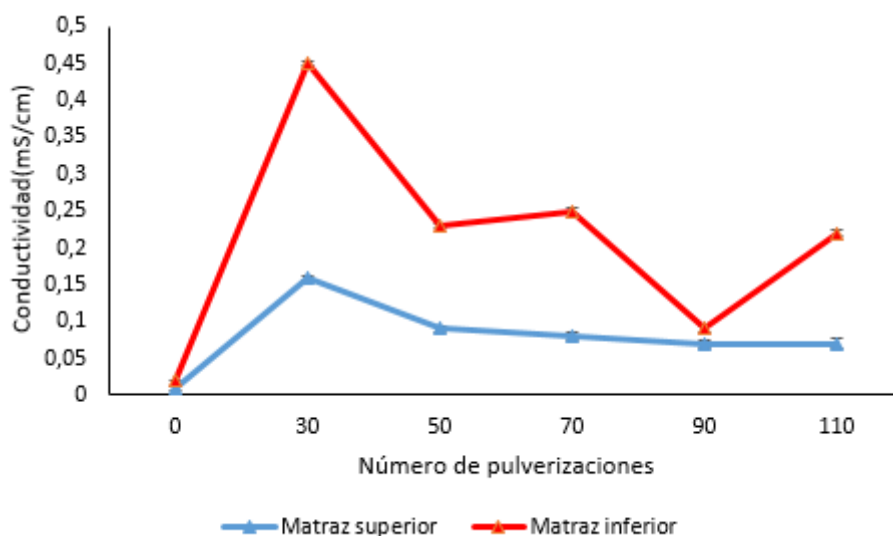




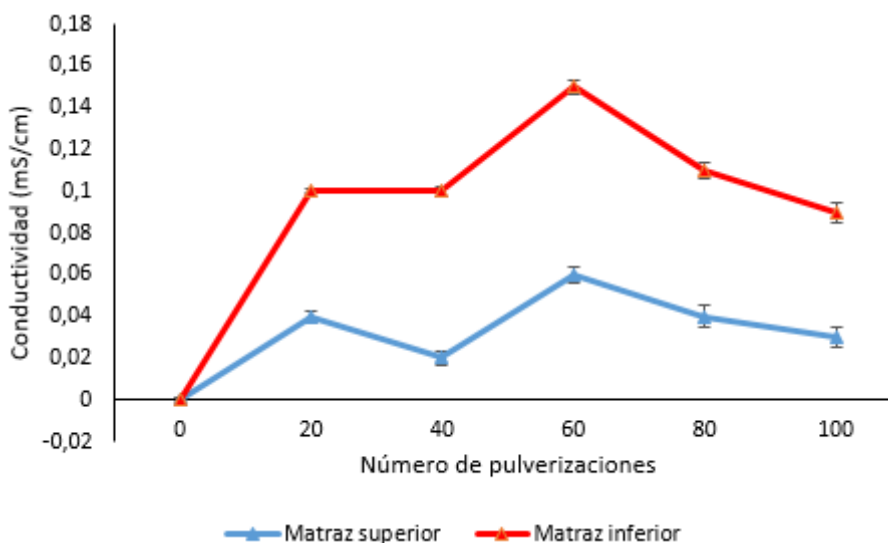
**Figura 15.** Valores de pH de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones impares).



**Figura 16.** Valores de pH de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones pares).



**Figura 17.** Valores de conductividad de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones impares).



**Figura 18.** Valores de conductividad de la formulación comercial de salbutamol en función del número de pulverizaciones (pulverizaciones pares).

En lo referente al pH y la conductividad, se esperaba un incremento de pH ( $pK_a 1 = 9.3$ ;  $pK_a 2 = 10.3$ ) y conductividad con el número de pulverizaciones (dosis). En cambio, se obtuvieron tramos de la gráfica inesperados.

Se procedió de la misma manera con la formulación incorporada en el nebulizador para comparar los resultados obtenidos usando ambos dispositivos aún a sabiendas de que esta comparación es meramente especulativa, ya que se trata de dos sistemas aerosoles que

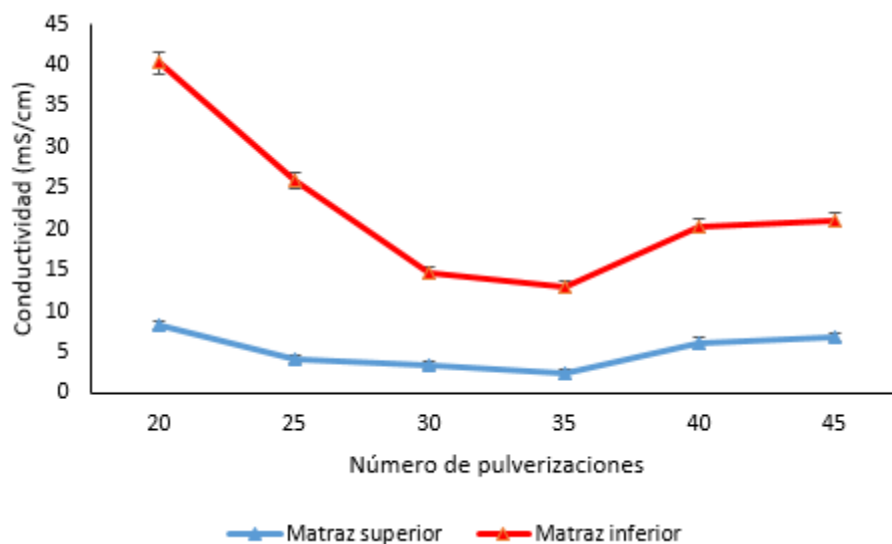
basados en mecanismos de aerosolización diferentes. Sin embargo, el análisis nos permitirá sacar algunas conclusiones acerca del funcionamiento y efectividad del *Twin Impinger*.

Teniendo en cuenta la equivalencia entre el número de pulverizaciones y el volumen de formulación a nebulizar (Tabla 4, se procedió a realizar el mismo ensayo de determinación de pH y conductividad con el nebulizador.

**Tabla 4.** Equivalencia en el número de pulverizaciones efectuadas con Salbutamol Sandoz® con el volumen pulverizado (mL).

Salbutamol Sandoz® (MDI)	Salbutamol Sandoz® (MDI)
Número de pulverizaciones	Volumen nebulizado (mL)
10	0.5
15	0.75
20	1
25	1.25
30	1.50
35	1.75
40	2
45	2.25

Utilizando el dispositivo de inhalación y realizando una batería de pulverizaciones de 20 a 45, los resultados de conductividad (mS/cm) obtenidos en la formulación comercial (Figura 19) siguen la misma tendencia que los llevados a cabo en los estudios preliminares, es decir, resultados muy dispares que en ciertos puntos de la gráfica disminuyen o aumentan conforme aumentamos el número de pulverizaciones.



**Figura 19.** Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz®.

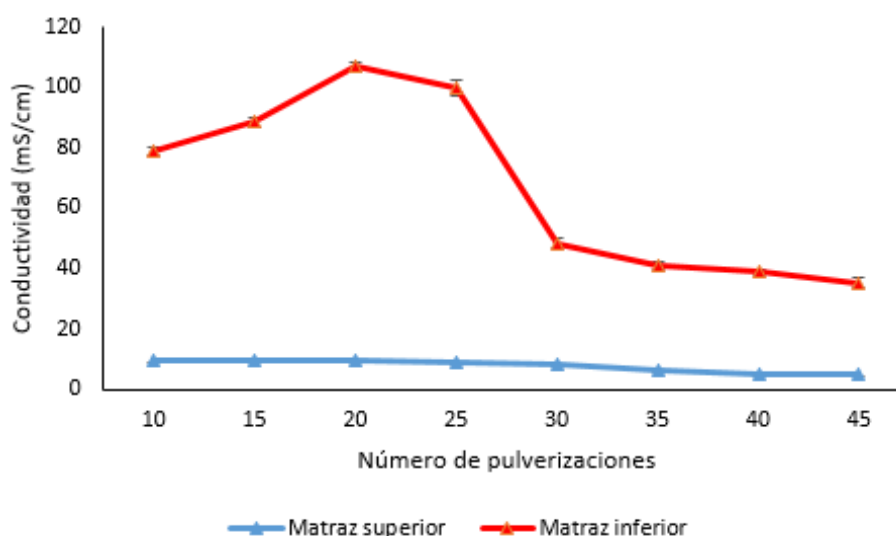
Comparando los perfiles de conductividad obtenidos en las dos cámaras de deposición, se observó un fenómeno interesante que consistió en que a medida que se aumentaba el número de pulverizaciones, los valores de conductividad disminuyeron en el matraz inferior. La explicación a este resultado puede estar relacionada con el tipo de aerosol utilizado. Una limitación que se presenta en los sistemas presurizados son los problemas asociados a la alta velocidad inicial de la pulverización de un MDI (Bonam et al., 2008) es que a mayor número de pulverizaciones, mayor colmatación en las vías oro faríngeas, como se puede apreciar en la Figura 20. Ello se traduce en una disminución del rendimiento y de las respuestas que se han seleccionado como dependientes, como es el pH y la conductividad.



**Figura 20.** Fotografía del dispositivo *Twin Impinger*, donde se aprecia cómo se va colmatando la pieza que simula la vía orofaríngea a medida que se incrementa el número de pulverizaciones (imagen de la derecha).

No obstante, el comportamiento del sistema es no lineal, como se aprecia en los perfiles de las gráficas, de forma que, a partir de un número de pulverizaciones, los valores de conductividad se incrementan de nuevo, de acuerdo al estudio de Wiegand et al., 2015, donde se recoge un incremento de la conductividad a medida que aumenta la cantidad de fármaco en la cámara.

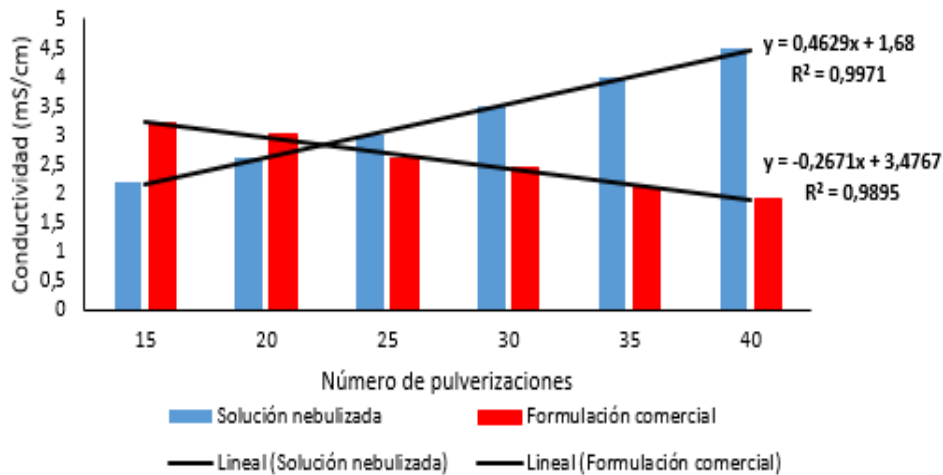
Con el fin de corroborar dicho comportamiento, se planificaron ensayos aumentando el intervalo del número de pulverizaciones a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45. La repetición por triplicado de cada ensayo arrojó los resultados recogidos en la Figura 21.



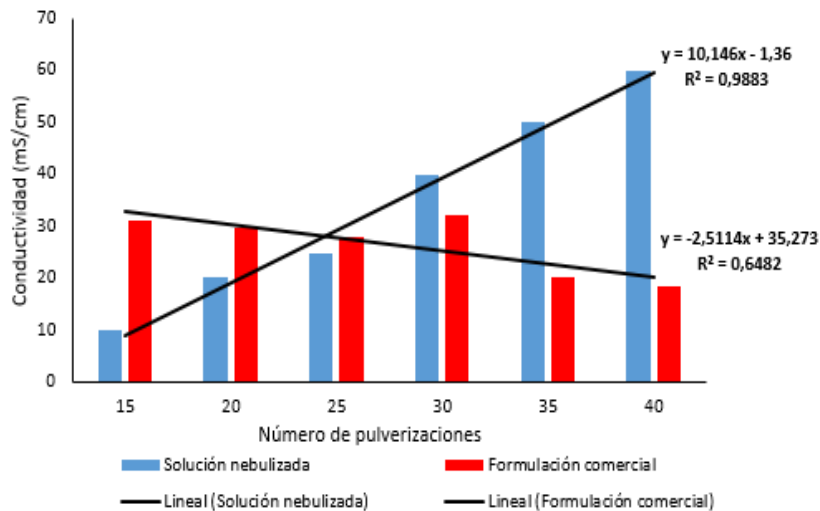
**Figura 21.** Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz® ampliando intervalo del número de pulverizaciones.

Se observa de nuevo que a medida que se incrementa el número de pulverizaciones, el valor de la conductividad en la cámara superior se mantiene prácticamente constante. En cambio, en el compartimento inferior (pulmones), se produce un aumento de la conductividad en las 10, 15 y 20 pulverizaciones, mientras que, a partir de ahí, el valor disminuye, como consecuencia de la colmatación de las vías superiores (Chimote y Banerjee, 2010). Por tanto, se fijará como rango del número de pulverización a estudiar entre 10 y 40 pulverizaciones, separados en intervalos de 5.

A continuación, en las Figuras 22 y 23 se exponen los datos resultantes del estudio comparativo entre la formulación comercial, discutida previamente, y la formulación de salbutamol en estudio (nebulizado).



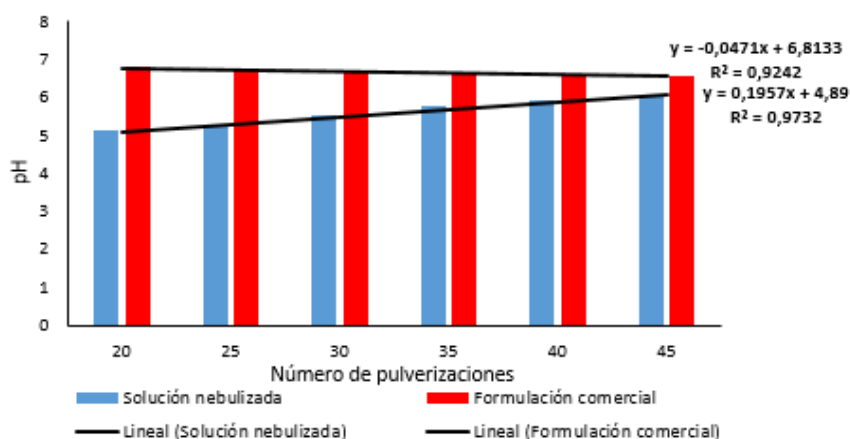
**Figura 22.** Resultados de los valores de conductividad en el matraz superior.



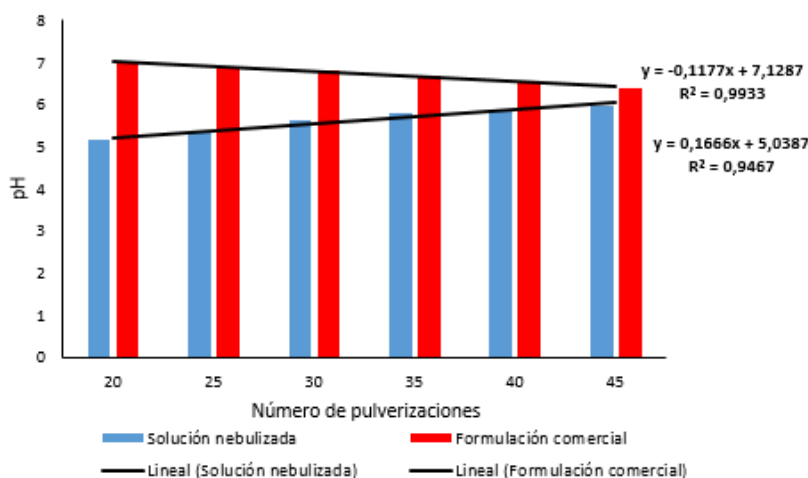
**Figura 23.** Resultados de los valores de conductividad en el matraz inferior.

Partiendo del resultado esperado de Salbutamol Sandoz® (MDI), se obtuvo que, con la formulación nebulizada, a medida que se aumentó el volumen nebulizado (equivalente a las pulverizaciones), los valores de conductividad se incrementaron. Asimismo, se apreció durante el transcurso de los ensayos, que el nebulizador no colmataba las vías aéreas superiores del *Twin Impinger*. A diferencia del MDI, el nebulizador no posee una alta velocidad de impacto en las vías aéreas superiores, lo que contribuye al transcurso más homogéneo y secuencial a través del dispositivo.

Analizando los valores de pH, los resultados obtenidos que se muestran en las Figuras 24 y 25, arrojan las siguientes consideraciones. Las modificaciones en este parámetro son muy pequeñas, aunque puede observarse una ligera tendencia descendente en el medicamento comercial con el número de pulverizaciones, mientras que lo contrario se obtiene con la formulación nebulizada. Este fenómeno ocurre tanto en la cámara superior como inferior del *Twin Impinger*. Los valores obtenidos de pH oscilaron entre 5-7.



**Figura 24.** Resultados de los valores de pH en el matraz superior.



**Figura 25.** Resultados de los valores de pH en el matraz inferior.

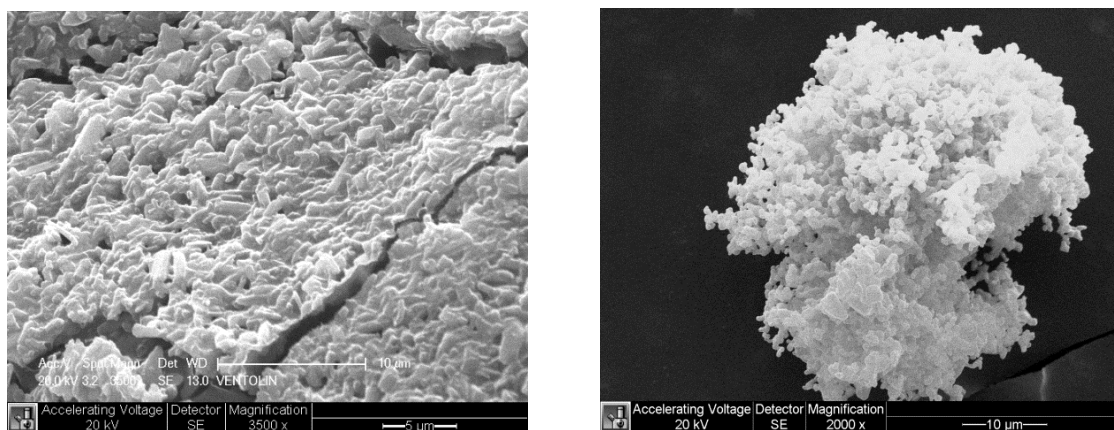
Estos resultados están en concordancia con lo discutido para la conductividad en cuanto al diferente comportamiento de los dispositivos utilizados.

El comportamiento de las formulaciones administradas bajo estos dos tipos de dispositivos tiene, por tanto, su justificación ya que, en el método de nebulización, las partículas llevan una velocidad de salida menor y no chocan tan fuertemente con la cámara superior, llegando más cantidad de partículas y con ello menor variabilidad de tamaño, demostrando una mayor estabilidad. Ello queda reflejado en los coeficientes de variación de las muestras recuperadas con el aerosol a presión, que son mucho mayores. En el estudio llevado a cabo por Hertel et al. (2015) se demostró la utilidad del método de nebulización para mejorar la liberación de fármacos muy sensibles, como es el caso de las proteínas.

### 3.1.2. Análisis dimensional y carga superficial

En este ensayo, la idea fue analizar el comportamiento de las partículas que llegan a la cámara inferior y las que quedan retenidas en la cámara superior del *Twin Impinger* una vez administrada la formulación mediante envase a presión o nebulizador.

En las Figura 26 se recogen dos imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido correspondientes a las formulaciones de Salbutamol Sandoz® (A) y salbutamol nebulizado (B) que quedan retenidas en la cámara superior del *Twin Impinger*.



**Figura 26.** Microfotografías obtenidas por SEM de Salbutamol Sandoz® presurizado (A) y Salbutamol nebulizado (B).



Hay que señalar que el tipo de dispositivo condiciona la deposición de las partículas en el portamuestras del microscopio. Como se puede observar, se aprecian diferencias en cuanto a la morfología de las partículas, así como en cuanto a su tipo de agregación.

El análisis dimensional y de carga superficial obtenidos en el Salbutamol Sandoz® se recogen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con Salbutamol Sandoz®. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Nº	Tamaño (nm)		IP		Potencial Zeta (mV)	
	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.
20	78.2	198.9	0.477	0.844	-23.1	-46.1
	65.1	175.0	0.687	0.530	-20.6	-40.3
	84.8	175.2	0.681	0.417	-33.6	-48.9
25	52.5	264.2	0.270	0.688	-12.1	-46.2
	24.7	246.4	0.301	0.549	-19.5	-47.7
	33.9	247.5	0.322	0.550	-14.4	-45.5
30	57.8	224.1	0.355	0.380	-12.6	-36.2
	52.6	224.1	0.268	0.404	-14.4	-42.8
	36.5	234.5	0.351	0.410	-17.3	-44.9
35	702.6	357.3	1	0.476	-12.8	-23.7
	39.6	215.0	0.373	0.514	-14.6	-28.0
	137.0	180.3	0.501	0.464	-15.7	-26.9
40	1698.0	536.7	1	0.861	-28.5	-35.5
	63.1	135.8	0.569	0.838	-24.6	-35.4
	82.1	75.72	0.703	0.563	-36.4	-34.2
45	321.6	1067.0	0.672	0.791	-23.3	-39.7
	73.1	732.4	0.437	0.621	-19.8	-34.9
	22.4	235.0	0.283	0.564	-23.7	-32.6

Las conclusiones más interesantes de este estudio son las siguientes. En primer lugar, se ha apreciado que en la cámara superior del dispositivo existen valores de tamaños de

partícula muy elevados, que impactan y no consiguen pasar a la cámara inferior y, por otra parte, existe otra fracción de la población de partículas que poseen tamaños muy pequeños, que son posiblemente exhalados, como ya se comentó en un apartado anterior de la Memoria.

La estadística descriptiva realizada (Tabla 6) a los datos muestra elevadas desviaciones estándar y coeficientes de variación (CV) en todos los parámetros evaluados, lo cual da idea de la dispersión de los resultados obtenidos.

**Tabla 6.** Valores medios y medidas de error de los parámetros evaluados en Salbutamol Sandoz®. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Tamaño (nm)		IP		Potencial Zeta (mV)	
C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)	C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)	C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)
<b>Valores medios (nm)</b>					
201.4	311.2	0.51	0.58	-10.2	-38.3
<b>Desviación estándar (nm)</b>					
407.0	249.4	0.23	0.16	7.1	7.6
<b>Coefficiente variación (%)</b>					
202.1	80.2	45.48	27.45	70.0	19.7

Cuando se analizan los resultados obtenidos tras nebulizar la formulación de salbutamol (Tabla 7), se aprecia que los tamaños de partícula que llegan a la cámara inferior son más similares y más homogéneos, mientras que los que se quedan en la cámara superior ofrecen una mayor heterogeneidad.

Por lo tanto, se confirma que la nebulización ofrece parámetros más estables en cuanto a las propiedades del fármaco (Geuns et al., 1697). Se ha demostrado que como ocurre en todos los dispositivos que evalúan la deposición de partículas por vía pulmonar *in vitro* que las partículas se depositan en diferentes regiones del aparato (en este caso compartimento superior o inferior) en función de su tamaño, alcanzando las partículas de mayor tamaño el compartimento inferior y las de mayor tamaño quedando en la parte superior, que simularía la zona de la orofaringe.

Este hecho se visualiza mejor con los datos medios (Tabla 8) y su desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 7.** Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con salbutamol nebulizado. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Nº	Tamaño (nm)		IP		Potencial Zeta (mV)	
	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.
20	438.8	376.7	0.868	0.768	-20.0	-39.5
	323.2	373.6	0.656	0.703	-17.5	-37.2
	290.0	366.8	0.625	0.685	-11.6	-37.9
25	386.9	298.2	0.775	0.549	-21.0	-38.6
	179.2	292.6	0.374	0.477	-26.1	-39.4
	167.4	274.1	0.359	0.455	-16.6	-36.8
30	314.9	289.7	0.636	0.528	-36.5	-30.2
	173.1	280.8	0.365	0.485	-14.6	-27.4
	112.5	269.1	0.543	0.427	-18.6	-37.4
35	167.4	193.0	0.446	0.396	-29.7	-49.9
	121.3	181.7	0.271	0.394	-14.4	-43.4
	126.0	174.2	0.281	0.391	-37.2	-45.9
40	148.3	202.1	0.481	0.353	-11.7	-41.3
	147.8	191.8	0.519	0.299	-9.3	-39.0
	182.7	185.6	0.507	0.290	-11.1	-39.9
45	253.1	283.8	0.548	0.540	-14.1	-30.3
	133.8	276.1	0.307	0.531	-33.6	-33.1
	250.0	269.1	0.309	0.480	-15.0	-30.0

**Tabla 8.** Valores de diámetro medio, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta en función del número de pulverizaciones del salbutamol presurizado. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Tamaño (nm)		IP		Potencial Zeta (mV)	
C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)	C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)	C.D.S. (Media)	C.D.I. (Media)
<b>Valores medios (nm)</b>					
215.6	265.5	0.49	0.49	-19.92	-37.62
<b>Desviación estándar (nm)</b>					
97.3	65.9	0.17	0.13	8.09	5.81
<b>Coefficiente variación (%)</b>					
44.7	24.8	39.96	27.45	44.86	15.44

Como ya se ha comentado anteriormente, en el método de nebulización, las partículas tienen una velocidad de salida más baja y no chocan tan fuertemente con la cámara superior, llegando una mayor cantidad de partículas a la cámara de deposición inferior; ello conlleva menor variabilidad de tamaño, prediciendo así una mayor estabilidad. Ello queda reflejado en los coeficientes de variación de las muestras recuperadas con el aerosol a presión, mucho mayores que las correspondientes al nebulizador.

Este método permite pulverizar tanto suspensiones como soluciones (que suele ser el estado de los fármacos en sus primeras fases de investigación). Es un proceso muy sencillo de forma general, más barato y permite una predicción adecuada del comportamiento de las formulaciones para estudios posteriores.

### 3.1.3. Contenido de salbutamol en las cámaras de deposición

En este ensayo, se llevó a cabo la detección y cuantificación de salbutamol a partir de las formulaciones ensayadas: Salbutamol Sandoz® (MDI) y salbutamol en estudio (nebulizador), con el fin de establecer su relación con el número de pulsaciones, en los dos compartimentos del dispositivo. Se utilizó el HPLC cuya metodología se explicó en la correspondiente sección de Metodología de la presente memoria.

Los resultados obtenidos del ensayo de cuantificación, partiendo de la cantidad teórica pulverizada, se recogen en la Tabla 9 para Salbutamol comercial y en la Tabla 10 para salbutamol nebulizado.

**Tabla 9.** Salbutamol (mg) comercial recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones en el aerosol presurizado. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Número de pulverizaciones	Cantidad teórica (mg)	Cantidad real (mg)	
		C.D.S.	C.D.I.
	<b>C.D.S. y C.D.I.</b>	<b>C.D.S.</b>	<b>C.D.I.</b>
20	2	0.0186	3.118
25	2.5	0.0466	2.170
30	3	0.4297	2.165
35	3.5	0.206	1.395
40	4	0.3119	1.82
45	4.5	0.42928	1.43

**Tabla 10.** Salbutamol (mg) nebulizado recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones con el nebulizador. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Número de pulverizaciones	Cantidad teórica (mg)	Cantidad real (mg)	
		C.D.S.	C.D.I.
	<b>C.D.S. y C.D.I.</b>	<b>C.D.S.</b>	<b>C.D.I.</b>
20	2	0.4986	1.01
25	2.5	0.53489	1.253
30	3	0.296	1.938
35	3.5	0.179	1.2489
40	4	1.4478	3.143
45	4.5	0.238	3.866

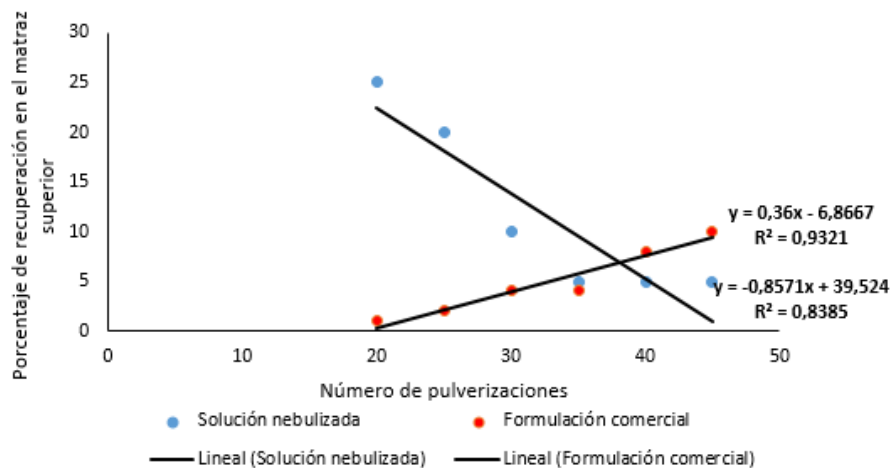
Se observa cómo los dos inhaladores siguen la misma tendencia, siendo el fármaco en un mayor porcentaje recuperado en la cámara inferior (Tabla 11), como era de esperar, mientras que en el compartimento superior, el porcentaje fue en torno a un 6% y 16% en el comercial y el nebulizador, respectivamente. La justificación ya ha sido explicada previamente, como consecuencia de la presión ejercida por el aerosol y la saturación en la región orofaríngea.

**Tabla 11.** Valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de salbutamol a partir de los dos inhaladores empleados. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

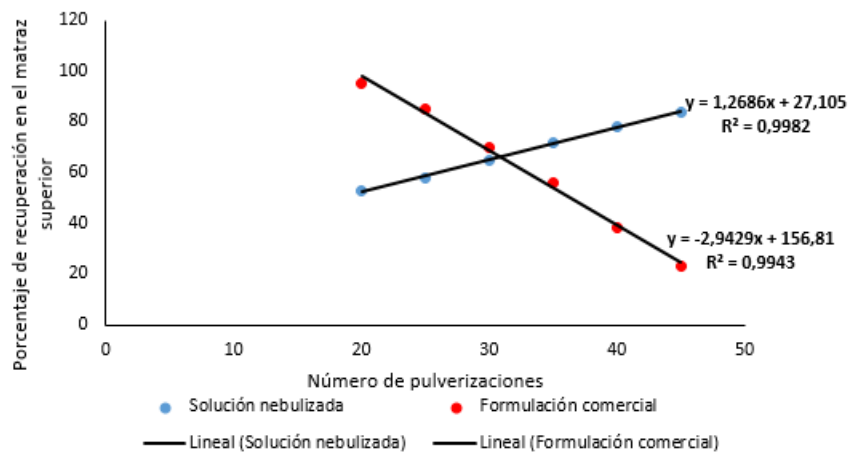
<b>Salbutamol Sandoz® (%)</b>		<b>Salbutamol nebulizado (%)</b>	
<b>C.D.S.</b>	<b>C.D.I.</b>	<b>C.D.S.</b>	<b>C.D.I.</b>
<b>Media (%)</b>			
6.32	63.05	16.96	61.87
<b>Desviación estándar (%)</b>			
5.16	28.91	12.48	18.61
<b>CV (%)</b>			
81.74	45.74	73.58	30.08

Sin embargo, aunque los valores medios de recuperación son similares con ambos dispositivos en la cámara inferior, resultado satisfactorio, sobre todo teniendo en cuenta que el salbutamol comercial es utilizado en terapéutica y es eficaz, sin embargo, los datos de variabilidad son diferentes. Existe una mayor homogeneidad de resultados en el caso del nebulizador, en base a la desviación estándar y coeficiente de variación, lo cual hace pensar en una respuesta más reproducible (Bonam et al., 2008).

A continuación, y en base a los resultados anteriores, se procedió a analizar la influencia del número de pulverizaciones o volumen inhalado sobre la variación en el porcentaje de recuperación en las cámaras superior e inferior, obteniéndose los resultados recogidos en la Figuras 27 y 28, respectivamente.



**Figura 27.** Influencia del número de pulsaciones o volumen inhalado de formulaciones de salbutamol sobre la recuperación (%) del fármaco en el matraz superior.



**Figura 28.** Influencia del número de pulsaciones o volumen inhalado de formulaciones de salbutamol sobre la recuperación (%) del fármaco en el matraz inferior.

Se aprecia un comportamiento anómalo empleando ambos tipos de dispositivos, que se puntualiza en lo siguiente:

- Falta de linealidad en las muestras correspondientes a la cámara superior del *Twin Impinger*, lo que se traduce en una mayor heterogeneidad de fármaco recuperado en dicho compartimento. En cambio, en la cámara inferior sí existe linealidad en base a los  $r^2$  obtenidos, lo que se traduce en homogeneidad de las muestras en esta cámara.
- Tendencias opuestas en el aerosol comercial y el nebulizador, en cuanto a porcentaje recuperado respecto al número de pulsaciones, lo cual es achacable al efecto de saturación expuesto anteriormente en el caso del aerosol a presión.

Como conclusión a esta sección del correspondiente capítulo, se podría confirmar la efectividad del dispositivo *Twin Impinger* como sistema para la determinación *in vitro* la eficacia de nebulización de una formulación ya que, según se ha obtenido, ofrece resultados más repetitivos, homogéneos y con una tendencia lógica que hace pensar en la interferencia mínima de los elementos que lo componen sobre los parámetros evaluados. Como se ha comentado anteriormente, este dispositivo opera por el principio de inercia, lo cual hace posible separar a las poblaciones de partículas según su tamaño y mediante la recolección de fármaco en los dos compartimentos permite obtener la eficacia de nebulización deseada (Kaya, 2018).

Para finalizar el estudio, se procedió a analizar el comportamiento de dos soluciones compuestas de los dos fármacos seleccionados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral: teofilina (TEO) y ciprofloxacino (CIP), que se están empleando en el desarrollo de formulaciones de liposomas para administración pulmonar en el tratamiento de la fibrosis quística. Las conclusiones de este estudio serán útiles a la hora de diseñar las vesículas y evaluar *in vitro* su efectividad.

### **3.2. Formulaciones de teofilina y ciprofloxacino**

#### **3.2.1. pH y conductividad**

Se nebulizaron las formulaciones de CIP y TEO, preparadas según la metodología explicada en la sección correspondiente, empleando el nebulizador “Coryneb Plus”.

El primer estudio que se abordó fue detectar las variaciones observadas en los parámetros que se seleccionaron para salbutamol, como pH y conductividad. Para ello, se nebulizaron 5 mL de cada formulación, obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Datos de pH y conductividad en las cámaras del *Twin Impinger* tras inhalar 5 mL de soluciones de teofilina (TEO) y ciprofloxacino (CIP). C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

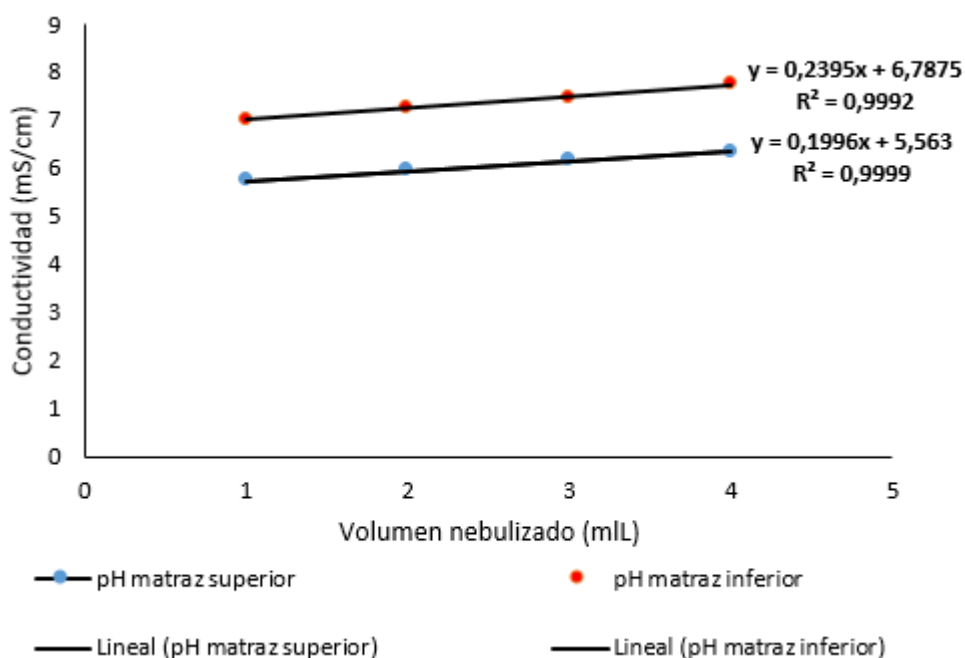
TEO				CIP			
pH		Conductividad		pH		Conductividad	
C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.
4.75	7.63	0.01	0.14	4.8	7.64	0.02	0.13



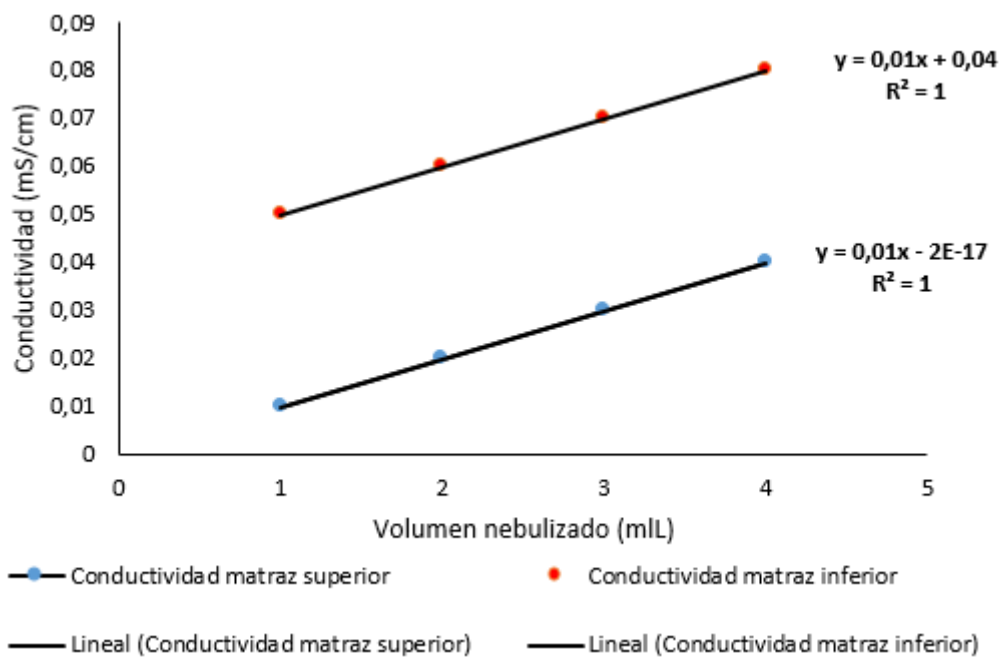
Estas variaciones producidas en los compartimentos del dispositivo nos demuestran que el método empleado sería válido para evaluar dichas soluciones con estos fármacos.

A continuación, se procedió a nebulizar volúmenes crecientes (1, 2, 3 y 4 mL) de soluciones de CIP (2 mg/mL) y TEO (1 mg/mL), con la finalidad de detectar si el volumen nebulizado afecta a la recuperación de los fármacos.

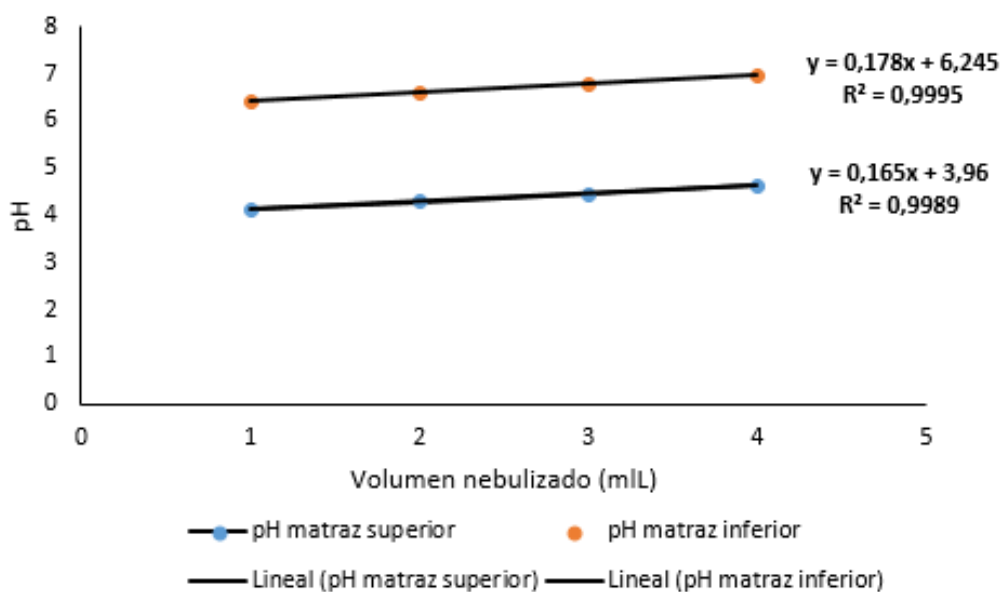
Las medidas de pH y conductividad obtenidos se exponen en las Figuras 29 a 32 para CIP y TEO, respectivamente. Se observa en ambas formulaciones que los valores de conductividad y pH son superiores en los compartimentos inferiores, como se ha demostrado anteriormente, debido a que la cantidad de fármaco en el compartimento que simula las vías inferiores es mayor. Como se confirma en el estudio de Wiegand et al. (2015), a medida que se deposita más cantidad de fármaco en el compartimento aumenta la conductividad.



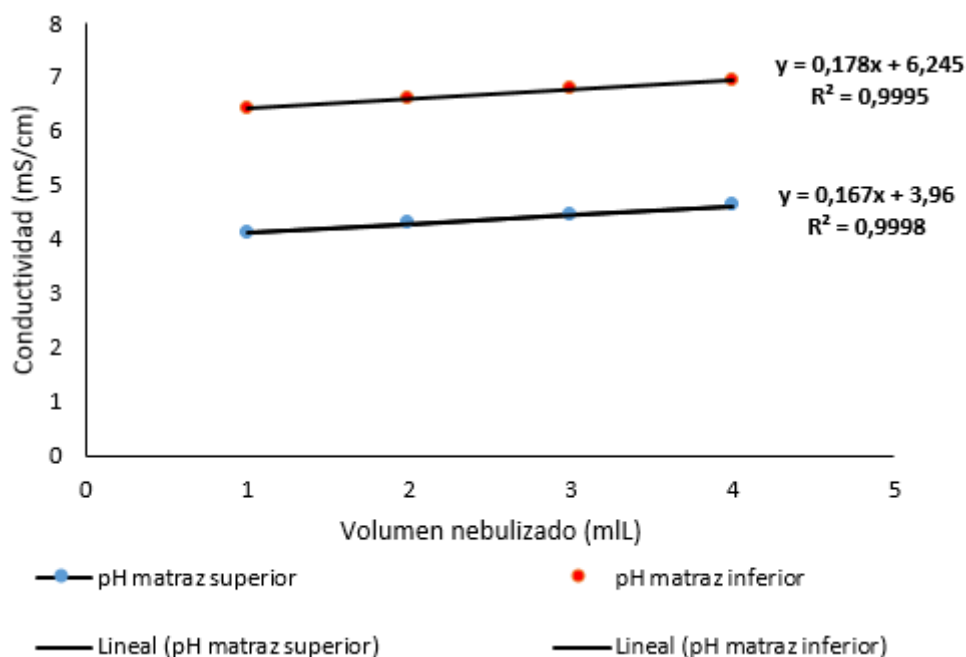
**Figura 29.** Valores de pH según el volumen nebulizado para la solución de CIP (ciprofloxacino).



**Figura 30.** Valores de conductividad según el volumen nebulizado para la solución de CIP (ciprofloxacino).



**Figura 31.** Valores de pH según el volumen nebulizado para la solución de TEO (teofilina).



**Figura 32.** Valores de conductividad según el volumen nebulizado para la solución de TEO (teofilina).

Según los resultados obtenidos, aunque el rango de valores es pequeño, sin embargo, se aprecia una tendencia lineal en todos los casos, con unos valores de  $r^2$  superiores a 0.995, lo cual es indicativo de la eficacia del *Twin Impinger* en la determinación de la eficacia de nebulización, refutando los resultados obtenidos en el caso del salbutamol, y confirmando la mayor presencia de partículas en el compartimento inferior con la determinación de valores superiores de conductividad y pH (Parmar et al., 2010). En cuanto a los valores de pH, se observa que CIP presenta valores mayores en el compartimento inferior, esto puede ser debido a que esta es una molécula anfotérica, debido a la presencia de los grupos carboxilo y amino, cuyos valores de  $pK_a$ , son 6.0 y 8.8 respectivamente; al ionizarse en contacto con el agua puede aumentar el pH de la solución. TEO, al ser una base débil, aumentaría los valores de pH al encontrarse parcialmente ionizada.

### 3.2.2. Contenido de ciprofloxacino y teofilina en las cámaras de deposición

#### 3.2.2.1. Cuantificación de los fármacos en solución

El método cromatográfico utilizado para cuantificar CIP y TEO se desarrolló siguiendo la metodología indicada en el apartado 2.4.2.2. de la Metodología del presente trabajo.

El estudio consistió en analizar el porcentaje de recuperación de cada fármaco en solución en cada uno de los compartimentos en función del volumen a inhalar. Los resultados mostrados en la Tabla 13 demuestran una mayor recuperación en la cámara inferior que en la superior, lo cual confirma que el comportamiento de estas formulaciones es similar al de las formulaciones ya validadas, siendo indicativo de la efectividad del dispositivo en cuanto a recuperación y deposición de fármacos en niveles inferiores del tracto respiratorio. Se observa que el incremento de la cantidad de fármaco hace que se incremente la eficacia de nebulización de ambos fármacos.

**Tabla 13.** Porcentaje de recuperación de CIP y TEO en las cámaras de deposición en función del volumen administrado. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Volumen pulverizado (mL)	% recuperación TEO		% recuperación CIP	
	C.D.S.	C.D.I.	C.D.S.	C.D.I.
1	2.04	13.36	1.38	6.76
2	6.91	38.46	10.66	38.49
3	6.75	41.36	14.05	51.47
4	5.22	47.25	18.07	64.19
5	18.02	84.13	7.45	62.40

#### 3.2.2.2. Cuantificación de los fármacos encapsulados en liposomas

Una vez que se testaron los fármacos en solución, se procedió a ensayar las formulaciones en liposomas de ambos fármacos encapsulados mediante el método transmembrana, y que fue optimizado en el capítulo anterior.

Para ello, se nebulizaron por duplicado preparaciones de liposomas de 5 mL, depositando agua en el matraz superior (5 mL) e inferior (7 mL).

En primer lugar, y con el fin de analizar la influencia del tamaño de los liposomas sobre la eficacia de nebulización, se evaluaron muestras antes y después de nebulizar. Los resultados de caracterización obtenidos antes de someter la muestra a la nebulización se recogen en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Tamaños, IP y potencial zeta de ambos fármacos antes y después de extruir. NE: antes de extruir. E: después de la extrusión. L: liposoma. T: teofilina. C: ciprofloxacino.

Lote	Tamaño (nm)	IP	Zeta (mV)
L_T_NE	562.2±1.73	0.47±0.04	-20.33±0.21
L_T_E	182.33±1.22	0.33±0.03	-15.8±2.75
L_C_NE	534.07±1.72	0.48±0.01	-20.73±1.75
L_C_E	159.43±2.65	0.17±0.03	-18.4±1.57

Una vez sometidas las muestras de TEO y de CIP al proceso de nebulización, los resultados de caracterización fisicoquímica de las mismas mostraron que tras la nebulización de los liposomas con los fármacos, los tamaños para ambos resultan mayores en el compartimento superior, simulando la zona orofaríngea; en cambio, las del compartimento inferior son de menor tamaño, simulando así lo que ocurre en las vías respiratorias inferiores (Tabla 15). Asimismo, el valor de potencial zeta es muy elevado en el compartimento superior para ambos fármacos, lo cual puede deberse a la colmatación de la muestra y a la formación de agregados; además, los valores de este parámetro en el compartimento inferior demuestran que las partículas son estables y adecuadas para su nebulización.

**Tabla 15.** Tamaños, IP y potencial zeta de ambos fármacos por separado incluidos en liposomas, y sometidos a nebulización dentro de las cámaras del Twin Impinger. TEO: teofilina. CIP: ciprofloxacino. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

Fármacos	Tamaño	IP	Zeta
TEO (C.D.S)	188.43±4.93	0.15±0,01	-49.33±2.30
TEO (C.D.I)	168.83±1.25	0.17±0,02	-15.96±0.15
CIP (C.D.S)	152.83±1.50	0.15±0.01	-51.33±1.42
CIP (C.D.I)	138.83±1.56	0.19±0.01	-15.73±1.45

Se puede observar una reducción del tamaño vesicular de los liposomas con respecto a antes de la nebulización. Aparte, como se recoge en la Tabla 16, se observa pérdida del fármaco, apreciándose que no se recupera toda la cantidad inicial nebulizada. Esto sugiere la ruptura de los liposomas, la nebulización resultó en la reducción del tamaño de partícula, que puede ser debido a la pérdida de material hidrofílico (fosfolípidos), con una mayor pérdida de los liposomas de mayor tamaño (Elhissi et al., 2007). Sin embargo, los liposomas demostraron tener valores similares de IP y potencial zeta, presentando tamaños similares a los de los liposomas extruidos en el compartimento inferior, refutando la teoría anterior de que al compartimento inferior llegan más vesículas, no quedando retenidas en el compartimento superior.

**Tabla 16.** Porcentaje de fármaco recuperado en cada una de las cámaras de nebulización, junto con la eficacia de nebulización final para cada fármaco.

<b>Fármaco</b>	<b>Recuperación en C.D.S.</b>	<b>Recuperación en C.D.I.</b>	<b>Eficacia de nebulización (%)</b>
<b>Teofilina</b>	23.13	74.4	74.4
<b>Ciprofloxacino</b>	17.67	58.16	58.16

En cuanto a la eficacia de nebulización, TEO demostró presentar un valor más elevado con respecto a CIP.

### 3.2.2.3. Cuantificación de los dos fármacos coencapsulados

Finalmente, se llevó a cabo el estudio de nebulización de las últimas formulaciones evaluadas en el capítulo 1, las cuales presentaban la misma composición lipídica en la bicapa y los dos fármacos coencapsulados. La diferencia entre lotes era la variación del porcentaje lipídico respecto a los fármacos, con objeto de reducir la toxicidad celular asociada a éstos y comprobar así si la posible relación entre la encapsulación y el porcentaje de nebulización de la formulación constituida por TEO y CIP.

Los lotes analizados contienen el 50, 75 y 100% de la cantidad inicial de fosfolípidos utilizada.

Comenzando el análisis de las características fisicoquímicas de los lotes elaborados, en cuanto a tamaños se puede apreciar que a medida que se reduce el porcentaje de fosfolípidos, disminuye el tamaño, llevando también la extrusión a la reducción

significativa de los tamaños y a la mejora del IP en los tres lotes (Tabla 17). En cuanto a los valores de potencial zeta, son todos similares, a pesar de reducir el porcentaje lipídico global. empleado la fosfatidilcolina presenta valores de zeta negativos, aparte de la carga negativa que aporta el dicetilfosfato.

**Tabla 17.** Valores de tamaño vesicular, IP y potencial zeta de los lotes analizados con diferentes concentraciones de fosfolípidos.

	<b>Tamaño (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>Zeta (mV)</b>
<b>L_T/C_NE_50</b>	547.13±23.12	0.42±0.02	-20.36±1.10
<b>L_T/C_E_50</b>	231.07±2.80	0.23±0.01	-16.76±0.31
<b>L_T/C_NE_75</b>	682.07±10.98	0.35±0.07	-19.46±0.82
<b>L_T/C_E_75</b>	263.9±5.11	0.21±0.02	-21.56±0.97
<b>L_T/C_NE_100</b>	709.1±17.32	0.33±0.06	-21.76±0.55
<b>L_T/C_E_100</b>	218.83±2.79	0.25±0.01	-16.17±0.80

Una vez seleccionados los lotes extruidos y tras el proceso de nebulización, se observó una disminución del tamaño de las vesículas, debido probablemente a la pérdida de parte del material durante el proceso (Tabla 18). La nebulización desde un dispositivo tipo “jet” puede producir la reducción del tamaño de partícula (disrupción), con la pérdida de liposomas de mayor tamaño (Elhissi et al., 2007) y resultando distribuciones muy polidispersas (Elhissi et al., 2012). Los valores elevados de potencial zeta en los compartimentos superiores pueden deberse a la colmatación de la muestra, hecho que ocurre habitualmente en este compartimento, según Ferguson et al. (2018). Una de las desventajas de los nebulizadores consiste en la formación de agregados, esto es lo que podría sucederle a la muestra en ese caso, pudiendo explicar elevados valores de potencial zeta.

**Tabla 18.** Tamaños, índice de polidispersión (IP) y potencial zeta de ambos fármacos en la misma formulación de liposomas, y sometidos a nebulización dentro de las cámaras del *Twin Impinger*. T teofilina. C: ciprofloxacino. L: liposoma. E: extruido. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

		Tamaño (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
<b>L_T/C_E_50</b>	C.D.S.	214.36±1.99	0.41±0.03	-57.33±1.30
	C.D.I.	137.36±0.57	0.39±0.02	-26.16±3.62
<b>L_T/C_E_75</b>	C.D.S.	187.6±5.50	0.34±0.02	-41.83±1.95
	C.D.I.	150.47±1.98	0.33±0.02	-26.9±0.35
<b>L_T/C_E_100</b>	C.D.S.	148.30±5.42	0.48±0.07	-20.16±0.66
	C.D.I.	136.60±0.66	0.39±0.02	-26.26±2.40

Respecto a la eficacia de encapsulación, no existen diferencias significativas entre los lotes, a excepción de la formulación que contiene 100% de fosfolípidos. Este lote precisamente presenta valores similares de potencial zeta en ambos compartimentos, lo que puede sugerir que se colmata menos muestra, llegando más cantidad de fármaco al compartimento inferior. En la Tabla 19 se comprueba que el lote con el 100% de fosfolípidos presenta la eficacia de encapsulación más elevada (61.18%) y valores similares en cuanto a tamaño en ambos compartimentos (Tabla 18).

**Tabla 19.** Eficacias de encapsulación y nebulización de los tres lotes con diferentes concentraciones de fosfolípidos. L: liposomas. T: teofilina. C: ciprofloxacino. 50, 75 y 100 indican la proporción de lípidos respecto al fármaco.

Lote	Fármaco valorado	Eficacia encapsulación (%)	Eficacia nebulización (%)
<b>L_T/C_E_50</b>	TEO	49.34±4.39	63.39±5.32
<b>L_T/C_E_75</b>	TEO	50.56±5.45	67.46±4.94
<b>L_T/C_E_100</b>	TEO	49.36±6.43	66.00±6.92
<b>L_T/C_E_50</b>	CIP	50.76±5.46	51.22±6.47
<b>L_T/C_E_75</b>	CIP	51.87±5.97	56.73±6.03
<b>L_T/C_E_100</b>	CIP	61.18±5.48	53.11±6.38

En cuanto a la eficacia de nebulización esta fue similar para los tres lotes ensayados, aunque en todas las formulaciones se aprecia pérdida de fármaco, independientemente de



la cantidad de lípidos que ésta lleve. Según el estudio llevado a cabo por Desai et al. (2002), la eficacia de nebulización y la de encapsulación también dependen de la temperatura de dispersión de los fosfolípidos de la formulación. Según ellos, formulaciones con fosfatidilcolina demostraron resultar en elevadas eficacias de nebulización.

Además, la cantidad de fármaco cuantificado en las cámaras de deposición, fue mayor en el matraz inferior para todos los lotes, con tamaños menores en el matraz inferior (Tabla 20), probando la teoría de “distribución por tamaños” para liposomas convencionales, que dice que las partículas más grandes permanecen en el compartimento superior, mientras las más pequeñas se desplazan hacia el compartimento inferior, lo cual pudo refutarse midiendo el tamaño de las vesículas en ambos compartimentos. En cuanto al escape de parte de la formulación durante la nebulización, esto puede ser atribuido a la fragmentación de las vesículas, que puede deberse a las ondas de choque y a las discontinuidades cinéticas asociadas al dispositivo, así como a la dilución de la muestra (Desai et al., 2002).

**Tabla 20.** Porcentaje recuperado de los dos fármacos en los diferentes compartimentos del *Twin Impinger*. L: liposomas. T: teofilina. C: ciprofloxacino. 50, 75 y 100 indican la proporción de lípidos respecto al fármaco. E: extruido. C.D.S.: cámara de deposición superior. C.D.I.: Cámara de deposición inferior.

	TEO (C.D.S.)	TEO (C.D.I.)	CIP (C.D.S.)	CIP (C.D.I.)
L_T/C_E_50	1.66	63.39	10.18	51.22
L_T/C_E_75	1.59	67.46	7.27	56.73
L_T/C_E_100	2.26	66.00	16.30	53.11

#### 4. CONCLUSIONES

- La puesta a punto del dispositivo “*Twin Impinger*” nos ha ayudado a comprender el comportamiento de nuestras formulaciones comparadas con salbutamol comercial, para ser administradas por vía pulmonar, a fin de avanzar en la línea de investigación de la enfermedad pulmonar de la fibrosis quística.
- Se han administrado las formulaciones mediante el nebulizador *Corineb*<sup>®</sup>, a través del dispositivo “*Twin Impinger*”, recogiendo muestras al finalizar el proceso en las

cámaras de deposición superior e inferior, las cuales simulan las vías respiratorias superiores e inferiores, pudiendo medir diferentes propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad, porcentaje de recuperación de los fármacos en ambos compartimentos y eficacia de nebulización), que han corroborado la conveniencia del dispositivo.

- Se han realizado ensayos tanto a soluciones de teofilina y ciprofloxacino, como a formulaciones en liposomas conteniendo ambos fármacos, con diferentes proporciones de lípidos totales con los fármacos. Estas formulaciones han sido desarrolladas en el capítulo anterior, evaluando su viabilidad celular. Al comparar formulaciones de ambos fármacos con diferentes concentraciones de lípidos, se observa que no existen diferencias significativas en cuanto a eficacia de encapsulación y nebulización, demostrando que todas serían adecuadas para la nebulización manteniendo sus propiedades físico-químicas.
- Las próximas investigaciones sobre esta enfermedad irán avanzando utilizando este dispositivo inhalador que ha demostrado una gran utilidad.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Abdelaziz HM, Elzoghby AO, Kamel NM, Elgohary MM, Gaber M, Elkhodairy KA, Kabary DM. 2017. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *Journal of Controlled Release* 269(10):374–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.036>.

Alipour S, Montaseri H, Tafaghodi M. 2010. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81(2):521–29. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.07.050>.

Alonso C, Waring A, Zasadzinski JA. 2005. Keeping lung surfactant where it belongs: protein regulation of two-dimensional viscosity. *Biophysical Journal* 89(1):266–73. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.052092>.

Andreassen S, Steimle KL, Mogensen ML, De La Serna JB, Rees S, Karbing DS. 2010. The effect of tissue elastic properties and surfactant on alveolar stability. *Journal of Applied Physiology* 109(5):1369–77. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00844.2009>.

Ari A. 2014. An evaluation of nebulizers for better clinical outcomes. *Eurasian Journal of Pulmonology* 16:1–7. <https://doi.org/10.5152/ejp.2014.00087>.

- Ari A, Fink JB. 2011. Guidelines for aerosol devices in infants, children and adults: which to choose, why and how to achieve effective aerosol therapy. *Expert Review of Respiratory Medicine* 5(4):561–72. <https://doi.org/10.1586/ers.11.49>.
- Barba-Meseguer N, Martínez-Ollé X, Alsius-Serra A, López-Yeste ML, Caballé-Martín I. 2015. Acreditación según la norma UNE-EN ISO 15189, de la fase preanalítica del laboratorio de análisis clínicos Catlab. *Revista de Calidad Asistencial* 30(6):273–80. <https://doi.org/10.1016/j.cali.2015.08.004>.
- Barnes PJ. 2013. Pulmonary perspectives theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188:901–6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0388PP>.
- Barreiro-Martínez T, Marín-Soria JL. 2015. Fibrosis quística: detección bioquímica y diagnóstico molecular. *Revista Del Laboratorio Clínico* 8(2):82–91. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2015.04.002>.
- Bernardo J, Videira RA, Valentão P, Veiga F, Andrade PB. 2019. Extraction of phospholipid-rich fractions from egg yolk and development of liposomes entrapping a dietary polyphenol with neuroactive potential. *Food and Chemical Toxicology* 133(11):110749. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110749>.
- Betigeri S, Zhang M, Garbuzenko O, Minko T. 2011. Non-viral systemic delivery of sirna or antisense oligonucleotides targeted to Jun N-terminal kinase 1 prevents cellular hypoxic damage. *Drug Delivery and Translational Research* 1(1):13–24. <https://doi.org/10.1007/s13346-010-0003-1>.
- Bonam M, Christopher D, Cipolla D, Donovan D, Goodwin D, Holmes S, Lyapustina S. 2008. Minimizing variability of cascade impaction measurements in inhalers and nebulizers. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 9(2):404–13. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9045-9>.
- Booker R. 2005. Do patients think that dry powder inhalers can be used interchangeably? *International Journal of Clinical Practice* 59(149):30–32. <https://doi.org/10.1111/j.1368-504X.2005.00725.x>.
- Borgström L, Asking L, Thorsson L. 2005. Idealhalers or realhalers? a comparison of diskus and turbuhaler. *International Journal of Clinical Practice* 59(12):1488–95. <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2005.00747.x>.
- Chamseddin C, Jira T. 2011. Comparison of the chromatographic behavior of levofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin on various HPLC phases. *Pharmazie* 66(4):244–48. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.0314>.

- Chan JGY, Wong J, Zhou QT, Leung SSY, Chan HK. 2014. Advances in device and formulation technologies for pulmonary drug delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 15(4):882–97. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0114-y>.
- Chandel A, Goyal AK, Ghosh G, Rath G. 2019. Recent advances in aerosolised drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 112:108601. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108601>.
- Chimote G, Banerjee R. 2010. In vitro evaluation of inhalable isoniazid-loaded surfactant liposomes as an adjunct therapy in pulmonary tuberculosis. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 94(1):1–10. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31608>.
- Chougule MB, Padhi BK, Jinturkar KA, Misra A. 2007. Development of dry powder inhalers. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 1(1):11–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075871>.
- Chrystyn H. 2005. Do patients show the same level of adherence with all dry powder inhalers? *International Journal of Clinical Practice* 59(149):19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1368-504X.2005.00723.x>.
- Clerc S, Barenholz Y. 1995. Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1240(2):257–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541297>.
- Cortez-Jugo C, Qi A, Rajapaksa A, Friend JR, Yeo LY. 2015. Pulmonary monoclonal antibody delivery via a portable microfluidic nebulization platform. *Biomicrofluidics* 9(5):052603. <https://doi.org/10.1063/1.4917181>.
- Cózar-Bernal MJ, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. 2013. Development and validation of a high performance chromatographic method for determining sumatriptan in niosomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72:251–60. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.030>.
- Deng Q, Deng L, Miao Y, Guo X, Li Y. 2019. Particle deposition in the human lung: health implications of particulate matter from different sources. *Environmental Research* 169:237–45. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.014>.
- Deng Q, Ou C, Chen J, Xiang Y. 2018. Particle deposition in tracheobronchial airways of an infant, child and adult. *Science of the Total Environment* 612:339–46. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.240>.
- Desai TR, Hancock REW, Finlay WH. 2002. A facile method of delivery of liposomes by nebulization. *Journal of Controlled Release* 84(1–2):69–78. [195](https://doi.org/10.1016/S0168-</a></p></div><div data-bbox=)

3659(02)00264-X.

Eberle AL, Mikula S, Schalek R, Lichtman J, Knothe-Tate ML, Zeidler D. 2015. High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope. *Journal of Microscopy* 259(2):114–20. <https://doi.org/10.1111/jmi.12224>.

Elhissi AMA, Faizi M, Naji WF, Gill HS, Taylor KMG. 2007. Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. *International Journal of Pharmaceutics* 334(1–2):62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.022>.

Elhissi AMA, Giebultowicz J, Stec AA, Wroczynski P, Ahmed W, Alhnan MA, Phoenix D, Taylor KMG. 2012. Nebulization of ultradeformable liposomes: the influence of aerosolization mechanism and formulation excipients. *International Journal of Pharmaceutics* 436(1–2):519–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.064>.

Etzerodt A, Maniecki MB, Graversen JH, Møller HJ, Torchilin VP, Moestrup SK. 2012. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *Journal of Controlled Release* 160(1):72–80. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.01.034>.

Ferguson GT, Hickey AJ, Dwivedi S. 2018. Co-Suspension Delivery Technology in Pressurized Metered-Dose Inhalers for Multi-Drug Dosing in the Treatment of Respiratory Diseases. *Respiratory Medicine* 134:16-23. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.09.012>.

Friebel C, Steckel H. 2010. Single-use disposable dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(12):1359–72. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.538379>.

Frijlink HW, De Boer AH. 2004. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 1(1):67–86. <https://doi.org/10.1517/17425247.1.1.67>.

Garbuzenko OB, Winkler J, Tomassone MS, Minko T. 2014. Biodegradable Janus nanoparticles for local pulmonary delivery of hydrophilic and hydrophobic molecules to the lungs. *Langmuir* 30(43):12941–49. <https://doi.org/10.1021/la502144z>.

Garbuzenko OB, Mainelis G, Taratula O, Minko T. 2014. Inhalation treatment of lung cancer: the influence of composition, size and shape of nanocarriers on their lung accumulation and retention. *Cancer Biology & Medicine* 11(1):44–55. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.004>.

García-Contreras L, Ibrahim M, Verma R. 2015. Inhalation drug delivery devices: technology update. *Medical Devices: Evidence and Research* 8:131-9. <https://doi.org/10.2147/>

MDER.S48888.

Geller DE. 2005. Comparing clinical features of the nebulizer, metered-dose inhaler, and dry powder inhaler. *Respiratory Care* 50(10):1313–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185367>.

Geuns ERM, Toren JS, Barends DM, Bult A. 1997. Decrease of the stage-2 deposition in the twin impinger during storage of beclomethasone dipropionate dry powder inhalers in controlled and uncontrolled humidities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44(2):187–94. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00072-6).

Guagliardo R, Pérez-Gil J, De Smedt S, Raemdonck K. 2018. Pulmonary surfactant and drug delivery: focusing on the role of surfactant proteins. *Journal of Controlled Release* 291:116–26. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.10.012>.

Gunasekara L, Al-Saiedy M, Green F, Pratt R, Bjornson C, Yang A, Schoel WM. 2017. Pulmonary surfactant dysfunction in pediatric cystic fibrosis: mechanisms and reversal with a lipid-sequestering drug. *Journal of Cystic Fibrosis* 16(5):565–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.04.015>.

Haidl P, Heindl S, Siemon K, Bernacka M, Cloes RM. 2016. Inhalation device requirements for patients: inhalation maneuvers. *Respiratory Medicine* 118:65–75. <https://doi.org/10.1016/J.RMED.2016.07.013>.

Hasenpusch G, Pfeifer C, Aneja MK, Wagner K, Reinhardt D, Gilon M, Ohana P, Hochberg A, Rudolph C. 2011. Aerosolized BC-819 inhibits primary but not secondary lung cancer growth. *PLoS ONE* 6(6):e20760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020760>.

Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends in Microbiology* 17(3):130–38. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.003>.

Hertel SP, Winter G, Friess W. 2015. Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization. *Advanced Drug Delivery Reviews* 93:79-94. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.003>.

Hess DR, Faarc R. 2000. Nebulizers: principles and performance. *Respiratory care* 45(6):609–622. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.492.62&rep=rep1&type=pdf>.

Islam N, Gladki E. 2008. Dry powder inhalers (DPIs)—a review of device reliability and innovation. *International Journal of Pharmaceutics* 360(1–2):1–11. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.04.044>.

- Ivanova V, Garbuzenko OB, Reuhl KR, Reimer DC, Pozharov VP, Minko T. 2013. Inhalation treatment of pulmonary fibrosis by liposomal prostaglandin E2. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84(2):335–44. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.11.023>.
- Kadota K, Imanaka A, Shimazaki M, Takemiya T, Kubo K, Uchiyama H, Tozuka Y. 2018. Effects of inhalation procedure on particle behavior and deposition in the airways analyzed by numerical simulation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 90:44–50. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2017.11.008>.
- Kaminskas LM, McLeod VM, Ryan GM, Kelly BD, Haynes JM, Williamson M, Thienthong N, Owen DJ, Porter CJH. 2014. Pulmonary administration of a doxorubicin-conjugated dendrimer enhances drug exposure to lung metastases and improves cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 183:18–26. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.03.012>.
- Kaya A. 2018. Cascaded classifiers and stacking methods for classification of pulmonary nodule characteristics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 166:77–89. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2018.10.009>.
- Kurangi B, Jalalpure S, Jagwani S. 2019. A Validated stability-indicating hplc method for simultaneous estimation of resveratrol and piperine in cubosome and human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1122–1123:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.017>.
- Kuzmov A, Minko T. 2015. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung Diseases. *Journal of Controlled Release* 219:500–518. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.024>.
- Lavorini F, Pistolesi M, Usmani OS. 2017. Recent advances in capsule-based dry powder inhaler technology. *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 12(1):11. <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0092-5>.
- Lehofer B, Bloder F, Jain PP, Marsh LM, Leitinger G, Olschewski H, Leber R, Olschewski A, Prassl R. 2014. Impact of atomization technique on the stability and transport efficiency of nebulized liposomes harboring different surface characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88(3):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.10.009>.
- Liang Z, Ni R, Zhou J, Mao S. 2015. Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today* 20(3):380–89. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.020>.
- Lötvall J. 2001. Inhalation therapy of the future - how will it change the way we treat asthma? *Journal of Aerosol Medicine* 14(1):45–50. <https://doi.org/10.1089/08942680150506330>.

- Luczak-Wozniak K, Dabrowska M, Domagala I, Miszczuk M, Lubanski W, Leszczynski A, Krenke R. 2018. Mishandling of PMDI and DPI inhalers in asthma and copd – repetitive and non-repetitive errors. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 51:65–72. <https://doi.org/10.1016/J.PUPT.2018.06.002>.
- Melani AS. 2007. Inhalatory therapy training: a priority challenge for the physician *Acta Biomedica de l'Ateneo Parmense* 78(3):233–45.
- Miller NC, Marple VA, Schultz RK, Poon WS. 1992. Assessment of the Twin Impinger for size measurement of metered-dose inhaler sprays. *Pharmaceutical Research* 9(9):1123–1127. <https://doi.org/10.1023/A:1015835301929>.
- Minko T, Dharap S, Pakunlu R, Wang Y. 2004. Molecular targeting of drug delivery systems to cancer. *Current Drug Targets* 5(4):389–406. <https://doi.org/10.2174/1389450043345443>.
- Moortele TV, Goerke U, Wendt CH, Coletti F. 2019. Airway morphology and inspiratory flow features in the early stages of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Biomechanics* 66:60–65. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOMECH.2017.11.005>.
- Nanjwade BK, Adichwal SA, Gaikwad KR, Parikh KA, Manvi FV. 2011. Pulmonary drug delivery: novel pharmaceutical technologies breathe new life into the lungs. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 65(5):513–34. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.00704>.
- Onoue S, Misaka S, Kawabata Y, Yamada S. 2009. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease and viable formulation/device options for inhalation therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6(8):793–811. <https://doi.org/10.1517/17425240903089310>.
- Pandey R, Khuller GK. 2005. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(4):430–35. <https://doi.org/10.1093/jac/dki027>.
- Parmar JJ, Singh DJ, Hegde DD, Lohade AA, Soni PS, Samad A, Menon MD. 2010. Development and evaluation of inhalational liposomal system of budesonide for better management of asthma. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 72(4):442–48. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.73916>.
- Parra E, Pérez-Gil J. 2015. Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chemistry and Physics of Lipids* 185:153–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002>.
- Patil ML, Zhang M, Betigeri S, Taratula O, He H, Minko T. 2008. Surface-modified and internally



cationic polyamidoamine dendrimers for efficient siRNA delivery. *Bioconjugate Chemistry* 19(7):1396–1403. <https://doi.org/10.1021/bc8000722>.

Patil ML, Zhang M, Minko T. 2011. Multifunctional triblock nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the efficient intracellular SiRNA delivery and gene silencing. *ACS Nano* 5(3):1877–87. <https://doi.org/10.1021/nn102711d>.

Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C. 2004. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Research* 32(20): e159. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh153>.

Possmayer F, Hall SB, Haller T, Petersen NO, Zuo YY, Bernardino de la Serna J, Postle AD, Veldhuizen RAW, Orgeig S. 2010. Recent advances in alveolar biology: some new looks at the alveolar interface. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 173:S55-S54. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.02.014>.

Price D, Chrystyn H, Kaplan A, Williams AE. 2006. ABS34: could interchangeable use of dry powder inhaler compromise quality of care? an international study of physicians and pharmacists. *Primary Care Respiratory Journal* 15(3):194. <https://doi.org/10.1016/J.PCRJ.2006.04.133>.

Reis CP, Damgé C. 2012. Nanotechnology as a promising strategy for alternative routes of insulin delivery. *Methods in Enzymology* 508:271–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391860-4.00014-8>.

Rüegger CM, Bassler D. 2019. Alternatives to systemic postnatal corticosteroids: inhaled, nebulized and intratracheal. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 24(3):207-212. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.04.006>.

Sagalla RB, Smaldone GC. 2014. Capturing the efficiency of vibrating mesh nebulizers: minimizing upper airway deposition. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 27(5):341–48. <https://doi.org/10.1089/jamp.2014.1152>.

Sato T, Takami T, Saito H, Murakami Y. 2019. Thermosensitive polysaccharide particles for pulmonary drug delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 580:123720. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123720>.

Savla R, Minko T. 2013. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of fibrosis. *Journal of Drug Targeting* 21(10):914–25. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.829078>.

Shah V, Taratula O, Garbuzenko OB, Patil ML, Savla R, Zhang M, Minko T. 2013. Genotoxicity of different nanocarriers: possible modifications for the delivery of nucleic acids. *Current Drug Discovery Technologies* 10(1):8–15. <https://doi.org/10.2174/157016313804998870>.

- Sims MW. 2011. Aerosol therapy for obstructive lung diseases: device selection and practice management issues. *Chest* 140(3):781–88. <https://doi.org/10.1378/CHEST.10-2068>.
- Sologuren CN. 2009. Anatomía de la vía aérea. *Revista Chililena de Anestesia* 38:78–83. [http://www.sachile.cl/upfiles/revistas/4b44e59a28cd1\\_anatomia\\_via\\_aerea.pdf](http://www.sachile.cl/upfiles/revistas/4b44e59a28cd1_anatomia_via_aerea.pdf).
- Tang BC, Fu J, Watkins DN, Hanes J. 2010. Enhanced efficacy of local etoposide delivery by poly(ether-anhydride) particles against small cell lung cancer in vivo. *Biomaterials* 31(2):339–44. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.033>.
- Taratula O, Garbuzenko OB, Chen AM, Minko T. 2011. Innovative strategy for treatment of lung cancer: targeted nanotechnology-based inhalation co-delivery of anticancer drugs and SiRNA. *Journal of Drug Targeting* 19(10):900–914. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.622404>.
- Taratula O, Kuzmov A, Shah M, Garbuzenko OB. 2013. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and SiRNA. *Journal of Controlled Release* 171(3):349–57. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.04.018>.
- Tarique AA, Sly PD, Holt PG, Bosco A, Ware RS, Logan J, Bell SC, Wainwright CE, Fantino E. 2017. CFTR-dependent defect in alternatively-activated macrophages in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 16(4):475–82. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2017.03.011>.
- Terzano C. 2008. Dry powder inhalers and the risk of error. *Respiration* 75(1):14–15. <https://doi.org/10.1159/000111774>.
- Torge A, Wagner S, Chaves PS, Oliveira EG, Guterres SS, Pohlmann AR, Titz A, Schneider M, Beck RCR. 2017. Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics* 527(1–2):92–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.013>.
- Tronde A, Nordén B, Marchner H, Wendel AK, Lennernäs H, Bengtsson UH. 2003. Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92(6):1216–33. <https://doi.org/10.1002/jps.10386>.
- Upadhyay D, Scalia S, Vogel R, Wheate N, Salama RO, Young PM, Traini D, Chrzanowski W. 2012. Magnetised thermo responsive lipid vehicles for targeted and controlled lung drug delivery. *Pharmaceutical Research* 29(9):2456–67. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0774-9>.
- Vert M, Doi Y, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure*

and *Applied Chemistry* 84(2):377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.

Viridén A, Abrahmsén-Alami S, Wittgren B, Larsson A. 2011. Release of theophylline and carbamazepine from matrix tablets: consequences of HPMC chemical heterogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78:470–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.003>.

Wang Y, Kho K, Cheow WS, Hadinoto K. 2012. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid–polymer hybrid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 424(1–2):98–106. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2011.12.045>.

Waters V, Smyth A. 2015. Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. *Journal of Cystic Fibrosis* 14(5):551–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.02.005>.

Watts AB, Peters JI, Talbert RL, O'Donnell KP, Coalson JJ, Williams RO. 2011. Preclinical evaluation of tacrolimus colloidal dispersion for inhalation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77(2):207–15. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2010.11.013>.

Wehr- Carl T. 2010. Basic concepts and the control of separation. En Wiley J (Ed.), *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3):19-86. Nueva Jersey, EEUU: Wiley & sons.

Wiegand H, Meyer J, Kasper G. 2015. An electrical conductivity based method of determining the particle deposition rate in air-liquid interface devices. *Toxicology in Vitro* 29(5):1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.010>.

Williams RO, Carvalho TC, Peters JI. 2011. Influence of particle size on regional lung deposition - what evidence is there? *International Journal of Pharmaceutics* 406(1–2):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.040>.

Willis L, Hayes D, Mansour HM. 2012. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung* 190(3):251–62. <https://doi.org/10.1007/s00408-011-9360-x>.

Wilton N, Lee C, Doyle E. 2015. Developmental anatomy of the airway. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 16(12):611–15. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.09.008>.

Zhang X, Liu Q, Hu J, Xu L, Tan W. 2014. An aerosol formulation of r-salbutamol sulfate for pulmonary inhalation. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 4(1):79–85. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.010>.

Zununi VS, Salehi R, Davaran S, Sharifi S. 2017. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Materials Science and Engineering C* 71:1327–41. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073>.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

1. Actualmente, los tratamientos para la Fibrosis Quística se basan en el control de la sintomatología, siendo interesante en un futuro desarrollar fármacos que traten el defecto en el gen CFTR.
2. Entre los sistemas nanoparticulares existentes para la liberación de fármacos vía pulmonar para la FQ, la mayoría se componen de un único fármaco, y suelen ser antimicrobianos. Se propone en un futuro la coencapsulación de fármacos que permitan tratar de forma sinérgica otro tipo de sintomatología, así como los defectos en el gen CFTR.
3. Nuestros resultados sugieren que el método del gradiente transmembrana puede ser útil en la preparación de vesículas liposomales para cargar bases y ácidos débiles anfipáticos en liposomas preformados, pudiéndose describir las condiciones óptimas para el gradiente con acetato amónico.
4. Este método ha demostrado ser más eficaz para la encapsulación de bases y ácidos débiles que el método tradicional de elaboración empleado en nuestro grupo de investigación (TLE), ofreciendo resultados prometedores en términos de eficacia de encapsulación y propiedades fisicoquímicas de las formulaciones.
5. Se ha puesto a punto el dispositivo *Twin Impinger*, que simula las vías respiratorias, y nos ha ayudado a entender el comportamiento de nuestras formulaciones de ciprofloxacino y teofilina (en solución y en liposomas), empleando como medicamento control Salbutamol Sandoz<sup>®</sup> (comercial) y salbutamol nebulizado. Esto nos permitirá avanzar en la línea de investigación de las enfermedades pulmonares, concretamente en la fibrosis quística.
6. Tras comparar el inhalador presurizado comercial y el nebulizador (*Corineb*<sup>®</sup>) a través del *Twin Impinger*, se concluye que el dispositivo inhalador más útil, en este caso, es el nebulizador, dando resultados más interesantes que el inhalador presurizado MDI.
7. Los estudios de citotoxicidad sugieren que la encapsulación de los fármacos en los liposomas reduce la toxicidad de los fármacos libres. A las concentraciones empleadas, los fármacos y los propios fosfolípidos demostraron ser tóxicos. El aumento de la ratio fármaco/lípidos permitió mantener las eficacias de encapsulación y nebulización, si bien permitió la reducción de la toxicidad celular, mediante el aumento de la viabilidad celular de las formulaciones.