UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

DISEÑO RACIONAL DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS NANOMÉTRICOS
PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA

Tesista: Farm. Sebastian Scioli Montoto

Directora: Dra. María Esperanza Ruiz

Codirectores: Dr. Guillermo Raúl Castro | Dr. Guido Oscar Pesce

Año: 2021

A mis viejos

*Porque sin su apoyo
incondicional y enseñanzas
hoy no sería quien soy.*

A mi familia

*Por alentarme siempre a
hacer lo que me gusta y a
nunca bajar los brazos.*

A Sofi

*Por acompañarme por todo
este camino durante más de
13 años y estar siempre, en
las buenas y las malas. Hoy
no estaría completo si no
estuvieras.*

Agradecimientos

A mi jefa, directora y amiga. Por haberme tenido en cuenta para realizar este trabajo. Por haberme enseñado tanto y continuar haciéndolo. Por su paciencia y la confianza que ha puesto sobre mí. Mucho de lo que soy, profesionalmente, se lo debo a ella. A su maravillosa familia, Tati y Santi, por recibirme siempre con los brazos abiertos. Gracias Espe por estos años, espero que sigamos trabajando juntos por muchos más.

Al Dr. Guillermo Castro y el Dr. Guido Pesce, mis co-directores. Por la confianza puesta en mí y su apoyo durante estos años. Siempre terminaba la jornada habiendo aprendido algo con cada charla con ustedes.

A la Dra. Yamil Chain y Sebastián Cisneros, por las medidas por DLS. Al grupo de la Dra. Vera Alvarez, por su colaboración con las caracterizaciones fisicoquímicas, al Dr. Eduardo Prieto por su colaboración con las medidas por AFM.

A mis compañeros de la cátedra de Control de Calidad: Pablo, Esperanza, Claudia, Patricia, Susana, Analía y Luisina que vieron paso a paso mi camino y estuvieron ahí siempre que necesitaba una mano. Da gusto ir a trabajar con ustedes año a año. A Pachi, mi primer compañero de oficina, participe también de mi llegada al laboratorio. Por su gran ayuda en mis comienzos y por los buenos momentos que pasamos trabajando. A Julián y su familia, por su acompañamiento todo este tiempo, por sus charlas, sus consejos, y por compartir tantas anécdotas y tiempo conmigo.

A mis compañeros del LIDeB: Luis, Alan, Caro, Malala, Luciana, Lucas, Meli, Fede, Mauri, Juan, Pablo, Sofi, Andrea, Sara, María Luisa, Roque, Manu, Franco, Maxi, Giuli y Emi, con los cuales hemos pasado muy buenos momentos e innumerables cenas (sobre todo cuando el doc empezó a cocinar). Gracias a todos por haberme integrado a su grupo y hacerme sentir siempre como uno más de ustedes.

A mis compañeros del laboratorio de Nanobiomateriales: a German, quien fue guiándome en los comienzos y del cual aprendí mucho de lo que vuelco en esta

tesis. A Berni, Nacho, Maxi, Nehuen y Manu con los cuales pasamos muchas horas dentro del laboratorio, no solo haciendo síntesis, sino también catarsis. He descubierto un gran grupo humano con el que espero poder seguir colaborando por mucho tiempo.

A mis amigos de La Plata: Brunito por impulsarme a hacer el doctorado, a Mati, Copi, Gonza, Fede, Caro y Mati por el aguante durante los años de estudio en la carrera y por todo el aguante posterior.

A Facu, mi primer compañero de pensión y gran amigo en esta ciudad quien siempre me impulso a seguir con lo que me gusta hacer, con el cual hemos pasado de todo, desde juntar las encomiendas para comer unas milanesas napolitanas (no éramos muy exigente) hasta el día de hoy, que no juntamos encomiendas, porque ya no nos mandan. Has sido como un hermano mayor para mí. Orgulloso de vos y tus logros y de la hermosa familia que has formado junto a Sofi y Mati. Por muchos años más chango!

A mis amigos de Balcarce, Beto y Germán con los cuales he compartido casi toda mi vida y aunque a veces los aburría contándoles lo que hacía, siempre estaban para escuchar y apoyar. A Leo, Nacho, Ale, Martín, Santi, Maxi M, Maxi R, Maxi M, Joni, Agus, que por más que pasen los años, y ya no nos veamos tan seguido, seguimos teniendo la misma amistad que cuando éramos chicos.

A mis viejos, por darme la oportunidad de estudiar y nunca quejarse por más que a veces no pudieran darme todo lo que hubieran querido. Pero creo, sin duda, que más allá de los contratiempos, supieron darme lo más importante que podrían haberme dado: un futuro. A mis hermanos, Facu y Cami, que tuvieron que aguantarme como hermano mayor todos estos años. A mis abuelos: Abel, Marisa Coca y Aníbal, que me apoyaron siempre desde adolescente con mi idea loca de estudiar farmacia. A mis tíos y primos de Mar del Plata: Pablo, Fátima, Juan y Luli que siempre me esperan en su casa los veranos para comer asados y charlar hasta tarde. A mi tía y primos de España: María, Manu y Gonza, que si bien se fueron cuando empezaba la carrera, siempre estaban por teléfono o videollamada para charlar conmigo durante horas.

A Sofi, mi compañera de los últimos 13 años, con la que viví prácticamente toda mi carrera profesional y quien tuvo que soportar, y sigue soportando, todos mis estados de ánimo. Quien me fue apoyando en cada etapa o proyecto que me he planteado. Quien es mi soporte en la actualidad y sin la cual nada sería lo mismo. Por tu paciencia, por tu amor incondicional. Por mucho más juntos. Te amo.

Draco dormiens nunquam titillandus

Acrónimos

ABC	Cassette de unión a ATP (ATP-binding cassette)
ADD	Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivos (Anticonvulsant Drug Development)
AFM	Microscopía de fuerza atómica (Atomic force microscopy)
AJ	Uniones de adherencia (Adherens junctions)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ANAVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BCRP	Proteína de resistencia de cancer de mama (Breast cancer resistance protein)
BHE	Barrera hematoencefálica
CBZ	Carbamazepina
CM	Cuadrados medios
CV	Coeficiente de variación
CYP450	Citocromo P450 (Cytochrome P450)
DCC	Diseño central compuesto
DL	Carga de droga (Drug loading)
DLS	Dispersion dinámica de la luz (Dynamic light scattering)
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbeco (Dulbecco's modified eagle's medium)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential scanning calorimetry)
E.E	Error estándar

ED97	Dosis efectiva 97
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de encapsulación (Entrapment efficiency)
F.V	Fuente de variación
FACs	Fármacos anticonvulsivos
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
G.L	Grados de libertad
GABA	Ácido gamma amino butírico
GP	Uniones de hendidura (Gap junctions)
GTCC-LQ	Triglicéridos de ácido caprílico/cáprico
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography)
IBE	Bureau Internacional para la Epilepsia (International Bureau for Epilepsy)
IC	Índice de cristalinidad
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia (International League against Epilepsy)
ip	Intraperitoneal
JAM	Moléculas de adhesión de unión (Junctional adhesion molecules)
LI	Límite inferior
LS	Límite superior
MDCK-MDR1	Células de riñón canino (Madin-Darby canine kidney cells) transfectadas con el gen MDR1 humano
MDR	Resistencia múltiple a fármacos (Multidrug resistance)
MES	Convulsiones máximas por electrochoque (Maximal electroshock seizure)

MM	Miristil miristato (Myristyl myristate)
MPS	Sistema fagocítico mononuclear (Mononuclear phagocyte system)
NBD	Dominios de union a nucleotido (Nucleotide-binding domains)
NCS	Sistema de clasificación nanotoxicológica (Nanotoxicological classification system)
NF	Formulario Nacional (National Formulary)
NIH	Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health)
NINDS	Instituto Nacional de Desórdenes y Ataques Neurológicos y de la Comunicación. (National Institute of Neurological Disorders and Stroke)
NLC	Vehículos nanoestructurados (Nanostructured lipid carriers)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Fenobarbital (Phenobarbital)
PDI	Índice de polidispersión (polydispersity index)
PDE	Exposición diaria permitida (Permitted daily exposure)
PEG	Polietilenglicol
Pgp	Glicoproteína P
PTZ	Pentilentetrazol
RSM	Metodología de superficie de respuesta (Response Surface Methodology)
SASX	Metodología de difracción de rayos X de ángulo bajos (Small angle x-ray scattering)
SC	Suma de cuadrados
SCB	Sistema de clasificación biofarmacéutica
SF	Solución Fisiológica

SLC	Vehículos de soluto (Solute carriers)
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas (Solid lipid nanoparticles)
SNC	Sistema nervioso central
SS	Estearil estearato (Stearyl stearate)
SV2A	Glucoproteína 2A de vesícula sináptica
TEM	Transmission electron microscopy
TGA	Análisis termogravimétrico (Thermogravimetric analysis)
TJ	Uniones estrechas (Tight junctions)
TMDs	Dominios transmembrana (Transmembrane domains)
UNLP	Universidad Nacional de La Plata
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopoeia)
WAXS	Metodología de difracción de rayos X de ángulos amplios. (Wide angle x-ray scattering)
XRD	Difracción de rayos X (X-ray diffraction)
ZO	Zonulae occludens
Z-pot	Potencial Z

Índice

1	CAPÍTULO 1.....	1
1.1	LA EPILEPSIA HOY	9
1.2	EPILEPSIA REFRACTARIA	16
1.3	LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	17
1.4	HIPÓTESIS SOBRE LOS MECANISMOS GENERADORES DE LA REFRACTARIEDAD ..	24
1.5	NANOVEHÍCULOS FARMACÉUTICOS	28
1.6	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
1.7	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	41
2	CAPÍTULO 2.....	49
2.1	MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1.1	<i>Cuantificación de CBZ en las formulaciones.....</i>	<i>53</i>
2.1.2	<i>Preparación de nanosistemas lipídicos de CBZ.....</i>	<i>54</i>
2.1.3	<i>Caracterización fisicoquímica.....</i>	<i>57</i>
2.1.4	<i>Ensayos de liberación in-vitro</i>	<i>60</i>
2.1.5	<i>Estudios de permeabilidad a través de monocapa celular.....</i>	<i>65</i>
2.1.6	<i>Estudios de estabilidad.....</i>	<i>67</i>
2.1.7	<i>Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones.....</i>	<i>67</i>
2.1.8	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>69</i>
2.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
2.2.1	<i>Validación del método analítico.....</i>	<i>70</i>
2.2.2	<i>Preparación y eficiencia de encapsulación de las formulaciones.....</i>	<i>71</i>
2.2.3	<i>Caracterización de las nanopartículas por DLS, DSC, TGA y XRD</i>	<i>73</i>
2.2.4	<i>Estudios de liberación in vitro</i>	<i>82</i>
2.2.5	<i>Estudios de permeabilidad a través de monocapa celular.....</i>	<i>85</i>
2.2.6	<i>Estudios de estabilidad.....</i>	<i>87</i>
2.2.7	<i>Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones.....</i>	<i>88</i>

2.3	CONCLUSIONES	91
2.4	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	95
3	CAPÍTULO 3.....	101
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.1.2	<i>Diseño, optimización racional y preparación de los nanosistemas</i>	<i>105</i>
3.1.1	<i>Caracterización fisicoquímica</i>	<i>117</i>
3.1.2	<i>Ensayos de liberación in-vitro</i>	<i>119</i>
3.1.3	<i>Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones.....</i>	<i>120</i>
3.1.4	<i>Estudios de estabilidad.....</i>	<i>122</i>
3.1.5	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>123</i>
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	124
3.2.1	<i>Diseño, optimización racional y preparación de los nanosistemas</i>	<i>124</i>
3.2.2	<i>Caracterización fisicoquímica</i>	<i>133</i>
3.2.3	<i>Ensayos de liberación in vitro</i>	<i>148</i>
3.2.4	<i>Evaluación de la actividad anticonvulsiva</i>	<i>151</i>
3.2.5	<i>Estudios de estabilidad.....</i>	<i>153</i>
3.3	CONCLUSIONES	154
3.4	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	158
4	CONCLUSIONES.....	167
5	ANEXOS.....	177

Capítulo 1

La epilepsia

Cuando hablamos de epilepsia, nos estamos refiriendo a una de las patologías más antiguas que pudieran documentarse durante la historia de la humanidad. Las primeras descripciones fueron encontradas en tablillas con símbolos cuneiformes, que se calcula fueron talladas entre los años 1067 y 1046 a.C. en la antigua Babilonia. Se trataba de un total de 40 tablillas, dos de las cuales describían exclusivamente a la epilepsia. Esta enfermedad ya era conocida como *antasubba* en Sumerio y significaba la “enfermedad de las caídas” o como *miqtu* en acadio antiguo. Para los médicos y sus discípulos, era claro que las manifestaciones de la epilepsia eran trabajo de demonios y espíritus, de carácter principalmente maligno. Asociado a los demonios surgía el concepto de posesión. Estas posesiones comenzaban con el aura¹,

¹ Se considera aura a una crisis parcial simple que todavía no ha llegado a desarrollarse. Puede tratarse de alucinaciones visuales, olfatorias o auditivas.

continuaban con la caída del sujeto y terminaba con la fase tónica² de la convulsión, siendo la etapa clónica³ la liberación y el comienzo de la salida del demonio del cuerpo. Al final de este periodo el demonio “dejaba ir (al paciente)” mientras que el hecho de que éste “miraba a la persona que lo estaba sosteniendo”, era un signo de que el paciente se encontraba ya completamente consciente (Reynolds, 1990).

La epilepsia también se encuentra nombrada en el Código Hammurabi, bajo la denominación *bennu*. Este código constituía una serie de leyes creadas por el rey Hammurabi de Babilonia donde podía encontrarse lo siguiente: “*Si un hombre compra un esclavo o una esclava y, antes de que haya pasado un mes, le da un sólo ataque de epilepsia, que lo devuelva al que se lo vendió, y el comprador recuperará el dinero pagado*” (Peinado, 2008).

Los tratamientos en ese entonces, y en concordancia con el carácter sobrenatural que se le daba a la patología, eran, más que nada, espirituales. En el *sakikku*⁴, también pueden encontrarse descriptos distintos tipos de epilepsia (conocidas hoy en día) asociadas a diversos demonios o espíritus. Iqīšâ, por ejemplo, quien fuera un estudiante de la escuela de Uruk (antigua ciudad que florecía en lo que hoy es Irak) a finales del siglo IV a.C., establecía que ante un ataque epiléptico era aconsejable hacer un sacrificio humano (Geller, 2010). Por fortuna, este tipo de tratamientos no son comunes hoy en día.

Otra importante civilización, la griega, también era conocedora de la epilepsia. Sin embargo, este conocimiento debería dividirse en la época pre-hipocrática y el período hipocrático, donde se da un cambio de paradigma. Durante la era anterior

² Rigidez del tronco y las extremidades.

³ Contracción y relajación rápida e incontrolable de los músculos que derivan en una convulsión.

⁴ *Sakikku* corresponde al nombre dado a las tablas N° 25 y 26 de una obra *Acadia* datadas entre los años 1067 y 1046 a.C (Reynolds, 1990).

a Hipócrates, y al igual que los antiguos babilonios, los griegos consideraban a la epilepsia algo sobrenatural, en sincronía con el pensamiento mágico-religioso de la época. Consideraban a la epilepsia como castigo de un dios o un ente maligno y el único tratamiento era, por lo tanto, el exorcismo y las plegarias. Creían que sólo un dios era lo suficientemente poderoso como para poder tirar un hombre al suelo y privarlo de sus sentidos, provocarle convulsiones y restaurarlo sin siquiera una secuela evidente. Por este motivo, a la epilepsia se la conocía como “*la santa enfermedad*” (Eadie, 1995).

Alrededor del año 400 a.C., Hipócrates y sus discípulos desarrollan el libro “*La Enfermedad Sagrada*” donde se pone en tela de juicio el carácter santo de la enfermedad para dar paso a un análisis más “científico”. Es en este manuscrito donde se detalla la epilepsia y se describen las diferentes características de los ataques convulsivos: el aura, la asfixia, espuma saliendo de la boca, la atrición de los dientes, los movimientos de las manos y la pérdida de la conciencia, entre otros.

Para Hipócrates, la epilepsia no era debida a dioses o espíritus, sino más bien, al desequilibrio de los humores. Él decía:

“Discuto sobre la enfermedad llamada “sagrada”. Esta no es, en mi opinión, ni más divina, ni más sagrada que cualquier otra enfermedad, pero tiene una causa natural. Este origen, como el de cualquier otra enfermedad, recae en la herencia. El hecho es que la causa de esta afección está en el cerebro. Mi propio punto de vista es que quienes inicialmente le atribuyeron el carácter de sagrado a este mal fueron los mágicos, purificadores, charlatanes de nuestro propio día, hombres que demandan piedad y un conocimiento superior. Sintiendo una pérdida, o no teniendo tratamiento para ayudar, ellos se encubren y se refugian en la

superstición, y llaman a esta enfermedad sagrada a fin de que su absoluta ignorancia no sea manifiesta” (Jones et al., 1923).

Como puede verse, la epilepsia era considerada hereditaria y su causa radicaba en el cerebro, un cerebro rebosante de flema⁵: cuando la flema llegaba al torrente sanguíneo, provocaba todos los síntomas de una convulsión. Por tal motivo, la epilepsia era tratada con dieta y “medicamentos” más que con magia (Todman, 2008). Todo el conocimiento que se tenía sobre la epilepsia fue volcado en el *Corpus Hipocraticum* y desde entonces se comienza a diferenciar a la histeria de la epilepsia.

En contraposición a las teorías hipocráticas, los romanos consideraban a la epilepsia como una enfermedad impura y, además, contagiosa. Sin embargo, con la aparición de Galeno (griego discípulo de dos seguidores de Hipócrates: Estraconio y Sático) en el Imperio Romano, el concepto de epilepsia volvió a tomar el cauce científico dado por Hipócrates, con una definición más detallada de la misma donde se explicaba que la convulsión, por ejemplo, no se daba sólo en el cuerpo, sino que, de igual manera, podía haber una interrupción de las funciones superiores (Pierce, 2002).

Durante la edad media todo vuelve a dar un paso hacia atrás dada la influencia religiosa de aquellos tiempos, que llevó a la medicina a un mayor oscurantismo. No solo se retomó la idea de que la patología era debida al demonio, sino que también se consideraba contagiosa. Es por esto, que los enfermos eran reclusos

⁵ La flema era uno de los humores que formaban parte de la Teoría de los 4 humores. Esta teoría fue la más aceptada desde Hipócrates hasta los médicos de principios del siglo XIX. En ella se establecía que los humanos estaban formados por 4 humores (líquidos) principales: bilis negra, bilis, flema y sangre. Cuando un paciente sufría un desequilibrio de líquidos, tanto su personalidad como su salud se veían afectadas. Por este motivo, prácticas comunes eran el sangrado o el calor.

socialmente, considerados una deshonra para la familia y posibles focos de contagio.

La creencia de que la enfermedad era causada por el diablo surge del Nuevo Testamento. En San Lucas 9:37-43 puede leerse:

“Al día siguiente, cuando bajaron del cerro, una gran multitud salió al encuentro de Jesús. Y un hombre de entre la gente le dijo con voz fuerte: —Maestro, por favor, mira a mi hijo, que es el único que tengo; un espíritu lo agarra, y hace que grite y que le den ataques y que eche espuma por la boca. Lo maltrata y no lo quiere soltar. He rogado a tus discípulos que le saquen ese espíritu, pero no han podido. Jesús contestó: —¡Oh gente sin fe y perversa! ¿Hasta cuándo tendré que estar con ustedes y soportarlos? Trae acá a tu hijo. Cuando el muchacho se acercaba, el demonio lo tiró al suelo e hizo que le diera otro ataque; pero Jesús reprendió al espíritu impuro, sanó al muchacho y se lo devolvió a su padre. Y todos se quedaron admirados de la grandeza de Dios

Y el mismo relato puede leerse en San Marcos 9:14-29. A medida que el cristianismo iba ganando lugar en el mundo y, sobre todo, en las civilizaciones occidentales, la idea de la epilepsia como enfermedad ligada a entes oscuros se afirmaba con mayor presteza. Los tratamientos, al igual que en la época prehipocrática, volvían a ser espirituales, acudiendo a oraciones y exorcismos para tratar de eliminar la enfermedad.

Luego de la edad media, durante el Renacimiento, comenzó a desarrollarse una nueva interpretación de la epilepsia de la mano del filósofo peripatético Paracelso (1493 – 1541). Él interpretaba todos los eventos y objetos a través de analogías entre el mundo natural (que denominaba el macrocosmos) y el cuerpo humano y animal (el microcosmos). Decía que “Dios, en su benevolencia, había dado curas químicas para todas las enfermedades, dejándolas para que el hombre las

descubriera” (Mora, 1967). Creía que existía un espíritu viviente en cada criatura, y en toda la creación, y consideraba a la epilepsia como consecuencia de una repentina ebullición de dicho espíritu en el cerebro del enfermo:

“... ninguna criatura viviente puede existir sin el spiritus vitae, que es la fuerza viviente de todas las cosas, como hemos dicho en De Spiritus Vitae, ni hay vida posible sin alimento. Ya que todo lo que está vivo puede ser afectado por esta enfermedad, la misma debe estar en cierta comida. Cuando esta comida es mezclada con el spiritus vitae, el problema se presenta. Esta es una de las causas de la enfermedad. La ebullición de los vapores en el spiritus vitae, más no en otros humores que están presentes en el cuerpo, es otra causa. Si el spiritus vitae es desplazado de su posición correcta, hierbe y efervesce, y sucede tan rápido que la memoria y la razón son destruidas. Esta ebullición puede compararse con un terremoto, que hace temblar toda la tierra. Los terremotos y la enfermedad de las caídas tienen la misma causa.” (Eadie, 1995).

Paracelso continuó con la creencia, acertada, de que la epilepsia se localizaba en el cerebro, y sus teorías fueron la salida de 2000 años de asumir que la patología era debida a un desequilibrio en los humores del cuerpo y a una obstrucción ventricular. Para él, la epilepsia era un repentino evento fisicoquímico dinámico, curable en términos químicos. En su libro “*Los desórdenes que privan al hombre de su razón*”, describe un aceite vitriólico verde:

“...Ahora que se sepa que este aceite, ya sea verde o blanco (pero verde es mejor), si es circulado y mezclado con la corrección, que ha sido descripta en el Spiritus Vitroli, hará más allá de la duda una perfecta medicina contra la enfermedad de las caídas en todas sus formas.” (Zilboorg and Henry, 1941).

Thomas Willis (1621 – 1675), discípulo de Paracelso, fue un científico inglés muy importante durante la revolución del siglo XVII que refinó y moderó las ideas de

Paracelso llegando a teorizar que la patogénesis de la epilepsia era debida a una “explosión” dentro del cerebro (Willis and Loggan, 1681). Cien años más tarde, el médico James Clowes Prichard (1786 – 1848) propuso que el mecanismo de las convulsiones epilépticas dependía o eran debidas a la congestión cerebral (Prichard, 1822). Esta interpretación, si bien era menos detallada que la de Willis, resultaba ser menos controversial.

Más tarde, alrededor del año 1830, Marshall Hall (1790 – 1857) introdujo la idea de la actividad refleja, es decir, respuestas involuntarias a estímulos (Hall, 2017). Sugería que el aumento de la actividad del lado aferente del arco reflejo producía lo que él llamaba “epilepsia excéntrica”, que el aumento en la actividad dentro de la médula espinal producía la “epilepsia céntrica”, y que el aumento en la actividad de la rama eferente del arco causaba *ticks* en el sujeto. Esta teoría cambió el paradigma de una epilepsia originada en el cerebro, para pasar a una epilepsia cuyo origen se encontraba en la médula espinal (Hall, 1836).

No fue sino hasta mediados del siglo XIX que John Hughlings Jackson (1835 – 1911) abandona la teoría de la actividad refleja como causante de la epilepsia para establecer que el origen de las convulsiones debía ser la corteza cerebral (York and Steinberg, 2007). Él afirmaba que las convulsiones no eran más que un síntoma, e implicaban la existencia de una descarga ocasional, excesiva y desordenada desde el tejido nervioso hacia los músculos. Es llamativo que haya usado, específicamente, la palabra “descarga”, cuando aún no se conocía la naturaleza eléctrica del sistema nervioso.

Por otro lado, en 1857, un par de años antes de que Jackson iniciara sus investigaciones se describe por primera vez el primer tratamiento efectivo para la epilepsia. Fue el obstetra de la reina Victoria, *Sir* Charles Locock (1799 – 1875), quien menciona haber tratado una numerosa cantidad de mujeres que sufrían

“histeria” con bromuro de potasio, tratamiento que había sido particularmente efectivo en una mujer que sufría lo que se denominaba “epilepsia histérica”. Cabe aclarar que Locock comenzó a utilizar el bromuro de potasio a partir de un reporte donde se mencionaba a la impotencia sexual reversible como un efecto adverso de dicho compuesto en pacientes masculinos. Sobre esta base es que comienza a usar la droga en mujeres con histeria y con epilepsia histérica (Rho and White, 2018). Sin embargo, quizás el primer uso del bromuro de potasio haya sido a través del médico londinense *Sir Samuel Wilks* (1824 – 1911). Él mismo comenta lo siguiente:

*“Fue mientras examinaba los efectos de varios remedios que descubrí el valor superior del bromuro de potasio. Me encontraba en esa ocasión probando este remedio, en vez del yoduro, en casos de broncocele⁶ y otros desórdenes, y siendo un hábito el uso del yoduro en epilepsia, lo sustituí primero por bromuro. Al principio tenía la impresión de que el bromuro estaba actuando como un absorbente, y por lo tanto estaba sacando para su uso a aquellos casos donde la enfermedad tenía un origen sifilítico o local: pero cuando las curas llegaron en número, la explicación no aplicaría, y fue evidente que un remedio específico y valioso había sido obtenido. Varios autores han mencionado a la droga junto con muchas más, pero sólo para volver a dejarla en los estantes. No estaba al tanto en ese momento que *Sir C. Locock* había recomendado su uso, pero no parece que lo haya presentado ante los colegas, y mucho menos que fuera confirmado por otros.”* (Scott, 1993)

Es a partir de aquí que el descubrimiento de nuevos fármacos antiepilépticos comienza a crecer de manera exponencial. En 1912, el médico alemán Hauptmann

⁶ Se denomina broncocele a un segmento de los bronquios lleno de moco y completamente cerrado, de manera que el moco es incapaz de ser drenado.

(1881 – 1948) descubre al fenobarbital como nuevo fármaco antiepiléptico, el cual fue comercializado por la compañía Bayer con la marca Luminal®, que persiste en el mercado hasta la actualidad. Más tarde, en 1938, surge la fenitoína como nueva droga. Aunque ya era conocida desde 1908, no había despertado un interés particular dado que no contaba con efectos sedativos, y no fue sino hasta que los neurólogos Merritt (1902 – 1979) y Putnam (1894 -1975) descubrieran sus propiedades anticonvulsivantes y sus efectos sobre el control de los ataques epilépticos (Glazko, 1986) que comenzó a usarse con tales fines.

Luego, surgieron fármacos como carbamazepina (1953), primidona (1954), etosuximida (1958), valproato de sodio (1963), clobazam (1970), clonazepam (1970), zonisamida (1989), vigabatrina (1989), lamotrigina (1990), oxcarbazepina (1990), gabapentina (1993), felbamato (1993), topiramato (1995), tiagabina (1998), levetiracetam (2000), stiripentol (2002), pregabalina (2004), rufinamida (2004), lacosamida (2008), eslicarbazepina (2009), perampanel (2012) y brivaracetam (2016), entre otros, que en conjunto forman la batería de fármacos utilizados en la terapéutica anticonvulsiva actual (Park et al., 2019). Cabe destacar que el avance tecnológico, en especial de la industria de las computadoras, permitió potenciar significativamente el descubrimiento de fármacos, haciendo uso de técnicas computacionales tales como *screening* virtual y *docking*, llegando al desarrollo de inteligencias artificiales (Enrique et al., 2019; Di Ianni et al., 2015; Palestro et al., 2014).

1.1 La epilepsia hoy

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reporte del año 2019, define a la epilepsia como “una enfermedad neurológica crónica no transmisible que afecta a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo”, siendo entonces

una de las enfermedades neurológicas con mayor prevalencia, incluso por encima de la enfermedad de Parkinson (World Health Organization, 2019). Como se mencionó anteriormente, existe una batería de fármacos para tratar las convulsiones epilépticas, llegando a tener efectividad en alrededor del 70% de los casos tratados (Janson and Bainbridge, 2020) (ver sección 1.2).

Definición

El término convulsión o ataque convulsivo se refiere a una actividad neuronal anormal, ya sea porque ésta es excesiva o desincronizada, que deriva en la aparición transitoria de signos o síntomas característicos. Por otro lado, el término epilepsia se refiere a un desorden en la función cerebral, caracterizado por la aparición periódica e impredecible de convulsiones (Fisher et al., 2014).

En este punto cabe remarcar que, del total de personas afectadas por esta patología, el 80% provienen de países de bajos y medianos recursos donde las tasas de prevalencia son mayores (y las de efectividad, menores) a las de los países de altos ingresos. Estas diferencias pueden deberse a factores endémicos (infecciones como la malaria (Carrizosa Moog et al., 2017) o neurocisticercosis (Moyano et al., 2014) que pueden generar cuadros convulsivos), mayor incidencia de accidentes (Ding et al., 2017) (con traumatismos con epilepsia como secuela), o más probablemente, a la falta de adherencia a los tratamientos y/o de acceso a los sistemas de salud, ya sea por ausencia de políticas públicas que se enfoquen en la atención temprana de los casos o por cuestiones de índole económica de los propios pacientes (Birbeck, 2010). La Liga Internacional contra la Epilepsia⁷ (ILAE, por

⁷ *Institución sin fines de lucro, creada en 1909, cuya misión es garantizar que los profesionales de la salud, pacientes, gobiernos y público en general tengan los recursos educativos y para investigación que son esenciales para comprender, diagnosticar y tratar a las personas con epilepsia.*

sus siglas en inglés) explica clínicamente a la epilepsia, en su informe del año 2014, como una enfermedad cerebral definida por cualquiera de las siguientes condiciones:

1. Al menos dos convulsiones no provocadas (o reflejas) que ocurren en un período mayor a las 24 hs.
2. Una convulsión no provocada (o refleja) y una probabilidad de sufrir ataques adicionales similar al riesgo general de recurrencia (al menos 60%) luego de dos convulsiones no provocadas, que puedan ocurrir en los próximos 10 años.
3. Diagnóstico de un síndrome epiléptico.

En este mismo informe, se establece el término “resuelto” para referirse al hecho de que un paciente ya no sufre de ataques convulsivos recurrentes, sin que esto signifique una garantía de que no puedan volver a ocurrir en el futuro. En este sentido, la epilepsia es considerada “resuelta” para aquellos individuos que presentaban un síndrome epiléptico dependiente de la edad pero que hayan pasado la etapa de aplicabilidad⁸, o para aquellos que han permanecido libres de convulsiones por los últimos 10 años, sin medicamentos anticonvulsivos por los últimos 5 años (Fisher et al., 2014).

Durante muchos años la epilepsia fue considerada un “desorden”, ya que de esa manera podían agruparse muchas enfermedades y condiciones dentro de un solo término (Fisher et al., 2005). Sin embargo, la palabra “desorden” implica una alteración funcional que no necesariamente debe ser duradera. Por otro lado, el término “enfermedad” hace referencia a un trastorno de las funciones fisiológicas

⁸ La etapa de aplicabilidad se encuentra referida a aquellos síndromes epilépticos que suelen resolverse a una edad determinada, como por ejemplo la epilepsia benigna con puntas centrotemporales (o rolándicas), la cual es generalmente superada entre los 16 y 21 años.

normales más prevaleciente. Es por este motivo que la ILAE junto con el *Bureau International para la Epilepsia* (IBE, por sus siglas en inglés), han acordado que la epilepsia sea considerada o definida como una enfermedad.

Tratamientos

Los tratamientos para pacientes epilépticos suelen ser multimodales, debido a que pueden ser tratadas: (1) con foco en aquellas condiciones que subyacen a las causas o contribuyen a los ataques convulsivos; (2) al evitar los factores que desencadenan una crisis; (3) mediante el empleo de terapias profilácticas destinadas a la supresión de las convulsiones recurrentes (*i.e.*, con el uso de fármacos anticonvulsivos o con cirugías); (4) a través de tratamientos en materia psicológica y social. De cualquier manera, cada terapia será propia de cada individuo en particular, dependiendo del tipo de epilepsia que padezca (Lowenstein, 2018).

Terapia farmacológica

Para la mayoría de las personas que sufren epilepsia, los tratamientos con fármacos anticonvulsivos (FACs) suelen ser la forma más efectiva de contrarrestar la patología. El objetivo principal de la terapia con FACs es asegurar la mejor calidad de vida posible para el paciente, maximizando el control de las crisis y, a su vez, minimizando la toxicidad o efectos adversos de las drogas administradas (Perucca et al., 2018). La terapia comienza una vez que se ha hecho un diagnóstico apropiado al paciente, es decir, que no sólo se ha diagnosticado, sino que también se ha establecido el tipo de epilepsia y, en caso de ser posible, el síndrome epiléptico.

Cabe destacar, sin embargo, que a pesar de los más de 25 FACs que existen hoy en día, la efectividad de los mismos no suele superar el 66%, porcentaje que, como se comentó anteriormente, es aún menor en los países de bajos a medianos ingresos (Thijs et al., 2019).

Los mecanismos de acción de los FACs de primera y segunda generación pueden agruparse en 7 categorías (White et al., 2007):

1. Fármacos que limitan la descarga sostenida y repetitiva de neuronas, efecto que se logra mediante la promoción del estado inactivo de los canales de Na^+ voltaje operados. En este grupo se encuentran la fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, oxcarbazepina, topiramato, ácido valproico y zonisamida.
2. Fármacos que inhiben canales de Ca^{2+} voltaje operados responsables de las corrientes de Ca^{2+} tipo T. Aquí podemos encontrar a la etosuximida, ácido valproico, gabapentina, lamotrigina, topiramato, zonisamida, levetiracetam, pregabalina y felbamato.
3. Fármacos que modulan de manera alostérica el receptor de *ácido gamma aminobutírico* (GABA): benzodiazepinas, fenobarbital, felbamato, topiramato y zonisamida
4. Fármacos inhibidores del metabolismo y la recaptación de GABA, como el ácido valproico y la tiagabina.
5. Fármacos que inhiben el receptor de *N-metil-D-aspartato* (NMDA), receptor que interacciona con el neurotransmisor glutamato, y permite el influjo de calcio dentro de la neurona, como el felbamato.
6. Fármacos antagonistas del receptor del *ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico* (AMPA), como el fenobarbital y el topiramato.

7. Fármacos que se unen a las proteínas 2A de las vesículas sinápticas (SV2A), como el levetiracetam.

Tratamiento quirúrgico

La cirugía, en los casos de epilepsia, implica la resección, desconexión o destrucción del tejido epileptogénico, y es la terapia más efectiva para algunos pacientes seleccionados que presentan epilepsia resistente a fármacos (Perucca et al., 2018). El balance riesgo-beneficio en cuanto a las cirugías implica, no solo el análisis de los riesgos asociados, sino también expectativas realistas.

Neuroestimulación

Las técnicas neuroestimuladoras son opciones paliativas cuando la cirugía no es posible o cuando ésta falla. Son metodologías que utilizan pulsos eléctricos aplicados a los nervios periféricos o a zonas específicas del cerebro para contrarrestar la generación o propagación de un potencial ataque. Los pulsos pueden ser entregados de manera programada (*loop* abierto) o como respuesta a un ataque (*loop* cerrado (Starnes et al., 2019)).

Dieta cetogénica

Bajo esta denominación general se incluye a la dieta cetogénica clásica y a la dieta modificada de Atkins. En cualquier caso, el tratamiento consiste en una dieta alta en lípidos, con adecuada cantidad de proteínas y baja en carbohidratos, con el objetivo de utilizar las grasas como combustible para las células, a través de la producción de cuerpos cetónicos. Estas dietas, originalmente diseñadas para el tratamiento del síndrome de deficiencia del transportador tipo 1 de glucosa y deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa, han probado ser efectivas para

el tratamiento de las epilepsia infantiles resistentes a fármacos (Weijenberg et al., 2018).

Implicancias socio-económicas de la epilepsia

Las consecuencias físicas, psíquicas y sociales de la epilepsia significan una gran carga para las personas que viven en estas condiciones, así como también para sus familias. Como se comentara anteriormente, alrededor del mundo las personas con epilepsia y sus familias sufren de discriminación y son estigmatizados, y a menudo enfrentan grandes dificultades en el ámbito social, educativo y laboral (Kroner et al., 2016). Y aún más, se espera que con el aumento de la expectativa de vida mundial y la tasa de supervivencia de personas que han sufrido algún tipo de traumatismo (como por ejemplo lesiones cerebrales traumáticas, infecciones cerebrales o accidente cerebrovascular, entre otros), el número de casos con esta patología se vea incrementado proporcionalmente (World Health Organization, 2019).

La problemática de la epilepsia a nivel social y económico en Argentina derivó en la aprobación de la Ley 25.404 en el año 2001, la cual garantiza a todas las personas que padecen epilepsia el pleno ejercicio de sus derechos, proscribire todo acto de discriminación y dispone medidas especiales de protección. A partir de esta ley, la epilepsia deja de ser considerada un impedimento para la postulación, el ingreso y desempeño laboral, al mismo tiempo que se establece el derecho de los pacientes a acceder a la educación en sus distintos niveles sin limitación alguna debido a su enfermedad. Por último, pero no menos importante, se le otorga el derecho al paciente epiléptico a recibir asistencia médica integral y oportuna (Argentina, 2001). Esta ley fue reglamentada en el año 2009, a través del decreto 53/2009 (Argentina, 2009), el cual le dio un marco regulatorio y posibilitó la aplicación de la ley en todos los ámbitos que ésta abarcaba.

1.2 Epilepsia refractaria

Durante el tratamiento con diferentes fármacos anticonvulsivos, entre el 20 - 40% de los pacientes con epilepsia tratados no consiguen la remisión a largo plazo, es decir, continúan sufriendo convulsiones recurrentes, lo que se conoce como *farmacorresistencia* o *epilepsia refractaria*. Las consecuencias de este tipo de epilepsia pueden ser bastante severas, llegando a tasas de mortalidad entre 4 a 7 veces más grandes respecto a los no resistentes (Schmidt and Löscher, 2005).

En el año 2010 la ILAE generó un reporte de consenso entre diversos profesionales entre los que se encontraban epidemiólogos, epileptólogos, neurocirujanos, farmacéuticos y médicos especialistas en ensayos clínicos, donde se propuso la siguiente definición formal de la epilepsia refractaria:

“La epilepsia farmacorresistente puede ser definida como la falla de dos programas de FACs bien tolerados, apropiadamente elegidos y usados (ya sea como monoterapias o en combinación) para lograr una atenuación de crisis convulsivas sostenida, es decir, que el paciente quede libre de crisis”.

Adicionalmente, el reporte establece que la capacidad de respuesta que presentan los pacientes con epilepsia a un fármaco determinado debería ser tomada como un proceso dinámico más que como un estado preestablecido. En éste sentido, la clasificación de un paciente epiléptico como paciente *resistente* a la terapia medicamentosa, en un momento dado, es válida sólo en el momento de la evaluación y no implica, necesariamente, que el paciente no pueda llegar a estar libre de convulsiones en el futuro (Kwan et al., 2010).

El problema de la epilepsia refractaria es un problema multicausal, pero sin duda uno de los principales obstáculos que los FACs encuentran, antes de poder llegar al sitio de acción, es la barrera existente entre la circulación general y el parénquima cerebral, denominada barrera hematoencefálica.

1.3 La barrera hematoencefálica

El término *barrera hematoencefálica* (BHE) es usado para describir las propiedades únicas que presenta la vasculatura del sistema nervioso central (SNC). La naturaleza restrictiva de la BHE posibilita la regulación de la homeostasia cerebral, permitiendo el pasaje de nutrientes necesarios hacia el interior del parénquima cerebral al mismo tiempo que impide el pasaje de toxinas, patógenos y agentes proinflamatorios que podrían generar daños o producir enfermedades (Daneman and Prat, 2015).

Dentro de las diferentes categorías de capilares sanguíneos, el endotelio de los vasos presentes en el SNC corresponde al tipo continuo no fenestrado y, a diferencia del resto de los endotelios vasculares del cuerpo, contiene características únicas que le permiten regular el intercambio de moléculas, iones y células entre la sangre y el SNC. Una de las características más distintivas del endotelio cerebral es la complejidad de las uniones estrechas (**TJ**, *tight junctions*) que unen células endoteliales contiguas y son responsables, en parte, de la menor permeabilidad general del tejido (en comparación a otros tipos de endotelios). Esto, sumado a una menor actividad endocítica (se observa una menor cantidad de vesículas intercelulares, lo que disminuye el pasaje de sustancias a través de la vía transcelular) y a una mayor expresión de transportadores de eflujo en la membrana luminal de las células endoteliales, es lo que le confiere a la BHE su carácter de barrera *altamente restrictiva* para el ingreso de sustancias al SNC (Engelhardt and Sorokin, 2009).

Por otro lado, la existencia de múltiples sistemas y/o mecanismos de transporte específicos hacen de la BHE una barrera altamente *selectiva*, capaz de permitir el ingreso de compuestos esenciales para el normal funcionamiento del tejido cerebral

(como por ejemplo ingreso de nutrientes y hormonas) y, a la vez, de restringir el ingreso de xenobióticos (Sá-Pereira et al., 2012).

En la **Figura 1.1** se muestran los principales mecanismos de ingreso de sustancias al SNC, a través de la BHE: (1) la difusión pasiva por *vía paracelular* de ingreso de moléculas pequeñas e hidrofílicas, la cual se encuentra muy restringida por las TJs antes mencionadas; (2) la difusión pasiva por *vía transcelular* de ingreso de compuestos (generalmente pequeños y lipofílicos) capaces de atravesar las células por difusión pasiva y, a la vez, evadir a los transportadores de eflujo; (3) compuestos esenciales (aminoácidos, nutrientes, vitaminas, etc.) pueden ingresar a través de proteínas transportadoras específicas, principalmente por lo que se conoce como *difusión facilitada*; (4) compuestos como la insulina podrán atravesar las células endoteliales por *transcitosis mediada por receptores* y (5) moléculas cargadas positivamente podrán atravesar mediante *transcitosis absorbitiva* al entrar en contacto con la superficie negativa de la membrana luminal vascular.

Figura 1.1 | Representación esquemática de las vías disponibles para el pasaje de sustancias a través de la BHE. Los transportadores de eflujo (como por ejemplo la glicoproteína P, Pgp) restringen el ingreso de sus sustratos al SNC (generalmente, moléculas pequeñas y lipofílicas que acceden a las células por difusión pasiva).

Las células endoteliales de la BHE, junto con la membrana basal que brinda soporte, los pericitos, los pies de los astrocitos que rodean los capilares, las neuronas y células de músculo liso forman una unidad funcional denominada *unidad neurovascular* (UNV), representada en la **Figura 1.2**.

Como se observa en la **Figura 1.2**, las **TJs** del endotelio vascular cerebral son más complejas que sus homólogas en el resto del sistema circulatorio. Esta red está compuesta por tres tipos de proteínas: (1) proteínas transmembrana, como ocludina, claudina (claudina 3 y 5) y moléculas de adhesión de unión (JAM, *junctional adhesion molecules*), responsables principalmente del efecto oclusivo que restringe la permeabilidad paracelular (Nitta et al., 2003); (2) proteínas de anclaje, como las proteínas plasmáticas *zonulae occludens* (ZO1 y ZO2), Par y afadina que mantienen unidas a las proteínas transmembrana, el citoesqueleto y las moléculas de señalización agrupándolas en dominios específicos de la membrana celular (González-Mariscal et al., 2000) y; (3) el citoesqueleto de actina (filamentos de actina, miosina, microtúbulos y proteínas de unión de actina) que tienen un rol preponderante en las propiedades adhesivas de las TJs (Lai et al., 2005). Otras estructuras que también participan en la formación de esta barrera son las denominadas uniones de adhesión (**AJ**, *adherens junctions*) (Stamatovic et al., 2016) y las uniones gap (**GJ**, *gap junctions*) (De Bock et al., 2017).

La BHE presenta, a su vez, una gran cantidad de carriers o sistemas de transportadores muy específicos y selectivos encargados de regular el transporte de sustancias desde la circulación al parénquima cerebral y *viceversa*: los denominados transportadores de influjo y eflujo, respectivamente.

Figura 1.2 | Representación esquemática de la unidad neurovascular y de las uniones estrechas y de adherencia presentes en las células endoteliales vasculares de la BHE.

Los ***transportadores de influjo*** son los responsables del transporte de nutrientes, moléculas de señalización y de algunos fármacos (Braissant et al., 2001; Guo and Jiang, 2016; Wakayama et al., 2002). Estos transportadores pertenecen a la superfamilia de transportadores de solutos (SLC, *solute carrier*), la cual comprende gran cantidad de proteínas de membrana encargadas de facilitar el transporte de una amplia gama de sustratos a través de las membranas biológicas. Los transportadores SLC funcionan como facilitadores de la difusión solutos a favor de su gradiente electroquímico (*difusión facilitada*) o como transportadores activos secundarios, permitiendo el pasaje de solutos en contra de su gradiente al acoplar su transporte al movimiento de un segundo soluto (antiporte o simporte). Por último, algunos miembros pueden comportarse como canales transmembrana (Bai et al., 2017; Colas et al., 2016).

Los ***transportadores de eflujo***, por su parte, pertenecen (en su gran mayoría) a la superfamilia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*), y se encargan de la eliminación de diferentes moléculas generadas en el cerebro, desde pequeñas moléculas hidrofílicas hasta neurotransmisores, neuromoduladores, metabolitos y/o toxinas, como así también del transporte de sustancias (generalmente moléculas pequeñas que han atravesado la membrana celular de manera pasiva) en contra de su gradiente de concentración, retornándolas al torrente sanguíneo. En la membrana apical de las células de la BHE se expresan principalmente cuatro transportadores ABC: ABCB1 (también conocida como proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos, MDR1, o glicoproteína P, P-gp), ABCC2 y ABCC4 (o MDR2 y 4, respectivamente) y ABCG2 (también conocida como proteína de resistencia del cáncer de mama, BCRP). Entre ellos, y acorde a los niveles de expresión, P-gp y BCRP (Al-Majdoub et al., 2019) parecen ser los principales responsables de mover aquellas moléculas potencialmente nocivas para el cerebro (hidrofílicas o lipofílicas) hacia la circulación general [14,15].

Los transportadores de eflujo de la familia ABC, como P-gp y BCRP, presentan una estructura núcleo de dominios transmembrana (TMDs, *trans-membrane domains*) y dos sitios de unión a ATP, conocidos como dominios de unión a nucleótido (NBDs, *nucleotide-binding domains*). Los TMDs poseen en su estructura múltiples segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana plasmática formando los canales transmembrana. De esta manera, los canales transmembrana se encargan de entrar en contacto con sus sustratos, mientras que los NBDs son los motores moleculares que transforman la energía potencial química del ATP para generar los cambios conformacionales necesarios en los canales transmembrana (Jones and George, 2004). En la **Figura 1.3** se muestra una representación esquemática de la proteína P-gp en sus dos estados conformacionales, previo al contacto con un sustrato y luego del cambio conformacional generado por la unión a ATP.

Como puede observarse hasta aquí, la BHE es una estructura sumamente compleja, pero a la vez increíblemente funcional. Entender cuáles son los mecanismos que pueden limitar el pasaje de fármacos anticonvulsivos al SNC es crucial a la hora de diseñar nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología. Más allá de la farmacorresistencia, incluso en los casos de pacientes que responden al tratamiento la limitación impuesta por la BHE hace necesario el uso de elevadas dosis sistémicas de los FACs para lograr niveles terapéuticos en el sitio de acción, responsables de los efectos adversos característicos de este grupo de fármacos (Talevi et al., 2012; Vlieghe and Khrestchatisky, 2013).

Figura 1.3 | Representación esquemática del transportador de eflujo P-gp en sus dos estados conformacionales. Se observan sus dominios transmembrana y los dominios de unión a nucleótido donde el ATP logra unirse para producir el cambio conformacional. La imagen tridimensional de la P-gp fue obtenida a través de Protein Data Bank (<https://pdb101.rcsb.org/motm/123>). David S. Goodsell and the RCSB PDB, bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution licence (CC-BY)

1.4 Hipótesis sobre los mecanismos generadores de la refractariedad

Como se discutió en la sección 1.3, si bien en la última década se han desarrollado más de diez nuevos FACs, alrededor de un 30 – 40% de los pacientes permanece siendo resistente a las terapias medicamentosas. De este porcentaje, un 20% de los pacientes con epilepsia generalizada primaria y hasta el 60% de los pacientes con epilepsia focal desarrollan resistencia a fármacos en algún punto del transcurso de la patología (Rubio-Donnadieu, 2013). Si bien la refractariedad es un problema multifactorial, hasta el momento han podido plantearse seis diferentes hipótesis que explicarían este fracaso terapéutico, las cuales se comentan a continuación.

Hipótesis de la red neuronal

Esta hipótesis, introducida por Fang y sus colaboradores en el año 2011 (Fang et al., 2011), y establece que las alteraciones cerebrales generadas o asociadas con la epilepsia (reordenamientos adaptativos de los circuitos neuronales que se producen como secuela de las convulsiones) contribuyen a la formación de redes neuronales anormales que derivan en una menor eficacia de los FACs administrados.

Hipótesis de la severidad intrínseca

Esta hipótesis se encuentra basada en estudios clínicos en pacientes, así como en modelos animales, y establece que diversos factores neurobiológicos (edad temprana de inicio de la enfermedad, comorbilidad de desórdenes neurológicos o neuropsiquiátricos, retraso en el desarrollo neuronal, etc.) (Sánchez et al., 2014) pueden contribuir al grado de severidad de la epilepsia así como también a la farmacorresistencia (Rogawski and Johnson, 2008).

Hipótesis de la variante genética

Como su nombre lo indica, el fundamento de esta hipótesis se encuentra en las variaciones genéticas (mutaciones) que pueden encontrarse en algunos pacientes que sufren de epilepsia. Los genes mutados pueden afectar la expresión de múltiples canales iónicos relacionados a la enfermedad (canales voltaje operados dependientes de Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Catterall, 2013; Rajakulendran and Hanna, 2016; Villa and Combi, 2016) y canales iónicos dependientes de ligandos (receptores N-metil-D-aspartato, receptores GABA y receptores nicotínicos) (Becchetti, 2012; Sperk et al., 2004; Xu and Luo, 2018), así como también de enzimas de la superfamilia del CYP450 (López-García et al., 2017) y transportadores de fármacos (Ajmi et al., 2018). Dado que los FACs, en su mayoría, actúan sobre alguno de estos canales, son metabolizados por esas enzimas y/o requieren de transporte activo para llegar a su sitio de acción (Rogawski et al., 2016), las mencionadas mutaciones afectarían la farmacocinética y farmacodinamia de dichos fármacos, comprometiendo así su eficacia terapéutica.

Hipótesis del blanco terapéutico

Esta hipótesis establece que los cambios en las propiedades de los blancos terapéuticos relacionados a la propia epilepsia pueden derivar en pérdida de sensibilidad a los FACs (Remy and Beck, 2006). Los blancos afectados pueden incluir a varios receptores así como a canales iónicos, aunque los datos obtenidos hasta el momento para sustentar esta hipótesis, surgen principalmente de un estudio realizado sobre canales de Na^+ voltaje operados tras la administración de Carbamazepina (CBZ) (Remy et al., 2003).

Hipótesis de los transportadores de eflujo a nivel del SNC

La hipótesis de los transportadores es sin duda la más estudiada hasta el momento, y se fundamenta en la observación experimental de altos niveles de expresión de los ya descritos transportadores ABC que restringen la transferencia de sus sustratos por vía transcelular (Ejendal and Hrycyna, 2002; Mansoori et al., 2017) a nivel de la BHE y/o del foco epileptogénico.

Muchos estudios han documentado la correlación existente entre la sobreexpresión de transportadores de eflujo en el tejido epileptogénico y la aparición de refractariedad en la terapia anticonvulsiva (Loscher et al., 2012). La P-gp, en particular, es responsable del transporte de una amplia gama de compuestos de diversas estructuras, en general compuestos hidrofóbicos y anfifílicos planos (Chufan et al., 2015) y ha sido descrita como presente tanto en la BHE como en el intestino, hígado, riñones y placenta, entre otros (Staud et al., 2010). Dado que el transportador cumple una función protectora al evitar el pasaje de xenobióticos o sustancias potencialmente tóxicas desde el torrente sanguíneo hacia el parénquima cerebral (Halcrow et al., 2016), su sobreexpresión a nivel de la BHE restringe el pasaje de los FACs, sustratos del mismo, hacia el sitio de acción, disminuyendo la biodisponibilidad de los mismos en el SNC (Sills et al., 2002).

Por último, cabe destacar que la sobreexpresión de proteínas de eflujo en órganos periféricos (como por ejemplo intestino delgado, hígado y riñones) también contribuiría a disminuir los niveles plasmáticos de los FACs por una disminución en la absorción cuando los mismos son administrados por vía oral. Esta observación a veces es considerada como una hipótesis adicional (*hipótesis farmacocinética*) (Lazarowski et al., 2007)

Estrategias terapéuticas basadas en la hipótesis de los transportadores

Durante los últimos años, se realizaron numerosos esfuerzos enfocados en el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a mejorar la eficacia de los FACs, tratando de evitar el efecto que los transportadores de eflujo pueden tener sobre su distribución (Potschka, 2012). La mayoría de los estudios se han enfocado en 3 diferentes estrategias (Talevi and Bruno-Blanch, 2012): (1) el uso de inhibidores específicos de la P-gp (Nanayakkara et al., 2018); (2) diseño de nuevos fármacos no sustratos de P-gp (Couyoupetrou et al., 2016); (3) evasión de los transportadores (también denominada estrategia tipo “caballo de Troya”).

La modulación de los transportadores debe ser cuidadosamente diseñada para no afectar la función fisiológica o basal de los mismos, ya que la disminución a largo plazo de la función de la P-gp se ha asociado a toxicidad por xenobióticos, y mayor predisposición a enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y de Alzheimer, entre otra (Miller et al., 2008). Por otro lado, la segunda de las mencionadas estrategias se caracteriza por el excesivo tiempo e inversión necesarios para lograr la introducción de un nuevo fármaco en la práctica clínica. En términos de la tasa de éxito en los ensayos clínicos de nuevos agentes terapéuticos, las enfermedades del SNC constituyen una de las áreas más riesgosas: sólo una pequeña cantidad de los candidatos a fármaco que alcanzan las etapas clínicas logran transformarse en medicamentos innovadores que ingresan al mercado (Goetghebeur and Swartz, 2016; Golyala and Kwan, 2017).

Posiblemente es por lo que la última estrategia ha cobrado mayor relevancia. En particular, el enfoque basado en nanopartículas (NPs) resulta una interesante alternativa para optimizar la entrega y la eficacia de los fármacos con acción a nivel del SNC (Jabir et al., 2015). Encapsular o conjugar los ingredientes activos con nanovehículos funcionalizados permite “ocultar” al fármaco de los mecanismos

de aclaramiento (como una especie de “caballo de Troya”) permitiendo una mayor llegada de la droga a su blanco molecular. Es decir, el fármaco puede ser incluido en un sistema nanotransportador que logre atravesar eficientemente las células endoteliales de los microcapilares a nivel de la BHE, logrando así concentraciones más altas del fármaco en el parénquima cerebral (Saeedi et al., 2019).

1.5 Nanovehículos farmacéuticos

Las primeras descripciones de sistemas nanoparticulados pueden ser rastreadas hasta tiempos antiguos, específicamente en el libro *Panacea aurea-auro potabile*, escrito por Francis Anthony en 1618 (Antonii, 1618), donde se mencionan sistemas coloidales de oro, y continuando hasta el siglo XX, cuando los considerados pioneros de la nanomedicina, Metchnikov y Ehrlich (ganadores del premio Nobel en fisiología o medicina) publicaron sus trabajos sobre fagocitos y anticuerpos, respectivamente (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 - NobelPrize.org,” n.d.).

Sin embargo, no fue sino hasta finales de los años 50’ cuando el padre de la nanotecnología, Richard Feynman, en su mítica conferencia “*There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics*”, comparte por primera vez a la comunidad científica sus ideas sobre la manipulación de átomos individuales para construir nuevos sistemas (Feynman, n.d.). Estos nuevos conceptos dieron paso a nuevos desarrollos en varios campos de las ciencias. A partir de ese momento, y hasta finales de siglo, una gran cantidad de trabajos sobre nanosistemas aplicados a la entrega de fármacos han sido publicados, desde sistemas liposomales (Gregoriadis et al., 1971), NPs metálicas (Anderson et al., 2019) y poliméricas (Ringsdorf, 1975), nanocápsulas (Couvreur et al., 1977),

conjugados polímero-proteína (Davis, 2002) y sistemas micelares (Gros et al., 1981), entre otros.

Estos nuevos “nanovehículos farmacéuticos” cambiaron el paradigma de los campos de la biomedicina y la farmacoterapéutica, derribando el concepto clásico de que sólo el fármaco libre, disuelto en los fluidos biológicos, podía ser absorbido y/o distribuido en el organismo. Muy por el contrario, ahora podrían desarrollarse nanovehículos a la medida, capaces de proteger, transportar y entregar al fármaco en su sitio de acción, a través de la circulación general, siguiendo una cinética y/o biodistribución diferente a la del fármaco libre.

En otras palabras, la nanotecnología ha permitido pensar como posible al sistema de liberación “ideal”, es decir, aquel que lograra: a) compensar las propiedades fisicoquímicas desfavorables del fármaco; b) encapsular, atrapar o adsorber eficientemente al fármaco; c) proteger a la droga de procesos degradativos y/o biotransformaciones indeseables; d) evitar el reconocimiento de la droga por parte de los transportadores inespecíficos; e) dirigir el fármaco a su sitio de acción y, en el caso de blancos intracelulares, promover la captación celular; f) una vez en el sitio de acción (y no antes), liberar la droga de manera controlada; g) disminuir la cantidad de fármaco a ser utilizado mejorando la eficacia; h) no ser tóxico ni acumularse en el organismo y, preferentemente, ser biodegradable. Sobre este último punto, Keck y Müller propusieron la creación de un sistema de clasificación nanotoxicológico que pueda establecer un criterio, a la hora de desarrollar nuevos nanosistemas y de crear nuevas reglamentaciones, basados en el tamaño, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad. Los autores consideraban que el tamaño, como único criterio de clasificación, no era lo suficientemente sensible: en general, se consideraba que nanopartículas con tamaños inferiores a los 100 nm presentan mayores riesgos toxicológicos ya que por debajo de este tamaño las partículas pueden llegar a ser internalizadas por cualquier célula mediante

endocitosis. Por encima de los 100 nm las partículas podrían entrar a las células por fagocitosis, es decir, tendrían un efecto sobre los macrófagos que resultan ser una población celular más limitada en el cuerpo. Respecto a la biodegradabilidad, los autores plantean que aquellos materiales que, efectivamente, son degradados en el organismo, presentan menos riesgo de toxicidad, en contraste con aquellos materiales no biodegradables. Los materiales biodegradables, si bien pueden presentar algún efecto tóxico sobre el organismo, por ejemplo en el sistema inmune, al desaparecer luego de un cierto tiempo, permite que el sistema inmune vuelva a su estado basal. En cambio, los materiales no-biodegradables pueden permanecer en el organismo por siempre, acumulándose en el cuerpo. En base a estos dos criterios, Keck y Müller proponen 4 clases (clase I – IV) de nanopartículas dependientes del tamaño y la persistencia dentro del organismo (Keck and Müller, 2013): la *Clase I*, compuesta por partículas de tamaños mayores a los 100 nm y cuyos componentes corresponden a compuestos biodegradables; la *Clase II*, correspondiente a partículas con tamaños superiores a los 100 nm con componentes no-biodegradables; la *Clase III* con partículas con tamaños inferiores a los 100 nm pero con sus componentes biodegradables; y finalmente la *Clase IV* con partículas con tamaños inferiores a los 100 nm y componentes no-biodegradables. A su vez, a esta clasificación le asignaron un patrón de colores, similares a un semáforo, para identificar la nanotoxicidad con una mayor simplicidad. La **Figura 1.4** muestra la clasificación propuesta por estos autores.

Figura 1.4 | Sistema de clasificación nanotoxicológico propuesto por Keck y Müller, donde se toman como variables de clasificación al tamaño de las nanopartículas y su persistencia dentro del organismo, dependiente de su biodegradabilidad. Los colores asociados a las diferentes clases sugieren un bajo riesgo de toxicidad (colore verde) y un alto riesgo de toxicidad (color rojo). Imagen reproducida de C.M. Keck, R.H. Müller, *Nanotoxicological classification system (NCS) - a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems* bajo los términos de licencia limitada otorgada por Elsevier con número de licencia 5054861265791.

Nanopartículas lipídicas

Durante mucho tiempo los lípidos sólidos a temperatura ambiente han sido usados en la industria farmacéutica para la preparación de diferentes tipos de formulaciones, tales como emulsiones, ungüentos y lociones, entre otras (de Blaey and Polderman, 1980). Debido a que este tipo de componentes poseen una alta

afinidad por la capa superficial de la piel, el estrato córneo⁹, estas formulaciones fueron históricamente utilizadas como excipientes en la preparación de formas farmacéuticas de aplicación tópica.

No fue sino hasta principios de los años 90' que se pensó en expandir su uso a otras vías de administración, cuando el Dr. Müller y su equipo desarrollaron las denominadas nanopartículas sólidas lipídicas (SLN[®], *solid lipid nanoparticles*) (Müller et al., 2000). La idea era innovadora, pero a la vez simple: combinar las prometedoras características de las NPs (para ese entonces casi exclusivamente metálicas o poliméricas) con las ventajas ya conocidas de las emulsiones parenterales lipídicas, cuyas formulaciones contenían componentes no tóxicos y biodegradables (Schwarz et al., 1994).

Estos sistemas lipídicos fueron anunciados como una versión más segura de otros nanosistemas, capaces de entregar el fármaco de manera controlada a la vez de ser más estables y más económicos que los liposomas (basados en fosfolípidos) desarrollados hasta el momento (Martins et al., 2007). Por su tamaño y naturaleza biodegradable, la mayoría de NPs de base lipídica se encuentran dentro de la clase de bajo riesgo (clase I) del sistema de clasificación nanotoxicológica sugerido por Keck y Müller (Keck and Müller, 2013).

Casi 10 años después de la introducción de las SLN, surgió una nueva generación de sistemas lipídicos, los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, *nanostructured lipid carriers*) (Müller et al., 2002). Al igual que con las SLN, la modificación incorporada era simple pero efectiva: el agregado de pequeñas cantidades de lípidos líquidos a temperatura ambiente (aceites), que desorganizaban la matriz cristalina lipídica original. Para ese entonces, se había

⁹ El estrato córneo está formado por 10 o 15 capas de células muy deshidratadas (corneocitos), que forman una estructura similar a ladrillos incluidos en una matriz lipídica intercelular.

notado que la estructura cristalina de la matriz lipídica comenzaba a organizarse para formar estructuras más estables lo que resultaba, muchas veces, en la expulsión parcial o casi total de la droga incorporada (Mehnert and Mader, 2001). El agregado de aceites a la estructura reducía la cristalinidad de la matriz manteniendo al fármaco en su estructura por mayor tiempo, a la vez que incrementaba la capacidad de carga de droga y su estabilidad a largo plazo.

Síntesis y características fisicoquímicas de las NPs lipídicas

El hecho de que se trate de partículas fuertemente hidrofóbicas hace que, colocadas en un ambiente acuoso, no se hidraten o lo hagan muy poco, por lo que no son capaces de disolverse o dispersarse espontáneamente en agua sino que por el contrario, tienden a la agregación para disminuir el área superficial expuesta. Por este motivo, la preparación de estas dispersiones necesita la transferencia de una alta cantidad de energía para poder lograr tamaños tan pequeños con áreas superficiales tan elevadas (Troy, 2000). Existen diversos métodos para la obtención de NPs lipídicas, pero todos comparten una etapa de entrega de energía, ya sea por sonicación por sonda (S. Scioli Montoto et al., 2018), alta presión (Wang et al., 2018) o por homogeneización a alta velocidad (Nakhlband et al., 2018), entre otras.

Si bien depende del método de síntesis empleado, los tamaños de partículas de estos sistemas suelen encontrarse entre los 70 – 300 nm (Kaur et al., 2008) y su vez presentan capacidad de ser deformables, sobre todo al aumentar la cantidad de componente lipídico en las formulaciones (Souto et al., 2004).

Más allá de la energía necesaria para *generar* la NPs, es necesario utilizar otras estrategias tecnológicas para *mantener* esa enorme área superficial expuesta y dispersa en el medio acuoso. Es por eso que para prevenir el agregado o

coalescencia de las NPs, las mismas deben ser estabilizadas eléctrica y/o estéricamente (Keck et al., 2014).

La carga superficial de las NPs lipídicas está determinada por los diferentes componentes o materiales utilizados para su síntesis y del pH del medio circundante (Cheng and Lee, 2016). La misma se evalúa a través de la medida del potencial Z, el cual representa la diferencia de potencial entre la doble capa estacionaria de fluido que rodea a una partícula coloidal en suspensión y cualquier punto del medio líquido circundante (es decir, el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento), por lo que está directamente asociado a la carga superficial de la partícula (Nasrollahzadeh et al., 2019).

Sin embargo, para evitar la coalescencia de NPs en suspensión *sólo* por repulsión electrostática se requieren valores de potencial Z del orden o mayores (en valor absoluto) a 30 mV, para asegurar suficiente repulsión de NP cercanas en la suspensión (Kovačević et al., 2014). Si bien es posible agregar componentes a la formulación capaces de conferirle carga superficial negativa o positiva, la mayoría de los componentes lipídicos (así como los tensioactivos) que se utilizan actualmente para formular SLN/NLC son neutros a pH fisiológico, ya que generalmente se utilizan compuestos con estructuras químicas tipo éster (por ejemplo, glicéridos) y/o éter (*ej.* los tensioactivos Tween, Poloxameros, Brij). Las NPs lipídicas basados en estos materiales tienden a presentar valores de potencial Z leve o moderadamente negativos (entre -30 y -3 mV) (Mura et al., 2021; S. Scioli Montoto et al., 2018) .

Dado que los mencionados valores de carga superficial no son suficientes para prevenir la coalescencia de las NPs, las mismas deben estabilizarse adicionalmente mediante repulsión estérica. Para ello, se pueden incluir en la formulación compuestos poliméricos y/o tensioactivos, que tienden a adsorberse en la

superficie de las partículas y a proyectar sus residuos polares al medio acuoso circundante, evitando así que las NPs se acerquen demasiado y predominen las fuerzas de atracción (Luo et al., 2015). En la **Figura 1.5** se muestra una representación esquemática de SLN y NLC estabilizadas estéricamente a través del uso de un tensioactivo no-iónico

Figura 1.5 | Representación esquemática de una SLN y NLC estabilizadas estéricamente con un tensioactivo no-iónico (gris). Los átomos de oxígeno de los lípidos sólidos y líquidos se muestran en naranja. Reproducido de Scioli Montoto S, Muracca G & Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects, Front. Mol. Biosci. 7 (2020) bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution licence (CC-BY).

Aplicaciones terapéuticas de las SLN/NLC

A partir del surgimiento de estos sistemas lipídicos, muchos trabajos fueron publicados, enfocados no solo en el estudio *per se* de los mismos, sino también en la utilización de estos para el tratamiento de diversas patologías o para diagnóstico. Sin embargo, es llamativo que, si bien la primera referencia acerca de

SLN/NLC data de hace 25 años (Maassen et al., 1993), el 60,8% de las publicaciones relacionadas a estos sistemas fueron publicadas en el período 2013 – 2020. Es decir, estos sistemas comenzaron a tener su auge hace relativamente poco tiempo.

Del universo de publicaciones que surgen del periodo antes mencionado (371 publicaciones), de la base de datos de Scopus (Scioli Montoto et al., 2020) el campo terapéutico más relevante ha sido el del tratamiento del cáncer, seguido por el tratamiento antibacteriano, tratamiento de patologías o desórdenes del SNC, tratamientos dirigidos a un sitio específico, vehículos desarrollados sin intención terapéutica y por último, sistemas con fármacos destinados al tratamiento de diversas enfermedades o condiciones. En la **Figura 1.6** se muestra un gráfico con la distribución de estos trabajos ordenados por grupos terapéuticos.

En general, el tratamiento de cualquier enfermedad se puede potenciar mediante la entrega del (o de los) fármaco/s mediante NPs, principalmente por aspectos fisicoquímicos (como por ejemplo mayor estabilidad de la droga en los fluidos biológicos) y/o biofarmacéuticos (ejemplo: optimización de la absorción, biodistribución, etc.). Sin embargo, la distribución que se observa en la Fig. 1.5 sugiere que las NPs lipídicas pueden poseer ventajas adicionales en ciertos campos terapéuticos específicos.

En el caso particular de las enfermedades del SNC, lo que se desea es, como se comentó al final de la sección 1.5, es aumentar la eficacia de el/los fármaco/s encapsulado/s mediante la optimización de la biodistribución (mayor estabilidad en fluidos biológicos, menor metabolismo de fármacos, menor captación por transportadores de eflujo, etc.).

Figura 1.6 | Distribución de campos terapéuticos cubierto por las publicaciones relacionadas a SLN/NLC durante el período 2013 – 2020. Reproducido de Scioli Montoto S, Muracca G & Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects, Front. Mol. Biosci. 7 (2020) bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution licence (CC-BY).

Aunque se ha sugerido que las NPs pueden ingresar al SNC por la vía paracelular (a través de la apertura transitoria de las uniones estrechas, como en el caso de las NPs recubiertas de quitosano (Yu et al., 2013; Zhang et al., 2014)), hoy en día existe evidencia que sugiere que el mecanismo de ingreso de NPs es la endocitosis: una vez dentro de la célula endotelial, las vesículas conteniendo a las NPs pueden migrar hasta fusionarse con la membrana basal, logrando así la transcitosis de las NPs, o liberarlas en el espacio intracelular, favoreciendo el acceso del fármaco al SNC (Saraiva et al., 2016). Por otro lado, las NPs lipídicas se caracterizan por poseer una mayor retención en los capilares sanguíneos cerebrales por adsorción

a las paredes de los mismos, a la vez que admiten ser recubiertas, por ejemplo con polisorbato, para lograr una disminución de su aclaramiento y mejorar la biodisponibilidad cerebral (Zhou et al., 2018).

Por último, y como puede verse en la **Figura 1.6**, cabe destacar que sólo dos trabajos sobre sistemas lipídicos destinados al tratamiento de la epilepsia han sido publicados en el periodo 2013-2020, siendo uno de ellos parte de esta tesis (Scioli Montoto et al. 2018).

1.6 Hipótesis y objetivos

En función de todo lo dicho hasta aquí, el presente trabajo de tesis se basó en la hipótesis de que los sistemas lipídicos nanoparticulados pueden ofrecer soluciones a las limitaciones que actualmente se encuentran durante la terapéutica de la epilepsia. Debido a sus características únicas, las SLN/NLC podrían ser capaces de modificar el perfil de liberación del fármaco que transportan, optimizar su biodistribución, atravesar eficientemente la BHE, ocultar al fármaco que vehiculizan de los mecanismos de aclaramiento y/o evitar su reconocimiento por parte de los transportadores de eflujo (ej. P-gp).

Objetivo general

Diseñar, preparar y evaluar sistemas terapéuticos nanométricos de base lipídica (SLN/NLC) conteniendo dos FACs conocidos y de amplio uso en la terapéutica (Carbamazepina y Fenobarbital), biofarmacéuticamente optimizados para aumentar la biodisponibilidad cerebral de los fármacos administrados.

Se trata no sólo de una posible estrategia para el tratamiento de la epilepsia refractaria, sino que el mayor pasaje de fármaco al parénquima cerebral también podría resultar en la necesidad de utilizar una menor cantidad de fármaco para el tratamiento de la patología (en paciente responsivos), lo que podría significar, a su vez, una disminución de los efectos adversos característicos de los FACs.

Objetivos específicos

- › Seleccionar y caracterizar los sistemas a estudiar.
- › Preparar los nanosistemas seleccionados en la etapa anterior (seleccionar métodos de preparación, optimización del tamaño de partícula, mecanismo de incorporación del fármaco).
- › Caracterizar de manera completa los sistemas generados: rendimiento de síntesis, capacidad de carga de fármaco, estabilidad y caracterización fisicoquímica completa, mediante métodos térmicos, microscópicos y espectroscópicos para el estudio de la forma, tamaño, potencial Z, presencia de agregados, estructura cristalina e interacciones matriz-fármaco.
- › Evaluar la liberación del fármaco a partir de dichos nanosistemas mediante estudios *in vitro* en condiciones biorrelevantes.
- › Estudiar la permeabilidad de los sistemas desarrollados en monocapa de células expresando glicoproteína P (P-gp).
- › Estudiar la toxicidad celular de las nanopartículas desarrolladas en modelos celulares apropiados.
- › Evaluar la actividad biológica *in vivo* de los sistemas desarrollados en modelos animales de epilepsia.
- › Estudiar la biodistribución de los FACs incluidos en los sistemas desarrollados y compararlos con la biodistribución de los FACs en su forma libre.

1.7 Referencias del capítulo

- Ajmi, M., Boujaafar, S., Zouari, N., Amor, D., Nasr, A., Rejeb, N. Ben, Amor, S. Ben, Omezzine, A., Benammou, S., Bouslama, A., 2018. *Int. J. Neurosci.* 128, 705–714.
- Al-Majdoub, Z.M., Al Feteisi, H., Achour, B., Warwood, S., Neuhoff, S., Rostami-Hodjegan, A., Barber, J., 2019. *Mol. Pharm.* 16, 1220–1233.
- Anderson, S.D., Gwenin, V. V., Gwenin, C.D., 2019. Magnetic Functionalized Nanoparticles for Biomedical, Drug Delivery and Imaging Applications. *Nanoscale Res. Lett.*
- Antonii, F., 1618. *Panacea aurea-auro potabile*, Bibliopolio Frobeniano: Hamburg. Ex Bibliopoli Frobeniano.
- Argentina, 2001. *Bol. Of. la República Argentina*.
- Argentina, 2009. *Bol. Of. la República Argentina* 3.
- Bai, X., Moraes, T.F., Reithmeier, R.A.F., 2017. *Mol. Membr. Biol.* 34, 1–32.
- Becchetti, A., 2012. *ISRN Biochem.* 2012.
- Birbeck, G.L., 2010. *Epilepsy Curr.* 10, 75–79.
- de Blaey, C.J., Polderman, J., 1980. Rationales in the Design of Rectal and Vaginal Delivery Forms of Drugs, in: *Medicinal Chemistry*. Elsevier, New York [etc.], pp. 237–266.
- De Bock, M., Leybaert, L., Giaume, C., 2017. *Neurochem. Res.* 42, 2519–2536.
- Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M., Bachmann, C., 2001. *Mol. Brain Res.* 91, 189–195.
- Carrizosa Moog, J., Kakooza – Mwesige, A., Tan, C.T., 2017. Epilepsy in the tropics: Emerging etiologies. *Seizure*.
- Catterall, W.A., 2013. Sodium Channel Mutations and Epilepsy, in: *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Oxford University Press, pp. 675–687.
- Cheng, X., Lee, R.J., 2016. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99, 129–137.
- Chufan, E.E., Sim, H.M., Ambudkar, S. V., 2015. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1). Recent Biochemical and Structural Studies., in: *Advances in Cancer Research*. Academic Press Inc., pp. 71–96.
- Colas, C., Ung, P.M.U., Schlessinger, A., 2016. SLC transporters: Structure, function, and drug discovery. *Medchemcomm.*
- Couvreux, P., Tulkenst, P., Roland, M., Trouet, A., Speiser, P., 1977. *FEBS Lett.*

- 84, 323–326.
- Couyoupetrou, M., Di Ianni, M., Gantner, M., Pesce, G., Peroni, R., Talevi, A., Bruno-Blanch, L.E., 2016. Discovering New Antiepileptic Drugs Addressing the Transporter Hypothesis of Refractory Epilepsy: Ligand-Based Approximations. Humana Press, New York, NY, pp. 259–279.
- Daneman, R., Prat, A., 2015. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7.
- Davis, F.F., 2002. The origin of peggology. Adv. Drug Deliv. Rev.
- Ding, K., Gupta, P.K., Diaz-Arrastia, R., 2017. Epilepsy After Traumatic Brain Injury, in: Laskowitz, D., Grant, G. (Eds.), Models of Seizures and Epilepsy. Elsevier Inc., pp. 661–681.
- Eadie, M.J., 1995. Epilepsy from the Sakikku to Hughlings Jackson, Journal of Clinical Neuroscience.
- Ejendal, K.F.K., Hrycyna, C. a, 2002. Curr. Protein Pept. Sci. 3, 503–511.
- Engelhardt, B., Sorokin, L., 2009. Semin. Immunopathol. 31, 497–511.
- Enrique, A.V., Di Ianni, M.E., Goicoechea, S., Lazarowski, A., Valle-Dorado, M.G., Costa, J.J.L., Rocha, L., Girardi, E., Talevi, A., 2019. Epilepsy Behav.
- Fang, M., Xi, Z.Q., Wu, Y., Wang, X.F., 2011. Med. Hypotheses 76, 871–876.
- Feynman, R.P., n.d. Plenty of Room at the Bottom.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. Epilepsia 55, 475–482.
- Fisher, R.S., Boas, W. van E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., 2005. Epilepsia 46, 470–472.
- Geller, M.J., 2010. Ancient Babylonian Medicine, Ancient Babylonian Medicine: Theory and Practice. Wiley.
- Glazko, A.J., 1986. Ther. Drug Monit. 8, 490–497.
- Goetghebuer, P.J., Swartz, J.E., 2016. J. Psychopharmacol. 30, 586–94.
- Golyala, A., Kwan, P., 2017. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. Seizure.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Ávila-Flores, A., 2000. Semin. Cell Dev. Biol. 11, 315–324.
- Gregoriadis, G., Leathwood, P.D., Ryman, B.E., 1971. FEBS Lett. 14, 95–99.
- Gros, L., Ringsdorf, H., Schupp, H., 1981. Angew. Chemie Int. Ed. English 20,

305–325.

Guo, Y., Jiang, L., 2016. *Neurol. Res.* 38, 634–639.

Halcrow, P.W., Dancer, M., Panteah, M., Walden, C., Ohm, J.E., 2016. Molecular Changes Associated With Tumor Initiation and Progression of Soft Tissue Sarcomas: Targeting the Genome and Epigenome, in: Pruitt, K. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., pp. 323–380.

Hall, M., 1836. *Lectures on the nervous system and its diseases*. Taylor, W., Philadelphia, PA.

Hall, M., 2017. *Lectures on the Nervous System and Its Diseases*. Trieste Publishing Pty Limited.

Di Ianni, M.E., Del Valle, M.E., Enrique, A. V., Rosella, M.A., Bruno, F., Bruno-Blanch, L.E., Talevi, A., 2015. *Assay Drug Dev. Technol.* 13, 313–318.

Jabir, N., Tabrez, S., Firoz, C.K., Zaidi, S., Baeesa, S., Gan, S., Shakil, S., Kamal, M., 2015. *Curr. Drug Metab.* 16, 336–345.

Janson, M.T., Bainbridge, J.L., 2020. *Ann. Pharmacother.* 106002802094805.

Jones, P.M., George, A.M., 2004. *C. Cell. Mol. Life Sci* 61, 682–699.

Jones, W., Potter, P., Withington, E., Smith, W., 1923.

Kaur, I.P., Bhandari, R., Bhandari, S., Kakkar, V., 2008. *J. Control. Release* 127, 97–109.

Keck, C.M., Kovačević, A., Müller, R.H., Savić, S., Vuleta, G., Milić, J., 2014. *Int. J. Pharm.* 474, 33–41.

Keck, C.M., Müller, R.H., 2013. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 445–448.

Kovačević, A.B., Müller, R.H., Savić, S.D., Vuleta, G.M., Keck, C.M., 2014. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 444, 15–25.

Kroner, B.L., Fahimi, M., Gaillard, W.D., Kenyon, A., Thurman, D.J., 2016. *Epilepsy Behav.* 62, 214–217.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Hauser, W.A., Mathern, G., Moshé, S.L., Perucca, E., Wiebe, S., French, J., Allen Hauser, W., 2010. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies, *Epilepsia*. John Wiley & Sons, Ltd.

Lai, C.H., Kuo, K.H., Leo, J.M., 2005. *Brain Res. Rev.* 50, 7–13.

Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubienieki, F., Girardi, E., Vazquez, S., D’Giano, C., 2007. *Epilepsia* 48, 140–149.

- López-García, M.A., Feria-Romero, I.A., Serrano, H., Rayo-Mares, D., Fagiolino, P., Vázquez, M., Escamilla-Núñez, C., Grijalva, I., Escalante-Santiago, D., Orozco-Suarez, S., 2017. *Pharmacol. Reports* 69, 504–511.
- Loscher, W., Luna-Tortos, C., Romermann, K., Fedrowitz, M., 2012. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2808–2828.
- Lowenstein, D.H., 2018. Diseases of the Central Nervous System, in: Jameson, L.J., Kasper, D.L., Dongo, D.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Loscalzo, J. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, pp. 3050–3068.
- Luo, Y., Teng, Z., Li, Y., Wang, Q., 2015. *Carbohydr. Polym.* 122, 221–229.
- Maassen, S., Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Yunis-Specht, F., Muller, B.W., Muller, R.H., 1993. *Proc. Control. Release Soc.* 490–491.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B., 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.*
- Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D.C., Souto, E.B., 2007. *Int J Nanomedicine* 2, 595–607.
- Mehnert, W., Mader, K.T., 2001. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.
- Miller, D.S., Bauer, B., Hartz, A.M.S., 2008. *Pharmacol. Rev.* 60, 196–209.
- Mora, G., 1967. *Am. J. Psychiatry* 124, 803–814.
- Moyano, L.M., Saito, M., Montano, S.M., Gonzalvez, G., Olaya, S., Ayvar, V., González, I., Larrauri, L., Tsang, V.C.W., Llanos, F., Rodríguez, S., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Garcia, H.H., 2014. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161–177.
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, in: *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Mura, P., Maestrelli, F., D'Ambrosio, M., Luceri, C., Cirri, M., 2021. *Pharmaceutics* 13.
- Nakhlband, A., Eskandani, M., Saeedi, N., Ghafari, S., Omid, Y., Barar, J., Garjani, A., 2018. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 164, 299–307.
- Nanayakkara, A.K., Follit, C.A., Chen, G., Williams, N.S., Vogel, P.D., Wise, J.G., 2018. *Sci. Rep.* 8, 1–18.
- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S.M., Issaabadi, Z., 2019. Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms,

- Characterization, and Applications, in: Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S.M., Issaabadi, Z. (Eds.), *An Introduction to Green Nanotechnology*. Elsevier B.V., pp. 199–322.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.
- Palestro, P.H., Gavernet, L., Estiu, G.L., Bruno Blanch, L.E., 2014. *Biomed Res. Int.* 2014, 358425.
- Park, K.M., Kim, S.E., Lee, B.I., 2019. *J. Epilepsy Res.* 9, 14–26.
- Peinado, F.L., 2008. *Código de Hammurabi*, 4th ed, Clásicos - Clásicos Del Pensamiento. Tecnos.
- Perucca, P., Scheffer, I.E., Kiley, M., 2018. The management of epilepsy in children and adults. *Med. J. Aust.*
- Pierce, J.M.S., 2002. *Brain* 125, 441–442.
- Potschka, H., 2012. Role of CNS efflux drug transporters in antiepileptic drug delivery: Overcoming CNS efflux drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.*
- Prichard, J.C., 1822. *A Treatise on Diseases of the Nervous System: Part the 1st Comprising Convulsive and Maniacal Affections*, *The New England Journal of Medicine, Surgery and Collateral Branches of Science*. London, England.
- Rajakulendran, S., Hanna, M.G., 2016. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6.
- Remy, S., Beck, H., 2006. *Brain* 129, 18–35.
- Remy, S., Gabriel, S., Urban, B.W., Dietrich, D., Lehmann, T.N., Elger, C.E., Heinemann, U., Beck, H., 2003. *Ann. Neurol.* 53, 469–479.
- Reynolds, E.H., 1990. *Med. Hist.* 34, 185–198.
- Rho, J.M., White, H.S., 2018. *Epilepsia Open* 3, 114–119.
- Ringsdorf, H., 1975. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 51, 135–153.
- Rogawski, M.A., Johnson, M.R., 2008. *Epilepsy Curr.* 8, 127–130.
- Rogawski, M.A., Löscher, W., Rho, J.M., 2016. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, 28.
- Rubio-Donnadieu, F., 2013. Pharmacoresistance and epilepsy, in: Rocha, L., Cavalheiro, E.A. (Eds.), *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*. Springer, New York, pp. 1–9.
- Sá-Pereira, I., Brites, D., Brito, M.A., 2012. *Mol. Neurobiol.* 45, 327–347.
- Saeedi, M., Eslamifar, M., Khezri, K., Dizaj, S.M., 2019. *Biomed. Pharmacother.* 111, 666–675.

- Sánchez, J., Centanaro, M., Solís, J., Delgado, F., Yépez, L., 2014. *Seizure* 23, 448–453.
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., Bernardino, L., 2016. *J. Control. Release* 235, 34–47.
- Schmidt, D., Löscher, W., 2005. Drug resistance in epilepsy: Putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*.
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Müller, R.H., 1994. *J. Control. Release* 30, 83–96.
- Scioli Montoto, S., Muraca, G., Ruiz, M.E., 2020. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Front. Mol. Biosci*.
- Scioli Montoto, S., Sbaraglini, M.L., Talevi, A., Couyoupetrou, M., Di Ianni, M., Pesce, G.O., Alvarez, V.A., Bruno-Blanch, L.E., Castro, G.R., Ruiz, M.E., Islan, G.A., 2018. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 167.
- Scioli Montoto, Sebastian, Sbaraglini, M.L.M.L.M.L.L., Talevi, A., Couyoupetrou, M., Di Ianni, M., Pesce, G.O.G.O.G.O.O., Alvarez, V.A.V.A., Bruno-Blanch, L.E.L.E.L.E., Castro, G.R.G.R., Ruiz, M.E.M.E.M.E.E., Islan, G.A.G.A.G.A.A., 2018. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 167, 73–81.
- Scott, D.F., 1993. The history of epileptic therapy : an account of how medication was developed, Parthenon Pub. Group. Parthenon Pub. Group, New York, NY.
- Sills, G.J., Kwan, P., Butler, E., de Lange, E.C.M., van der Berg, D.J., Brodie, M.J., 2002. *Epilepsy Behav.* 3, 427–432.
- Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Müller, R.H., 2004.
- Sperk, G., Furtinger, S., Schwarzer, C., Pirker, S., 2004. GABA and its receptors in epilepsy. *Adv. Exp. Med. Biol.*
- Stamatovic, S.M., Johnson, A.M., Keep, R.F., Andjelkovic, A. V., 2016. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers*.
- Starnes, K., Miller, K., Wong-Kisiel, L., Lundstrom, B.N., 2019. A review of neurostimulation for epilepsy in pediatrics. *Brain Sci*.
- Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., Pavek, P., 2010. *Methods Mol. Biol.* 596, 199–222.
- Talevi, A., Bellera, C., Ianni, M., Gantner, M., Bruno-Blanch, L., Castro, ., 2012. Mini-Reviews *Med. Chem.* 12, 959–970.

- Talevi, A., Bruno-Blanch, L.E., 2012. Efflux-Transporters at the Blood-Brain Barrier: Therapeutic Opportunities (pp. 117-144), in: Montenegro, P.A., Juárez, S.M. (Eds.), *The Blood-Brain Barrier: New Research*. Nova Science Publishers, pp. 117–144.
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 - NobelPrize.org [WWW Document], n.d. URL <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/summary/> (accessed 4.16.21).
- Thijs, R.D., Surges, R., O'Brien, T.J., Sander, J.W., 2019. *Lancet* 393, 689–701.
- Todman, D., 2008. Epilepsy in the Graeco-Roman world: Hippocratic medicine and Asklepian temple medicine compared. *J. Hist. Neurosci.*
- Troy, D.B. (Ed.), 2000. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 20th ed, Volume 1. Lippincott Williams & Wilkins.
- Villa, C., Combi, R., 2016. *Front. Cell. Neurosci.* 10.
- Vlieghe, P., Khrestchatisky, M., 2013. *Med. Res. Rev.* 33, 457–516.
- Wakayama, K., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Hosoya, K.I., Terasaki, T., 2002. *Neurosci. Res.* 44, 173–180.
- Wang, Q., Yang, Q., Cao, X., Wei, Q., Firempong, C.K.C.K., Guo, M., Shi, F., Xu, X., Deng, W., Yu, J., 2018. *Int. J. Pharm.* 550, 24–34.
- Weijenberg, A., van Rijn, M., Callenbach, P.M.C., de Koning, T.J., Brouwer, O.F., 2018. *Child Neurol. Open* 5, 2329048X1877949.
- White, H.S., Smith, M.D., Wilcox, K.S., 2007. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Int. Rev. Neurobiol.*
- Willis, T., Loggan, D., 1681. *The Remaining Medical Works of that Famous and Renowned Physician Dr. Thomas Willis*. T. Dring, C. Harper, J. Leigh, and S. Martyn, London.
- World Health Organization, 2019. WHO | Epilepsy: a public health imperative, Who.
- Xu, X.X., Luo, J.H., 2018. Mutations of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Epilepsy. *Neurosci. Bull.*
- York, G.K., Steinberg, D.A., 2007. *Med. Hist. Suppl.* 26, 3–34.
- Yu, S.-H., Tang, D.-W., Hsieh, H.-Y., Wu, W.-S., Lin, B.-X., Chuang, E.-Y., Sung, H.-W., Mi, F.-L., 2013.
- Zhang, J., Zhu, X., Jin, Y., Shan, W., Huang, Y., 2014. *Mol. Pharm.* 11, 1520–1532.

- Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E.S., Leblanc, R.M., 2018. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J. Control. Release*.
- Zilboorg, G., Henry, G.W., 1941. *A History of Medical Psychology*. W. W. Norton & Co., New York.

Capítulo 2

SLN y NLC de Carbamazepina

Carbamazepina (CBZ) (**Figura 2.1-B**) es un derivado del iminoestilbeno (**Figura 2.1-A**) con un grupo carbamil en la posición 5. Fue sintetizada por von W. Schindler y F. Häfliger en 1953 (Schindler & Häfliger 1954), en el laboratorio químico farmacéutico Geigy. Conocida como G32883, se trataba del compuesto más prometedor dentro de una batería de derivados carbamoil de compuestos iminodibencílicos con posible efecto antiepiléptico.

Se propuso inicialmente como antidepresivo dada su relación química con los antidepresivos tricíclicos, para ser luego sugerida para el tratamiento de la neuralgia del trigémino (Blom 1962). Los primeros estudios clínicos sobre su acción antiepiléptica comenzaron en 1958, pero los resultados fueron publicados

en 1963 (Theobald & Kunz 1963). Fue aprobado como fármaco antiepiléptico en el Reino Unido en 1965 y comercializada bajo la marca Tegretol®, siendo hoy en día el principio activo de primera elección para el tratamiento de crisis parciales y tónico-clónicas generalizadas (Smith et al. 2011).

Figura 2.1 | Estructura molecular del iminoestilbeno (A) y Carbamazepina (B).

El mecanismo de acción de CBZ, al igual que el de su metabolito activo 10,11-epóxido de carbamazepina, no se encuentra del todo esclarecido. Sin embargo, varios autores coinciden en que ejerce su acción farmacológica actuando sobre los canales de sodio voltaje operados presentes en las membranas de las neuronas presinápticas (**Figura 2.2**). La CBZ estabiliza a los canales de Na^+ cuando éstos se encuentran en su estado inactivo, es decir, prolonga el tiempo de inactivación del canal. Dado que durante este estado los canales son refractarios a nuevos estímulos eléctricos, el efecto del fármaco es inhibir nuevas descargas (Rogawski et al. 2016).

Figura 2.2 | Mecanismo de acción de CBZ. La interacción de CBZ con los canales de Na^+ voltaje operados en la membrana presináptica, en su estado inactivo, estabiliza al canal en dicho estado, restringiendo así el ingreso de iones Na^+ y evitando la propagación del potencial de acción.

La farmacocinética de CBZ es compleja, se trata de un compuesto con baja solubilidad acuosa (perteneciente a la clase II del SCB (*Sistema de Clasificación Biofarmacéutica*, clase II: poco soluble y muy permeable) capaz de inducir su propio metabolismo, es decir, su transformación en metabolitos a través de las enzimas oxidativas hepáticas. Por vía oral, CBZ es absorbida lentamente y de manera errática, logrando una biodisponibilidad entre el 75 – 85% (Tolou-Ghamari et al. 2013). Posee un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas cercano al 75% (Smith et al. 2011), y es metabolizada a nivel hepático a través de las isoenzimas CYP3A4 y CYP2C8 de la familia del CYP450. El compuesto activo 10,11-epóxido de CBZ se encuentra entre sus metabolitos primarios, el que luego es hidroxilado a *trans*-10,11-dihidrocarbamazepina (inactivo). Alrededor del 25% de la dosis administrada es excretada en orina en su forma hidroxilada,

mientras que un 30% es eliminada en heces. Las concentraciones plasmáticas efectivas se encuentran en el rango 4 – 12 µg/ml, correspondientes a dosis orales diarias de entre 8 a 30 mg/kg. Por otro lado, los valores reportados de vida media plasmática, volumen de distribución y clearance plasmático han sido de 18 – 65 h (para dosis únicas, aunque en tratamientos crónicos este tiempo se reduce a aproximadamente 10 – 30 h en adultos por el ya mencionado efecto inductor metabólico), y alrededor de 1,4 L/kg y 1,3 ml/min/kg, respectivamente (Moffat et al. 2011). Por último, existen reportes contradictorios respecto a la clasificación de CBZ como sustrato (o no) de transportadores de eflujo, P-gp en particular. Mientras que algunos autores la describen como sustrato (Kwan et al. 2001; Potschka et al. 2001), otros trabajos en el área reportan el resultado contrario (Baltes et al. 2007; Owen et al. 2001).

Como se mencionó en el capítulo 1, una de las hipótesis más estudiadas sobre la refractariedad de fármacos antiepilépticos es la sobreexpresión de transportadores de eflujo sobre el endotelio vascular cerebral. La sobreexpresión de los mismos hace necesario el uso, en algunos casos, de elevadas dosis del fármaco para lograr su efecto terapéutico, con los consecuentes efectos adversos debido al uso de elevadas dosis. Dado que CBZ es uno de los fármacos antiepilépticos de primera elección en la práctica clínica actual (Asconapé 2010), de bajo costo, baja solubilidad acuosa y farmacocinética no lineal, con existencia de un metabolito activo, se decidió comenzar con el desarrollo de nanovehículos farmacéuticos de base lipídica capaces de encapsular CBZ, para así evaluar posibles ventajas o mejoras de este sistema frente a las formas farmacéuticas tradicionales, con potencial aplicación en casos de farmacorresistencia.

2.1 Materiales y métodos

Reactivos

Para la preparación de las formulaciones se utilizaron dos lípidos sólidos a temperatura ambiente (ceras): miristil miristato (cera, Crodamol[®] MM, punto de fusión de alrededor de 41 °C) y cera de esteres cetílicos NF (cera, Crodamol[®] SS, temperatura de fusión de alrededor de 44 °C). En algunas formulaciones también se incluyó un aceite compuesto por triglicéridos de cadena media (aceite, Crodamol[®] GTCC-LQ, punto de fusión de -4°C). Los tres materiales fueron donados por Croda (Argentina). Otros reactivos empleados fueron: agua destilada, agua calidad HPLC y agua ultrapura Mili-Q, CBZ (98,1% sobre droga tal cual -*sdtc*- droguería Saporiti, Argentina) y Pluronic F68 (Kolliphor[®] P188, Sigma-Aldrich, Argentina). El resto de los reactivos y solventes utilizados fueron de calidad HPLC o analítica, según el caso.

2.1.1 *Cuantificación de CBZ en las formulaciones*

Se aplicó un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Gilson, equipado con un sistema de bombeo doble (modelo 322 – H2), un detector UV-Visible (modelo 156), una interfaz modelo 506C y una estación de trabajo operada con el software UniPoint LC versión 3.3 (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia). Se utilizó un inyector manual Rheodyne, modelo 7725, con loop fijo de 20 µl (Rheodyne, CA, EE.UU.).

Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrosphere[®] 100 RP18, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió de una mezcla

de buffer KH_2PO_4 (10 mM, pH 7,0): metanol en una proporción 30:70 (en volumen), desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 μm . Se trabajó de manera isocrática y a temperatura ambiente, con un flujo de 1 ml/min y detección UV a 285 nm. Por último, se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

Validación del método analítico

La validación del método analítico para la cuantificación de CBZ comenzó con la preparación de 3 soluciones madre o stock, de la siguiente manera: se pesaron exactamente alrededor de 10 mg de CBZ sustancia de referencia (SR; título: 98,1% sdtc) por triplicado. Se colocó cada alícuota en un matraz aforado de 100 ml, se agregaron 50 ml de fase móvil premezclada y se sonicó hasta disolución completa del sólido. Una vez a temperatura ambiente, se completó a volumen con el mismo medio. A partir de cada una de esas soluciones stock se realizaron diluciones con fase móvil para obtener soluciones con las siguientes concentraciones teóricas: 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron, por lo tanto, 3 réplicas independientes por cada nivel de concentración (una de cada solución stock). Con estas soluciones se evaluó la linealidad, el rango y la precisión del método analítico, así como también la precisión del sistema cromatográfico empleado.

2.1.2 Preparación de nanosistemas lipídicos de CBZ

Se prepararon nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y vehículos nanoestructurados (NLC), ambos conteniendo CBZ, con pequeñas variaciones de composición entre sí (**Tabla 2.2**). Por otro lado, y con el objetivo de evaluar posibles mejoras en relación a la solubilización de CBZ y capacidad de carga de las NP, se ensayó el efecto de la incorporación de CBZ previamente disuelta en

dimetilsulfóxido (DMSO). Si bien es siempre recomendable evitar el uso de solventes orgánicos cuyas trazas pudieran generar algún efecto tóxico agudo o crónico, el DMSO es clasificado como solvente de clase 3 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5) 2011) y por lo tanto reconocido como solvente que no genera daños sobre la salud humana a los niveles usualmente aceptados en la industria farmacéutica. Dado que la cantidad de DMSO utilizada en cada formulación fue considerablemente inferior a la exposición diaria permitida¹⁰, se decidió continuar con estas mismas formulaciones (Food and Drug Administration (FDA) 2018).

La síntesis de cada uno de los sistemas nanoparticulados se realizó utilizando la técnica de homogeneización por ultrasonido: Para cada síntesis, una cantidad determinada de cera (**Tabla 2.2**) se colocó en un vaso de precipitados de 20 ml y se llevó a un baño de agua termostatzado a 70 °C. En cuanto a la cantidad de lípido sólido utilizada, si bien inicialmente se emplearon 200 mg, la incompleta disolución de la CBZ (cuando ésta se incorporaba en su forma sólida) en la matriz lipídica fundida hizo necesario el aumento de dicha cantidad a 400 mg de lípido sólido. Simultáneamente se preparó una solución al 3,0% p/v del tensioactivo Pluronic F68 en agua, la cual se colocó en el mismo baño que la cera para mantener a ambas fases a la misma temperatura. Una vez fundida la fase lipídica, y sólo en el caso de las NLC, se agregaron 12 µl de aceite antes de la incorporación de la droga. Luego se agregó una cantidad de CBZ (ya sea en forma sólida o previamente disuelta en DMSO) a la fase lipídica y se dejó reposar durante unos 5 o 30 minutos. Pasado este tiempo, la solución de tensioactivo fue incorporada

¹⁰ La exposición diaria permitida (PDE) para el DMSO es de 50 mg/día (Food and Drug Administration (FDA) 2018) (Food and Drug Administration (FDA) 2018), muy por encima de las cantidades utilizadas en las formulaciones desarrolladas.

sobre la fase lipídica y la mezcla fue inmediatamente llevada al sonicador. Para esta etapa de la síntesis se usó un sonicador de alta frecuencia, operando al 90% de su potencia, durante 50 minutos (130 W, Cole-Parmer, USA), utilizando una punta de titanio de 3 mm como generadora de vibraciones mecánicas productoras de pequeñas cavidades de vacío, capaces de formar ondas de choque microscópicas. Este fenómeno, denominado cavitación, entrega la energía suficiente para la formación de las nanopartículas lipídicas (Siddiqui et al. 2014). Terminado el proceso de sonicado, las formulaciones fueron colocadas en un baño de agua a temperatura ambiente.

Medida de la eficiencia de encapsulación porcentual y capacidad de carga de los nanovehículos

Para todas las formulaciones ensayadas, se midió la eficiencia de encapsulación (EE%) y la capacidad de carga (DL%, *drug loading*) porcentuales. La EE% se define como la cantidad de fármaco (%) que ha quedado incorporado dentro de la matriz lipídica luego de la síntesis, respecto a la cantidad de fármaco total añadida al inicio de la misma (Lv et al. 2018). Es decir que EE% se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$EE\% = \frac{W_0 - W_f}{W_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Donde W_0 es la cantidad total de fármaco inicialmente agregada a la mezcla de síntesis y W_f es la cantidad de fármaco en solución (no incorporado) presente en el producto final. Este último término puede definirse como:

$$W_f = C_f \times V_f \quad (2.2)$$

Donde C_f y V_f son la concentración de fármaco en solución y el volumen final de suspensión medido luego de la síntesis, respectivamente. Por su parte, la capacidad de carga se define como:

$$DL\% = \frac{\text{masa de fármaco incorporado (mg)}}{\text{masa de lípido (mg)}} \times 100 \quad (2.3)$$

La separación del fármaco libre en solución de cada una de las formulaciones se realizó por el método de ultrafiltración por centrifugación. Para ello se utilizaron filtros para centrífuga Microcon[®] de 10 kDa de tamaño de poro (equivalente a 2,9 nm (Guo & Santschi 2007)): se tomaron 0,5 ml de muestra de cada formulación, se colocaron en los filtros y los mismos se sometieron a centrifugación a 12000g por 15 minutos. Luego, se tomaron 10 µl del filtrado y se llevaron a 100 µl finales con fase móvil para su posterior análisis por HPLC. El resumen de todas las formulaciones sintetizadas junto con los EE% y DL% puede verse en la **Tabla 2.2.**

2.1.3 Caracterización fisicoquímica

Distribución de tamaño de partículas, potencial zeta e índice de polidispersión

La distribución de tamaño de partícula y el diámetro promedio fueron medidos por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, *dynamic light scattering*) utilizando el equipo Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) a 25 °C en cubetas de poliestireno con un camino óptico de 10 mm. El potencial zeta fue determinado por anemometría Doppler empleando el mismo equipo. Las medidas fueron realizadas en celdas capilares de 10 mm de camino óptico y en agua Mili-Q como medio. Por último, se determinó el índice de polidispersión (PDI, *polydispersity index*) como medida adimensional de la distribución de tamaños. Todas las medidas fueron llevadas a cabo por triplicado.

Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

El análisis por TEM se realizó en un microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, Columbia, MD, USA) a partir de diluciones 1:100 en agua Mili-Q de cada una de las formulaciones a analizar, colocando 10 μ l de cada dilución en grillas de Cu recubiertas con colodión, de 400 mesh. Luego, se retiró el excedente de líquido y se añadió una gota de ácido fosfotúngstico a la grilla para mejorar el contraste, y se dejó incubar por 1 minuto a 25 °C. Por último, el exceso de líquido de contraste fue removido y las muestras fueron secadas a temperatura ambiente para realizar la medida. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, NIH, Maryland, USA).

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Nuevamente, se trabajó a partir de diluciones 1:1000 de cada una de las formulaciones seleccionadas, las cuales fueron colocadas en distintas placas de mica recientemente escindidas. Para la fijación de la muestra se colocaron 10 μ l de una solución de Cl_2Ca (10 mM). Luego de 15 minutos, las placas fueron lavadas con agua Mili-Q y el exceso de líquido removido con papel de filtro (Whatman, Alemania).

Todas las imágenes fueron obtenidas a temperatura ambiente utilizando el equipo Multimode-Nanoscope V (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) operando con modo “tapping” (de pulsos repetitivos) con una punta de silicio modelo RTesp-Bruker (frecuencia de resonancia del cantiléver: 300 kHz; fuerza constante de 42 N/m; radio del tip de 8 – 12 nm) con rango de escaneo típico de 1 Hz.

Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis calorimétrico por DSC (*differential scanning calorimetry*) de las formulaciones seleccionadas se realizó utilizando un equipo Perkin-Elmer modelo Parys 1 (PerkinElmer INC., Waltham, MA, USA), bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en el rango de 25 – 260 °C. Para este ensayo se utilizaron celdas de aluminio y se pesaron alrededor de 5 mg de cada muestra seca (por lo que las formulaciones debieron ser congeladas liofilizadas durante 24 hs antes del ensayo). El cambio porcentual en el índice de cristalinidad (IC, %) luego de las síntesis (respecto del lípido sólido utilizado como excipiente en la formulación) se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Makwana y colaboradores (Makwana et al. 2015):

$$IC\% = \frac{\Delta H_{dispersión\ de\ nanopartículas} [J \cdot g^{-1}]}{\Delta H_{lípido\ sólido} [J \cdot g^{-1}] \times C_{fase\ lipídica} [\%]} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde $\Delta H_{dispersión\ de\ nanopartículas}$ corresponde al calor de fusión del lípido cuando forma parte de las nanopartículas, $\Delta H_{lípido\ sólido}$ es el calor de fusión del lípido puro, y $C_{fase\ lipídica}$ es la concentración de lípido, en porcentaje, dentro de la formulación final. El ΔH se calculó como el área bajo la curva del gráfico de flujo de calor (J/s · g) vs tiempo (s) utilizando el software Origin 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU) para el análisis.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Para evaluar la estabilidad térmica de las formulaciones, se realizó un análisis termogravimétrico (TGA, *thermogravimetric analysis*) utilizando el equipo TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Se pesaron con precisión muestras de entre 6 – 12 mg en bandejas de platino, y las medidas fueron realizadas bajo

atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en el rango de temperaturas 30 – 600 °C.

Análisis por difracción de rayos X (XRD)

El análisis por XRD (*X-ray diffraction*) permitió estudiar las características de la estructura cristalina de las nanopartículas. Se utilizó un difractómetro PANanalytical X'Pert PRO equipado con una fuente de rayos X (PANanalytical, Philips PW 1830, Países Bajos) con radiación CuK α a 40 kV y 40 mA. Los datos del espectro de difracción de cada una de las muestras fueron recogidos en el rango 2 θ de 2 – 60° con intervalos de 0,02°.

2.1.4 Ensayos de liberación in-vitro

La evaluación de la cinética de liberación de CBZ a partir de las diferentes formulaciones se realizó en el aparato 2 (paletas) USP, empleando un equipo Hanson Vision Classic 6 (Hanson Research, Chatsworth, CA, USA). Dado que para la construcción de los perfiles de liberación de CBZ es necesario cuantificar el fármaco libre en el medio de disolución, se emplearon membranas de diálisis para contener las muestras con un tamaño de corte de 12 kDa, adecuado para impedir la salida de las nanopartículas (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para ello, las membranas se hidrataron en agua HPLC durante al menos 12 h previas a la realización del ensayo. A continuación, se cortaron trozos de las membranas en los que se colocaron 5 ml de cada formulación a ensayar, y se sellaron con broches para membranas de diálisis (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Por último, las membranas selladas fueron adosadas a las paletas del disolutor como se muestra en la **Figura 2.3**.

Como medio de disolución se utilizaron 500 ml de buffer KH_2PO_4 50 Mm (pH = 6,8), filtrado y desgasificado con filtros de nylon de 0,45 μm . La temperatura del baño se fijó en $37,0 \pm 0,5$ °C y la velocidad de rotación de las paletas fue de 100 rpm.

Al comenzar el ensayo (tiempo 0), las paletas junto con las membranas conteniendo la muestra fueron sumergidas en cada vaso y se activó la agitación. Dado que el equipo consta de 6 vasos, se ensayaron simultáneamente cuatro formulaciones más la droga libre (5 vasos, 1 libre) a manera de control (CBZ libre a la misma concentración teórica que las nanopartículas en estudio). Se realizaron dos ensayos (duplicados). Se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares durante 24 h (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 23; 24 h), las cuales fueron centrifugadas inmediatamente a 700g. La cantidad de CBZ liberada fue determinada espectrofotométricamente a 285 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Helios Beta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Figura 2.3 | Adaptación del aparato 2 (paletas) para la sujeción de los sacos de muestras formados por las membranas de diálisis.

Posteriormente, se realizó el ajuste de los datos a los modelos matemáticos que se describen a continuación, desarrollados o comúnmente aplicados para explicar la cinética de liberación de fármacos desde diferentes formas farmacéuticas, utilizando el complemento de Excel DDSolver (Zhang et al. 2010).

El modelo matemático que describe la cinética de primer orden implica que la velocidad instantánea de liberación del fármaco a partir de la formulación es proporcional, a un tiempo dado, a la cantidad de fármaco remanente en la formulación, es decir:

$$\frac{dQ_t}{dt} = -KQ_t \quad (2.5)$$

donde Q_t representa la cantidad de fármaco liberado a tiempo t , y K corresponde a la constante de proporcionalidad de primer orden. Bajo la aproximación de que K es independiente del tiempo, e integrando entre $[t = 0; Q = Q_0]$ y $[t = t; Q = Q_t]$, la Ec. 2.5 puede re-escribirse como:

$$Q_t = Q_0 e^{-K.t} \quad (2.6)$$

donde Q_0 es la cantidad inicial de fármaco encapsulado en la formulación. Dado que la ecuación 2.6 predice un decaimiento exponencial, es necesario expresarla en términos de masa o concentraciones disueltas (M) para obtener una expresión que acorde a la forma típica de los perfiles de disolución. Para ello, consideremos que la masa inicial Q_0 es completamente liberada a $t = \infty$ (la llamaremos M_∞), y que la masa remanente a tiempo t no es otra cosa que $Q_t = (M_\infty - M_t)$, donde M_t es la masa liberada a tiempo t . Reemplazando en 2.6 y reordenando, se llega al modelo ajustado:

$$M_t = M_\infty(1 - e^{-K.t}) \quad (2.7)$$

Otro modelo es el de Hopfenberg, quien estudió diferentes dispositivos de administración de fármacos erosionables de diversas geometrías (placas, esferas y cilindros infinitos) donde la velocidad de difusión del fármaco en una matriz polimérica es lenta en comparación con la disolución del polímero (sistemas controlados por erosión) y derivó una ecuación general de la forma (Hopfenberg & Hsu 1978):

$$M_t = M_\infty [1 - (1 - K_{HP} \cdot t)^d] \quad (2.8)$$

donde la constante K_{HP} engloba a la constante de velocidad de erosión, la concentración inicial (homogénea) de fármaco en la matriz y el espesor del film (o radio inicial de la esfera o el cilindro). El exponente d toma valores de 1 para un reservorio de geometría plana (film), 2 para un cilindro o 3 para una esfera.

Otro modelo mecanicista evaluado fue el de Baker y Lonsdale (Baker & Lonsdale 1974), el cual es una extensión a la geometría esférica del modelo inicialmente desarrollado por Higuchi (Higuchi 1961) para geometrías planas. Ambos modelos describen la liberación de un compuesto a partir de una matriz en la que dicho compuesto se encuentra inicialmente en fase sólida, homogéneamente disperso:

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = K_{BL} \cdot t \quad (2.9)$$

donde M_t corresponde a la cantidad de fármaco liberado al tiempo t , M_∞ representa la cantidad de droga liberada a tiempo infinito y K_{BL} es la constante de liberación.

Se evaluó también el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer & Peppas 1981), también conocido como modelo de Peppas, de Ritger-Peppas o simplemente como ley de potencia). Este modelo describe la liberación de

fármacos de los sistemas de administración de fármacos poliméricos mediante una relación simple entre la liberación fraccionada del fármaco y alguna potencia del tiempo de liberación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \cdot t^n \quad (2.10)$$

donde K_{KP} es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica y n es el exponente de liberación, el cual indica el mecanismo de liberación del fármaco. Cuando la liberación del fármaco se rige exclusivamente por la difusión (liberación de Fickian, la cual implica que el fármaco no se encuentra en estado sólido), los autores encontraron que n tendrá un valor de 0,43 para las geometrías esféricas, mientras que valores de n entre 0,43 y 1 serían indicativos de mecanismos mixtos de liberación (por ejemplo, difusión más relajación del polímero). El valor $n = 1$ corresponde a una cinética de orden cero (Ritger & Peppas 1987).

Por último, se consideró también el modelo propuesto por Hixson-Crowell (Hixson & Crowell 1931), el cual asume que la limitante en la liberación del fármaco es la velocidad de disolución y no la difusión y parte de la idea de que el área de un grupo de partículas es proporcional a la raíz cúbica de su volumen. En términos matemáticos, este modelo establece que:

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_i} + K_{HC} \cdot t \quad (2.11)$$

donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en el sistema, W_i es la cantidad de fármaco remanente al tiempo t y K_{HC} es la constante de incorporación, la cual relaciona el área con el volumen de las partículas. Si a la Ec. (2.11 se la divide por $\sqrt[3]{W_0}$, es posible simplificarla a la expresión:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - (1 - K_{HC} \cdot t)^3 \quad (2.12)$$

Si bien este último modelo no sería adecuado para explicar o describir la liberación de un fármaco disperso en una matriz lipídica, el mismo se incluyó a modo de criterio negativo, es decir, el ajuste de los datos a la Ec. (2.12) podría estar indicando una falla tecnológica del sistema (presencia de droga sólida en el medio de liberación y/o pérdida de la integridad de las nanopartículas).

2.1.5 Estudios de permeabilidad a través de monocapa celular

Para este ensayo se utilizaron células MDCK – MDR1 (*Madin-Darby canine kidney cells*), es decir, células epiteliales de riñón canino transfectadas con el gen MDR1 humano (ABCB1) que codifica para la expresión de la proteína de eflujo P-gp (Amsterdam, Países Bajos) (Feng et al. 2019). Junto con la línea celular Caco-2, las células MDCK son las más extensamente usadas para evaluar la permeabilidad *in-vitro*. Bajo condiciones de cultivo standard, las células MDCK desarrollan uniones estrechas y forman una monocapa celular polarizada (Volpe 2011). Dado que las células MDCK – MDR1 utilizadas sobreexpresan P-gp humana, los coeficientes de permeabilidad aparentes observados (P_{app}) permiten reflejar la posible contribución de la P-gp en el transporte de fármacos a través de células epiteliales (Glavinas et al.; Talevi & Bruno-Blanch 2012).

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 cm² usando DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% de amino ácidos no-esenciales, penicilina y estreptomicina a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células fueron divididas 2 veces por semana a una confluencia del 70 – 80% en una proporción de 1:20 o 1:30 usando solución tripsina – EDTA (0,25%). Todos

los ensayos de permeabilidad fueron realizados con células correspondientes a los pasajes 19 – 43. Las células fueron mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂.

Para el ensayo de permeabilidad, se utilizaron placas de 6 well Costar Snapwell (Corning INC., Corning, NY, USA) con insertos de membrana de policarbonato (de aproximadamente 1,12 cm² según fabricante). Las células fueron sembradas con una densidad de 50000 células por inserto y cultivadas por 4 días en medio de cultivo, el cual fue reemplazado cada día. El volumen del medio en la zona apical fue de 0,5 ml mientras que en la zona basal fue de 2 ml. La integridad de la monocapa celular fue determinada a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, $\Omega \cdot \text{cm}^2$) utilizando un voltímetro epitelial (Millicell-ERS, Millipore Corporation).

El día del ensayo, el medio de cultivo fue removido, y las células fueron lavadas tres veces usando medio de transporte (solución salina equilibrada de Hanks, HBSS, a pH 7,4). Los insertos conteniendo la monocapa celular fueron colocados una cámara Ussing y mantenidos a 37 °C bajo aireación constante con gas carbógeno. Las formulaciones a ensayar fueron previamente diluidas en buffer Hanks hasta una concentración teórica de CBZ de 1,0 mM, y colocadas en la cámara apical (4,0 ml). A los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos, se tomaron alícuotas de 400 μl del compartimiento basolateral seguido de la adición de 400 μl de medio de transporte fresco (muestreo con reposición). Como control, se utilizó una solución de CBZ libre de la misma concentración.

Las muestras fueron cuantificadas utilizando el método por HPLC descrito en la sección 2.1.1. Por último, la permeabilidad aparente (expresada en cm/min) fue calculada utilizando la siguiente expresión:

$$P_{app} = \frac{1}{A \cdot C_0} \times dQ/dt \quad (2.13)$$

Donde A es el área superficial de la membrana ($1,12 \text{ cm}^2$, para cámaras Snapwell®), C_0 es la concentración inicial en el compartimiento donador al tiempo cero y dQ/dt es la cantidad de fármaco transportado por unidad de tiempo (en mg/min) dado. La cantidad dQ/dt se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de Q (mg CBZ) vs t (min).

2.1.6 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad de las formulaciones seleccionadas fueron realizados en las condiciones propuestas de almacenamiento, es decir conservación en heladera. Para ello, las muestras fueron mantenidas a $2-8^\circ\text{C}$ en viales de vidrio (se utilizaron viales individuales para cada réplica y cada tiempo considerados). Inmediatamente luego de la síntesis de cada formulación y cada 30 días durante 120 días, el $\text{EE}\%$, tamaño de partícula, PDI y potencial Z fueron evaluados utilizando los procedimientos descriptos en las secciones anteriores.

2.1.7 Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones

Los ensayos farmacológicos se realizaron siguiendo los estándares provistos por el Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivos (ADD, *Anticonvulsant Drug Development*) del Instituto Nacional de Desórdenes y Ataques Neurológicos y de la Comunicación (NINDS, *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, NIH, *National Institute of Health*, USA) (Stables & Kupferberg) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (Protocolo N° 018-06-15, **Anexo III**).

Se trabajó con ratones Swiss Albino machos de entre 18 y 25 g al momento de los ensayos, provistos por la Facultad de Veterinaria, UNLP. Los ratones fueron

alojados en jaulas colonia conteniendo un máximo de 10 ratones por jaula, con temperatura ambiente controlada a 20-22 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 hs y provistos de alimento y agua *ad libitum*. La adaptación de los animales al nuevo ambiente se llevó a cabo durante 5 días y consistió en la administración por vía intraperitoneal (ip) de 0,1 ml de solución fisiológica (SF) a cada animal, por día.

Se utilizó la técnica de convulsiones máximas por electrochoque (MES, *maximal electroshocks seizure*) administrando un estímulo eléctrico de 60 Hz/50 mA por un lapso de 0,2 segundos a cada ratón, vía electrodos con clip para orejas conectados a un dispositivo electro-convulsivo Ugo Basile (Ugo Basile SRL, Germonio, Italia). Para asegurar un contacto eléctrico adecuado, se aplicó gel de alta conductividad a cada electrodo antes de su colocación. En estas condiciones, las convulsiones máximas son producidas en virtualmente todos los ratones y consisten, típicamente, en un período corto de flexión tónica seguido por un período más largo de extensión tónica de las patas traseras con un episodio clónico final. Es considerado como punto final, para la protección anticonvulsivante, la inhibición de la extensión tónica de las patas traseras por encima de los 90° respecto al ángulo formado entre éstas y el torso.

Se ensayaron 2 tipos de controles: un control positivo (solución de CBZ en PEG 30 mg/kg) y dos controles negativos (SF y las formulaciones seleccionadas sin fármaco, es decir, vehículo solo). La actividad anticonvulsivante fue evaluada a los 15, 30, 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración. Tanto la droga libre como las formulaciones de CBZ se administraron a una dosis de 30 mg/kg por vía ip. (DE50 CBZ en ratones para ensayo MES es de 8,81 mg/kg (Enna & Bylund 2011)).

Adicionalmente, y para evaluar posibles efectos neurotóxicos de las formulaciones administradas, se realizó el test de RotoRod a cada tiempo de evaluación (y previo al ensayo MES) colocando a cada ratón en una barra rotativa. Un ratón normal puede mantener el equilibrio en una barra que gira a 6 rpm por largos períodos de tiempo. Alguna falla a la hora de mantener el equilibrio durante 1 minuto es una indicación de déficit neurológico (Stables & Kupferberg).

2.1.8 *Análisis estadístico*

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un mínimo de 3 réplicas independientes. En los casos en que se realizó un mayor número de réplicas, el mismo estará especificado en la sección correspondiente. Acorde al número de grupos a comparar, se empleó la prueba t de Student (2 grupos) o el análisis de la varianza (ANAVA, para más de 2 grupos, seguido por la comparación de medias por test de Tukey –todas las medias- o Dunnet –medias vs. el control-). En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de 0,05 (alfa). Previo a cada análisis paramétrico, los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron chequeados (tests de Shapiro-Wilks y F/Levene, respectivamente). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Validación del método analítico

Se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentraciones consideradas (entre 1 – 50 µg/ml), con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,99985$. La ordenada al origen (a) con su correspondiente intervalo de confianza al 95% fue de $0,0572 \pm 0,1976$. El análisis de la varianza de los datos mostró una relación lineal significativa, con ajuste al modelo lineal ($p < 0,05$). En la **Tabla 2.1** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de linealidad realizado en soluciones de CBZ en el rango propuesto. La sumatoria de residuos fue de $6,3727 \times 10^{-14}$ (aproximadamente cero), los cuales se encontraban aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

Tabla 2.1 | Resultados del ensayo de linealidad para muestras de CBZ. Se ensayaron 3 réplicas independientes a 7 niveles diferentes de concentración (N=21) dentro del rango indicado.

Coefficiente	Estimado	E.E	LI(95%)	LS(95%)
Pendiente (b)	0,057	0,094	-0,140	0,255
Ordenada (a)	1,235	0,003	1,227	1,242

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Concentración	9750,34	1	9750,34	$1,3 \times 10^5$	<0,0001
Error	1,32	19	0,069		
Falta de ajuste	0,61	5	0,122	2,42	0,088
Error puro	0,71	14	0,051		
Total	9780,47	20			

E.E: error estándar; LI(95%): límite inferior del intervalo de confianza al 95%; LS(95%): límite superior del intervalo de confianza al 95%; F.V: fuente de variación; SC; suma de cuadrados; gl; grados de libertad; CM: cuadrados medios.

La precisión del sistema fue determinada calculando el coeficiente de variación porcentual (CV%) para inyecciones repetidas de una misma muestra (N = 6),

obteniendo un resultado de 0,15%. Por otro lado, la precisión del método analítico para cada nivel de concentración en estudio expresada como CV% ($n = 3$), fue $< 1\%$ en todos los casos, excepto para las concentraciones . La especificidad del método fue evaluada por verificación de ausencia de interferencias al tiempo de retención del fármaco, observándose que ningún componente de la formulación y/o impureza poseía un tiempo de retención similar al mismo.

2.2.2 Preparación y eficiencia de encapsulación de las formulaciones

Tanto las SLN como los NLC fueron preparadas con diferentes tipos y cantidades de lípidos, cambiando la relación tensioactivo/lípido y la cantidad inicial de CBZ (ver **Tabla 2.2**). En la tabla se indican aquellas formulaciones en las que la CBZ fue previamente disuelta en una mínima cantidad de DMSO (50 μ l cada 5 mg de CBZ). De los lípidos utilizados, la cera de ésteres cetílicos (SS) como componente principal de la formulación, produjo los mayores EE%, comparados con las formulaciones conteniendo el lípido miristil miristato (MM). Por esta razón, sólo las formulaciones conteniendo SS fueron seleccionadas para los futuros ensayos (F8-15). En cada caso, el agregado de 12 μ l de aceite, para generar los vehículos nanoestructurados, resultó en una leve mejora en la encapsulación. Como puede verse en la tabla, al aumentar la cantidad de CBZ en la formulación, en el caso de las SLN y SLN DMSO, se produjo una leve disminución del %EE. Dicha tendencia no se verificó en el caso de las NLC DMSO, donde las formulaciones presentaron el mismo %EE en términos estadísticos, en general superiores a las SLN. Por otra parte, el aumento del tiempo de permanencia de CBZ o CBZ-DMSO en el lípido o mezcla de lípidos fundidos permitió mejorar los %EE de todas las formulaciones. En este punto cabe remarcar, que todos los nanovehículos lipídicos formulados mostraron tener mayores EE% que en otros trabajos publicados a la fecha (Nair et al. 2012; Qushawy et al. 2019).

Tabla 2.2 | Resumen de las distintas formulaciones evaluadas con sus correspondientes valores de EE y DL%. En el caso de las formulaciones 1 – 7, la CBZ (sea en su estado sólido o disuelta en solvente orgánico) fue dejada en contacto con en el lípido fundido durante 5 minutos; en las formulaciones 8 – 15 ese tiempo se aumentó a 30 minutos.

Formulación Nº	Crodamol MM (mg)	Crodamol SS (mg)	Crodamol GTCC-LQ (µl)	Pluronic F68 (mg)	DMSO (µl)	CBZ (mg)	Tiempo en reposo (min)	EE (%) [*]	DL (%)
1	400	-	-	600	-	5	5	68,4	0,86
2	400	-	-	600	50	5	5	83,7	1,05
3	400	-	12	600	-	5	5	79,2	0,99
4	400	-	12	600	50	5	5	66,8	0,84
5	-	400	-	600	-	5	5	64,1	0,80
6	-	400	-	600	50	5	5	90,5	1,13
7	-	400	12	600	50	5	5	74,9	0,94
8	-	400	-	600	-	5	30	95,3 (0,6) ^d	1,19
9	-	400	-	600	-	25	30	89,3 (3,2) ^a	5,58
10	-	400	-	600	50	5	30	95,6 (0,4) ^d	1,20
11	-	400	-	600	150	15	30	91,1 (1,1) ^{abc}	3,42
12	-	400	-	600	200	20	30	90,8 (2,1) ^{ab}	4,54
13	-	400	12	600	-	5	30	94,8 (0,6) ^d	1,19
14	-	400	12	600	50	5	30	94,7 (1,0) ^{bcd}	1,18
15	-	400	12	600	250	25	30	96,5 (0,3) ^d	6,03

^{*} Los valores corresponden a el valor medio ($n=3$) y la desviación estándar (SD). Las medias con letras similares indican que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Tukey).

Nota: las filas marcadas con gris oscuro corresponden a las formulaciones seleccionadas para las caracterizaciones fisicoquímicas y demás ensayos.

A partir de los datos obtenidos, se decidió continuar la caracterización fisicoquímica de los sistemas SLN-CBZ (F8), SLN-CBZ (DMSO) (F10), NLC-CBZ (F13) y NLC-CBZ (DMSO) (F14), conteniendo 5 mg de CBZ.

Las formulaciones con mayor cantidad de CBZ (F9, F11, F12 y F15) fueron preparadas para ser utilizadas en aquellos ensayos que, por poseer una limitación en el volumen máximo a utilizar (*ej.* ensayo de permeabilidad en monocapa celular, ensayo de actividad biológica *in vivo*), requieren de una cantidad mayor de CBZ en el mismo volumen de formulación¹¹.

2.2.3 Caracterización de las nanopartículas por DLS, DSC, TGA y XRD

Los resultados obtenidos a través del análisis por DLS no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el diámetro medio entre las formulaciones seleccionadas, las cuales, además, mostraron tener una distribución de tamaño estrecha alrededor de los 160 nm (**Tabla 2.3**). El potencial Z de todas las formulaciones se encontró en el rango de -2,4 y -6,3 mV, con los mayores valores (en valor absoluto) correspondientes a los vehículos nanoestructurados. A pesar de estos bajos valores de potencial Z, los cuales no alcanzarían para estabilizar eléctricamente a las partículas en suspensión, las suspensiones resultaron estables y sin formación de agregados por al menos 3 meses de tiempo (sección 2.2.6). Este resultado puede explicarse considerando la presencia del surfactante no-iónico utilizado (Pluronic F68), el cual es capaz de generar estabilización por impedimento estérico, evitando la aglomeración de partículas individuales (Chirio et al. 2019). Es decir, se trataría de un mecanismo mixto de estabilización, tanto eléctrica como estérica. Por último, en todos los casos el valor de PDI se encontró

¹¹ Sólo aquella formulación que mostró las mejores características y mejor desempeño *in-vitro* fue evaluada *in-vivo* (F14-F15, ver sección correspondiente).

por debajo del límite máximo de 0,3 como para considerar a las suspensiones como mono-dispersas [25, 26].

Tabla 2.3 | Tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión de las formulaciones seleccionadas. La tabla presenta los valores medios ($n = 3$) $\pm$ su desviación estándar.

Formulación	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
SLN-CBZ	$164,3 \pm 2,7$	$-6,0 \pm 1,4$	$0,15 \pm 0,01$
SLN-CBZ (DMSO)	$164,1 \pm 4,6$	$-6,3 \pm 2,2$	$0,16 \pm 0,02$
NLC-CBZ	$164,0 \pm 3,2$	$-2,4 \pm 0,5$	$0,17 \pm 0,01$
NLC-CBZ (DSMO)	$161,8 \pm 3,0$	$-4,1 \pm 2,2$	$0,17 \pm 0,01$

La caracterización térmica de las nanopartículas por DSC y TGA permitió establecer posibles cambios en el grado de cristalinidad de los componentes luego de la incorporación del fármaco. En la **Figura 2.4** se muestran los espectros térmicos (termogramas) superpuestos, obtenidos por DSC, correspondientes a CBZ (fármaco puro), Pluronic F68, SLN (vehículo), SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO) y NLC-CBZ (DMSO). Todas las formulaciones mostraron un pico endotérmico en el rango de temperaturas de 44 – 49 °C correspondiente al punto de fusión de las ceras y del Pluronic F68. Por otro lado, en el termograma de la

CBZ pura se observa un pico endotérmico característico alrededor de su punto de fusión (~ 192 °C). La ausencia (en el caso de las formulaciones) del pico correspondiente al punto de fusión de CBZ, podría considerarse como evidencia de que el fármaco se encuentra molecularmente disperso dentro de la matriz lipídica o en un estado amorfo, lo cual puede ser explicado a partir de la disolución de la CBZ en el lípido fundido durante la síntesis, previo a la formación de las nanopartículas (Rodenak-Kladniew et al. 2017).

El índice de cristalinidad IC (%) de las formulaciones fue calculado acorde a la expresión 2.4. Dado que el componente principal de la cera de ésteres cetílicos es cetil palmitato (Tinto et al. 2017), se tomó este lípido como referencia para el cálculo, donde $C_{fase\ lipídica} = 2\%$ (p/p).

Como se muestra en la **Tabla 2.4**, los valores del IC (%) del lípido en las formulaciones decrecen en comparación al cetil palmitato puro, sobre todo en aquellas formulaciones que contienen lípido líquido y DMSO. Este resultado puede ser atribuido al hecho de que la adición de éstos últimos genera una menor rigidez de la matriz lipídica respecto de cuando éstos no son agregados. En concordancia con lo anteriormente dicho, las entalpías de fusión (calculadas a través de la medición del área bajo la curva) muestran menores valores respecto al excipiente puro, sugiriendo una estructura menos ordenada y rígida y, consecuentemente, la necesidad de menores energías para vencer las fuerzas de red (Pople & Singh 2006).

Tabla 2.4 | Propiedades térmicas de la CBZ, cetil palmitato puro, y nanopartículas [SLN, SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO) y NLC-CBZ (DMSO)]: entalpía de fusión (ΔH_f), temperatura de fusión (T_f) e índice de cristalinidad (IC%)

Muestra	T_f (°C)	ΔH_f (J · g ⁻¹)	IC%
Cetil palmitato	49,2	192,12	100,0
CBZ	190,0 - 192,0	108,00	100,0
SLN	42,9 - 48,3	102,26	22,3
SLN-CBZ	44,2 - 49,6	120,03	26,2
SLN-CBZ (DMSO)	44,5 - 49,7	105,16	22,9
NLC-CBZ (DMSO)	44,6 - 49,8	88,89	19,4

Figura 2.4 | Termogramas por DSC de CBZ, SLN (vehículo), SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO), NLC-CBZ (DMSO) y Pluronic F68.

Complementariamente, se llevó a cabo un análisis por termogravimetría para visualizar los cambios en las propiedades térmicas de las nanopartículas debidos a la incorporación de CBZ (**Figura 2.5 A y B**). La descomposición térmica de CBZ procede en dos tapas de pérdida de masa en el rango de 188 a 342 °C en atmósfera de nitrógeno. La primera pérdida de masa (88,0%) ocurre en un evento simple en el rango de 188 – 284 °C y corresponde a la descomposición térmica de CBZ anhidra. La segunda pérdida de masa (11,8%) ocurre en el rango de 284 – 342 °C y puede ser atribuida a la descomposición residual de materiales carbonosos (Aparecida et al. 2014).

Figura 2.5 | Curvas termogravimétricas (A) y sus derivadas (B) de CBZ, SLN (vehículo), SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO), NLC-CBZ (DMSO) y Pluronic F68.

Por otro lado, SLN, SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO) y NLC-CBZ (DMSO) mostraron un comportamiento térmico bifásico diferente a la droga pura. A partir de la comparación de los termogramas de las formulaciones respecto al del vehículo (SLN, sin CBZ) y al del Pluronic F68 surge que:

- › el primer evento térmico ocurrió en el rango de 190 – 337 °C con una pérdida de peso del 35,2%, 40,7%, 41,5% y 37,4%, respectivamente, el cual se puede atribuir a la descomposición térmica de la cera.
- › El segundo evento térmico ocurrió entre los 337 y 425 °C con una pérdida de peso de 65,1%, 58,9%, 58,2% y 62,7%, respectivamente, y se trataría de la descomposición térmica del Pluronic F68.
- › Ninguna de las formulaciones mostró diferencias significativas en términos de su comportamiento térmico en comparación con el vehículo (SLN), y todas las formulaciones mantuvieron su estabilidad hasta los 180 °C.
- › El hecho de que no se haya evidenciado una pérdida de peso correspondiente a la CBZ, podría sugerir que la misma no se encuentra en estado cristalino, lo que se encuentra de acuerdo con lo encontrado en los ensayos anteriores.

Finalmente, para corroborar las observaciones previas y tener más información sobre la estructura de las nanopartículas, se analizaron los patrones de difracción por rayos X de CBZ, SLN, SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO), y NLC-CBZ (DMSO) (**Figura 2.6**). El patrón de dispersión de CBZ exhibe picos característicos a valores de 2θ cercanos a 12,3°, 13,2° y 20,0°, correspondientes a la forma polimórfica I de CBZ (Grzesiak et al. 2003). Sin embargo, estos picos no se observan en los patrones de dispersión de las formulaciones nanoparticuladas, confirmando la ausencia de CBZ en estado cristalino y sugiriendo, por lo tanto, su presencia en estado amorfo o molecularmente dispersa en la matriz lipídica, en concordancia con los resultados de los análisis térmicos previos.

Por otro lado, los patrones correspondientes a los nanovehículos con y sin CBZ presentaron picos a ángulos de $2,4^\circ$, $21,4^\circ$ y $23,7^\circ$, característicos de los polimorfos α y β' de compuestos lipídicos (Jenning et al. 2000), confirmando la estructura cristalina sólida de las nanopartículas lipídicas. Los compuestos lipídicos pueden presentarse en 3 diferentes estados polimórficos, siendo el arreglo α el menos ordenado y el β el más ordenado, pasando por una estructura intermedia metaestable conocida como β' (Rosiaux et al. 2015). Por otro lado, también se observan en todas las formulaciones los tres picos característicos del Pluronic F68: $0,65^\circ$, $19,2^\circ$ y a $23,3^\circ$ (Fathy & El-Badry 2003), este último se encuentra solapado con el pico a $23,7^\circ$ de la cera de esteres cetílicos.

Figura 2.6 | Patrones de difracción por rayos X de CBZ, SLN (vehículo), SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO), NLC-CBZ (DMSO) y Pluronic F68.

Microscopía por TEM y AFM

El tamaño y morfología de las nanopartículas fueron evaluados adicionalmente por dos técnicas microscópicas. Las imágenes obtenidas por TEM (**Figura 2.7**) mostraron que las nanopartículas poseían una forma esférica y un tamaño de partícula comparable con los datos obtenidos por DLS. Si bien el tamaño medido por DLS es mayor al medido por TEM debido a que por la primer técnica se determina el radio hidrodinámico, la metodología empleada para la medición de tamaños a través de las respectivas imágenes obtenidas por TEM (ImageJ) arroja resultados con desviaciones estándar entre los 20 y 30 nm (aunque los valores medios son inferiores comparados con los resultados por DLS) lo que sugeriría tamaños similares por ambas metodologías. El análisis de las imágenes utilizando el software ImageJ dio como resultado un tamaño de partícula medio entre 140 – 160 nm para las 4 formulaciones consideradas (analizando un número de partículas igual a 100). Más aún, no se observaron diferencias morfológicas entre las distintas formulaciones. En la **Tabla 2.5** se presenta un resumen de los tamaños de partículas obtenidos por DLS y TEM.

Tabla 2.5 | Resumen de tamaño de partícula para cada una de las formulaciones a través DLS y TEM.

Formulación	Tamaño obtenido por DLS (nm $\pm$ SD)	Tamaño obtenido por TEM (nm $\pm$ SD)
SLN-CBZ	164,3 $\pm$ 2,7	144,1 $\pm$ 31,5
SLN-CBZ (DMSO)	164,1 $\pm$ 4,6	162,4 $\pm$ 27,0
NLC-CBZ	164,1 $\pm$ 3,2	159,2 $\pm$ 20,8
NLC-CBZ (DMSO)	161,8 $\pm$ 3,0	140,7 $\pm$ 26,2

Figura 2.7 | Imágenes obtenidas por TEM correspondientes a A) SLN-CBZ; B) SLN-CBZ (DMSO), C) NLC-CBZ y, D) NLC-CBZ (DMSO)

Los resultados obtenidos por TEM fueron complementados con análisis por AFM para la formulación NLC-CBZ (DMSO) (**Figura 2.8**). Esta técnica se consideró como una caracterización morfológica complementaria de las muestras debido al hecho de que, por su naturaleza “blanda”, las nanopartículas lipídicas tienden a aplanarse ante la aparición de fuerzas atractivas con el soporte, así como a las fuerzas débiles de la sonda (incluso en modo *tapping*), por lo que los valores de tamaño obtenidos por AFM suelen diferir de los reportados por otras técnicas (Mazuryk et al. 2016; Vitorino et al. 2011). Efectivamente, el análisis de tamaño mostró partículas aplanadas, con alturas (dirección z) en el rango de 15 a 70 nm. De la misma manera, los tamaños observados en el plano xy fueron algo mayores a los reportados por TEM y DLS (187 ± 60 nm).

Figura 2.8 | Imágenes 3D obtenidas por AFM, correspondientes a la formulación NLC-CBZ (DMSO)

2.2.4 Estudios de liberación *in vitro*

En la **Figura 2.9** se muestran los perfiles de liberación *in vitro* de CBZ a partir de los sistemas nanoparticulados. En comparación con la droga libre (100% liberado en 2 h), todas las formulaciones mostraron una liberación sostenida durante al menos 24 h. La mayor velocidad de liberación durante la primera hora de ensayo puede deberse a la presencia de CBZ libre en la formulación y/o al fármaco que se encuentra adsorbido en la superficie de las nanopartículas (Baig et al. 2016). Se observa que luego la velocidad de liberación del fármaco disminuye gradualmente, lo que puede ser atribuido a la difusión de la CBZ desde la matriz lipídica al medio de disolución.

A partir de la **Figura 2.9**, se observa que la formulación SLN-CBZ exhibió una velocidad de disolución sensiblemente menor a las demás formulaciones [SLN-CBZ (DMSO), NLC-CBZ y NLC-CBZ (DMSO)]. En estas últimas, la mayor velocidad de disolución puede ser explicada por el incremento de la movilidad del fármaco dispersado en una matriz menos ordenada y rígida, la cual se obtiene por la incorporación de DMSO, de aceite, o de ambos, respectivamente.

Figura 2.9 | Perfiles de liberación de SLN-CBZ, SLN-CBZ (DMSO), NLC-CBZ, NLC-CBZ (DMSO) y CBZ libre. Los puntos corresponden a la media y la SD ($n=3$).

Los datos de la liberación de CBZ a partir de la formulación NLC-CBZ fueron ajustados a los modelos mencionados en la **sección 2.1.4**. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 2.6**

Cabe destacar que, con excepción del coeficiente de determinación R^2 , todas las medidas de bondad de ajuste presentadas en la **Tabla 2.6** son adecuadas para comparar modelos con distinto número de parámetros, ya que por su forma de cálculo tanto el R^2 ajustado, como el error cuadrático medio (MSE) y el criterio de información de Akaike (AIC) “penalizan” a los modelos con mayor número de parámetros (indirectamente, a través de los grados de libertad asociados al modelo y al error). Como criterios de bondad del ajuste, se busca maximizar R^2 y R^2 ajustado, y minimizar MSE y AIC.

Tabla 2.6 | Medidas del ajuste a los modelos de liberación de los datos correspondientes a la formulación NLC-DMSO. Se muestran los grados de libertad (GL) y las siguientes medidas de bondad de ajuste: R^2 , R^2 ajustado, error cuadrático medio (MSE) el criterio de información de Akaike (AIC)

Modelo	GL ¹²	R^2	R^2 adj	MSE	AIC
Primer orden	11	0,9081	0,9081	25,4139	31,04
Hopfenberg	10	0,8475	0,8094	53,3805	36,17
Baker-Lonsdale	11	0,9490	0,9490	14,2781	27,60
Korsmeyer-Peppas	10	0,9904	0,9880	3,3340	19,52
Hixon-Crowell	11	0,8384	0,8384	45,0362	34,50

A partir de la **Tabla 2.6** se observa que, previsiblemente, los modelos que mostraron el peor ajuste a los datos fueron los de Hixon-Crowell y Hopfenberg. El primero de ellos modela la evolución temporal del área superficial del sólido durante la disolución, asumiendo que la disolución del fármaco ocurre ortogonalmente a la superficie, lo cual podría verificarse en una partícula sólida de fármaco, pero no en un sistema disperso. El segundo resultaba aplicable a sistemas erosionables, fenómeno que no sería esperable en un sistema constituido por materiales insolubles en agua.

El modelo de primer orden, por su parte, resulta adecuado para describir la cinética de procesos cuya velocidad se modifica en función de la concentración de analito o soluto (en este caso, CBZ remanente en la formulación), es decir, una liberación de fármaco proporcional a la cantidad remanente en las nanopartículas.

¹² Un requisito para la aplicación de las ecuaciones 2.9 – 2.10 es considerar solamente los puntos hasta el 60% disuelto, ya que dichas ecuaciones son las soluciones de expresiones más generales correspondientes a la primera parte de la curva (aproximación a tiempos cortos, hasta una disolución fraccional de 0.6). Como puede verse en la Figura 2.9, todas las formulaciones (menos una) alcanzaron el 60% disuelto a las 4 hs, por lo que los ajustes se realizaron únicamente con los puntos correspondientes a 0,5; 1; 1,5; 2; 3 y 4 hs ($N=12$).

Si bien lo anterior se verifica en la mayoría de los sistemas de administración de fármacos, este modelo empírico en general describe satisfactoriamente los procesos difusivos puros, es decir, de moléculas disueltas donde la etapa limitante de la liberación es la difusión y, en particular, a través de una membrana (Baker & Lonsdale 1974).

El mejor ajuste a los datos se encontró al trabajar con los modelos de Baker-Lonsdale y Korsmeyer-Peppas, siendo el segundo superior al primero en todas las medidas de bondad de ajuste consideradas. Si bien el modelo de Baker y Lonsdale sería adecuado por describir la liberación a partir de una matriz lipídica de geometría esférica, nuestros sistemas no verifican el requisito de que el fármaco se encuentre inicialmente en estado sólido (y a alta concentración) en la formulación (Baker 1987; Shi et al. 2010). Por otro lado, la mayor “plasticidad” matemática del modelo de Korsmeyer y Peppas puede ser un factor determinante de su mejor ajuste a los datos. En otras palabras, la versatilidad de la ley de la potencia asegura el ajuste matemático en situaciones que no necesariamente verifican todas las condiciones impuestas por el modelo (sistemas poliméricos, no erosionables ni expandibles).

De todas formas, creemos que estos resultados se encuentran en línea con las caracterizaciones de la sección anterior, ya que ambos modelos describen procesos predominantemente difusivos en matrices esféricas, y son frecuentemente utilizados para describir la liberación a partir de SLN/NLC (Mura et al. 2021; Öztürk et al. 2019; Rawat et al. 2020; Singh et al. 2013).

2.2.5 Estudios de permeabilidad a través de monocapa celular

Los resultados de los ensayos de permeabilidad *in vitro* en modelos celulares con sobreexpresión de la proteína P-gp (línea MDCK-MDR I) se muestran en la

Figura 2.10, en la cual se presenta el valor medio y desvío estándar (SD, n=5) del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app} , expresado en cm/seg) de todas las formulaciones, utilizando como control una solución de CBZ disuelta en buffer Hanks. Luego de que el análisis de los datos mostrara un efecto significativo del factor “*formulación*” sobre la variable respuesta P_{app} (ANOVA monofactorial, $\alpha = 0,05$), se aplicó el test de Dunnet para comparar los valores medios de P_{app} de todas las formulaciones respecto al control, en este caso la solución de droga libre. Las formulaciones SLN-CBZ (DMSO) y NLC-CBZ (DMSO) evidenciaron una permeabilidad significativamente mayor al fármaco libre (a los niveles de significación 0,05 y 0,01, respectivamente). En contraste, SLN-CBZ mostró un P_{app} significativamente menor al control.

Debido a que todas las formulaciones poseían similares EE%, distribución de tamaño de partícula y potencial Z, una hipótesis que puede considerarse es la propuesta por Neves *et al.* (Neves et al. 2016) que establece que la presencia de compuestos que cambian la estructura de la matriz lipídica, esto es, que generen un desorden en su estructura (*ej.* aceite y/o DMSO), podría volver esas nanopartículas más “flexibles”. Incluso postula que esta mayor permeabilidad se podría generar por un sinergismo entre la mayor flexibilidad y la disminución de los valores de TEER de la monocapa celular, que indicarían una apertura parcial de las uniones estrechas entre células. Esto último, entonces, sumado a la mayor flexibilidad de las nanopartículas contribuiría al aumento de la permeabilidad aparente del fármaco. Cabe destacar que, si bien en este caso la hipótesis planteada es plausible, el hecho de haber cuantificado la droga del lado basal, pero no haber determinado la presencia de nanopartículas propiamente dichas, no permite realizar una conclusión definitiva al respecto.

Figura 2.10 | Coeficientes de permeabilidad aparente de las diferentes formulaciones y la droga libre (control).

Los símbolos * y ** representan diferencias significativas y muy significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, test de Dunnett) en comparación al control. Los resultados se muestran como el valor medio y SD ($n = 5$).

2.2.6 Estudios de estabilidad

Las formulaciones fueron conservadas entre 2 – 8 °C por 90 días, tomando muestras (independientes) cada 30 días para evaluar la evolución temporal de la encapsulación, tamaño, dispersión y carga superficial de las partículas (**Figura 2.11**, A-D). En ningún caso se encontraron cambios significativos ($p > 0,05$) en el contenido de CBZ (EE%), tamaño de partícula, potencial Z y PDI durante el tiempo testado, sugiriendo que las nanopartículas son estables en las condiciones de almacenamiento propuestas (heladera).

Figura 2.11 | Estabilidad de las diferentes formulaciones, medida en términos de: (A) EE%; (B) tamaño de partícula; (C) potencial Z y; (D) índice de polidispersión, analizados cada 30 días, durante 90 días. Los resultados se muestran como los valores medios y su correspondiente SD (n = 3).

2.2.7 Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones

Habiendo analizado y caracterizado todos los sistemas nanoparticulados, se optó por ensayar sólo la formulación NLC-CBZ (DMSO) para los ensayos en el modelo animal de epilepsia aguda (MES).

Se seleccionó una única formulación para los ensayos *in vivo* para proceder de acuerdo al principio de las 3Rs (Singh 2012; Tannenbaum & Bennett 2015) (reducir, reutilizar y reciclar), y así disminuir el uso de animales de experimentación. Por otro lado, se seleccionó la formulación NLC-CBZ (DMSO) ya que, si bien todas las formulaciones exhibieron similares características fisicoquímicas, de liberación y estabilidad, esta formulación fue capaz de

incorporar mayor cantidad de CBZ debido a la presencia de aceite y/o DMSO, a la vez que presentó una muy buena permeabilidad en el ensayo en monocapas celulares.

Los resultados de los ensayos de la actividad anticonvulsiva se muestran en la **Figura 2.12**. El control negativo (SF, solución fisiológica) no presentó actividad anticonvulsiva en ninguno de los animales ensayados, a ningún tiempo (no se muestra en la figura), mientras que el control correspondiente al vehículo (de idéntica composición que la formulación seleccionada, pero sin CBZ) mostró protección en al menos un animal en casi todos los tiempos evaluados (barras violetas en la figura). Por otro lado, el control positivo (droga libre, CBZ, barras anaranjadas) presentó actividad anticonvulsiva en casi todos los animales a todos los tiempos excepto a las 4 h, donde no se observó efecto anticonvulsivo en ninguno de los animales. Finalmente, las NLC-CBZ (DMSO) mostraron una actividad anticonvulsiva similar al fármaco libre (barras verdes), a excepción del último tiempo, en el cual la nanoformulación aun presentó actividad (1/5 animales, 20%), mientras que la droga libre no. Si bien solo pudieron ensayarse un total de 5 ratones por grupo de tratamiento para cada uno de los diferentes tiempo, es necesario aumentar el número de ratones a ensayar para poder lograr un resultado más definitivo. Sin embargo, estos resultados resultan ser prometedores y estarían de acuerdo con reportes recientes (Cirri et al. 2017; Joseph et al. 2017) que sugieren que fármacos encapsulados en nanopartículas lipídicas podrían mejorar la duración de los efectos terapéuticos de los mismos. Por otro lado, ninguna de las muestras analizadas mostró tener efectos neurotóxicos en ningún animal, a ningún tiempo, acorde al ensayo RotoRod.

Figura 2.12 | Evaluación *in vivo* de la actividad anticonvulsivante, expresada como proporción (%) de ratones protegidos a cada tiempo post-dosis. Las barras anaranjadas representan el control positivo, solución de CBZ libre, las barras verdes la formulación seleccionada, NLC-CBZ (DMSO), y las barras violetas el vehículo sin droga. Tanto CBZ libre como las nanopartículas se ensayaron en una dosis de 30 mg/kg.

2.3 Conclusiones

En el presente capítulo se estudiaron las características de sistemas lipídicos nanoparticulados encapsulando CBZ, uno de los fármacos más utilizados en la terapéutica para el tratamiento de la epilepsia, que a su vez es sustrato de la proteína de eflujo P-gp (Potschka et al. 2001), siendo la sobreexpresión de ésta una de las posibles generadoras de refractariedad en esta patología (Mansoori et al. 2017).

Dentro de los lípidos estudiados, la cera de ésteres cetílicos mostró tener una mayor capacidad de incorporar el fármaco en cuestión (EE%) respecto al miristil miristato. Además, se observó que el mayor tiempo de permanencia de la CBZ en el lípido fundido aumentaba significativamente el EE% en todos los casos. Los valores de %EE obtenidos en este desarrollo resultaron ser superiores a los encontrados en por otros autores (Nair et al. 2012; Qushawy et al. 2019; Shekhar Deshkar et al. 2021). Los materiales de partida y el método empleado para la síntesis permitieron obtener una formulación en particular [NLC-CBZ (DMSO)] con una elevada eficiencia de encapsulación ($\sim 95\%$), aún para la mayor dosis de CBZ ensayada (25 mg). La cantidad de DMSO utilizada para la síntesis de nanopartículas, se encontró en una concentración máxima final de 0,22 %v/v. Esta concentración, como se mencionó anteriormente, no solo se encuentra muy por debajo de la exposición máxima permitida sino que además se encuentra por debajo de la concentración en la cual es seguro trabajar durante los ensayos en monocapa celular. Muchos autores han usado concentraciones finales de DMSO por debajo del 1% v/v, sin observar ningún efecto tóxico sobre las células tratadas (Irvine et al. 1999; Thackaberry et al. 2014; Vadlapudi et al. 2012).

Las cuatro formulaciones analizadas mostraron poseer una forma esférica y un tamaño de partícula en el rango deseado, es decir, lo suficientemente pequeño

como para lograr atravesar la BHE (se ha visto que sistemas con tamaños por debajo de los 200 nm son capaces de mejorar la pasaje de fármacos a través de la BHE (Jena et al. 2019; Nowak et al. 2019)), y lo suficientemente grande como para no ser eliminadas rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) (Keck & Müller 2013). Ninguno de los nanosistemas mostró una elevada carga superficial (en valor absoluto), siendo esto una característica importante ya que algunos autores coinciden en que los sistemas con cargas superficiales neutras o estabilizadas estéricamente son menos susceptibles a la opsonización y, por ende, menos susceptibles de ser aclaradas por el MPS (Jena et al. 2019). Sin embargo, y a pesar de lo anterior, los sistemas fueron estables en suspensión, debido al efecto combinado de una (baja) carga negativa en la superficie de las nanopartículas y al impedimento estérico superficial otorgado por el Pluronic F68.

Por otro lado, los ensayos de liberación *in vitro* y de permeabilidad en monocapas celulares evidenciaron que estos sistemas nanoparticulados permiten la liberación de la CBZ de una manera sostenida, logrando liberar casi la totalidad del fármaco cargado en 24 h, y una permeabilidad mejorada en comparación al fármaco libre (excepto por SLN-CBZ que no mostró una mejora en la permeación en comparación a la CBZ libre). Esta mejora en la permeabilidad podría deberse al efecto de las nanopartículas sobre las uniones estrechas de la monocapa celular, haciendo de estas un complejo más laxo y, sumado al posible aumento de la flexibilidad de las partículas, derivando en un aumento del pasaje de CBZ a través de la membrana. En un trabajo del 2016 realizado por Neves y colaboradores, los autores pudieron observar que los valores de TEER presentes en la monocapa celular, disminuían un 10% en presencia de nanopartículas lipídicas, volviendo a sus valores normales una vez removida la formulación del medio, lo que indicaría una apertura reversible de las uniones celulares (Neves et al. 2016). Cabe destacar que si bien la línea celular MDCK-MDR I corresponde a células renales caninas,

la expresión de proteínas de las uniones estrechas (claudina 1, claudina 4 y ocludina) que forman una barrera al pasaje paracelular de sustancias, junto con la sobreexpresión de P-gp humana en esta línea, es lo que las hace especialmente útiles para el estudio de la permeabilidad de drogas a través de la BHE (Furubayashi et al. 2020).

Análogamente a lo encontrado por otros autores (Nair et al. 2012; Qushawy et al. 2019), los ensayos de liberación *in vitro* mostraron perfiles de liberación de CBZ que ajustaron adecuadamente a modelos matemáticos de liberación controlada predominantemente por difusión a partir de sistemas esféricos (Bruschi 2015). Este tipo de liberación se logró incluso bajo condiciones más drásticas (mayores velocidades de rotación de las paletas durante la disolución respecto a las condiciones del ensayo de disolución de CBZ propuesto en la USP 41 (USP 2018)), con las cuales podría esperarse velocidades de liberación más elevadas. Sin embargo, solo el 10% de la CBZ logró liberarse durante la primera hora de ensayo, logrando una liberación del 80% sobre las 10 hs. Esto último, además, se encuentra de acuerdo con los requisitos de la USP para los productos de CBZ de liberación prolongada, donde debe liberarse entre un 65 – 90% del fármaco a las 12 hs, y no menos del 75% debe encontrarse disuelto a las 24 hs (*The United States Pharmacopeia 41* 2018).

Por último, la formulación seleccionada para evaluar la actividad anticonvulsiva *in vivo* [NLC-CBZ (DMSO)] exhibió un efecto protector frente a descargas eléctricas durante el ensayo MES similar a la CBZ en solución, con la evidencia adicional de que la actividad anticonvulsiva de droga encapsulada podría prolongarse por más tiempo (respecto a la droga libre). Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de liberación *in vitro* comentados anteriormente y con lo publicado por otros autores. Nair y colaboradores (Nair et al. 2012) lograron observar una mejora en cuanto a los

tiempos de inicio de convulsiones a través del ensayo MES (aumento del tiempo) utilizando nanopartículas lipídicas cubiertas con quitosano y conteniendo CBZ con tamaños y velocidades de liberación del fármaco similares a las obtenidas aquí. Más recientemente, Qushawy y colaboradores (Qushawy et al. 2019) lograron obtener nanopartículas lipídicas conteniendo CBZ con características similares a las aquí descritas, las cuales permitieron observar una mejora en cuanto a los tiempos de muerte en modelos animales frente a inyecciones de Pentilentetrazol (PTZ). Si bien ninguno de los dos trabajos comentados realiza ensayos adicionales (ej. permeabilidad celular) que permitan relacionar una permeabilidad mejorada con la actividad *in vivo* de estos sistemas, creemos que ponen de relieve a las NP lipídicas como estrategias prometedoras para el tratamiento de enfermedades del SNC.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la formulación desarrollada tiene las características fisicoquímicas, de liberación, permeabilidad y actividad adecuadas para convertirse en una opción terapéutica para el tratamiento de la epilepsia y la epilepsia refractaria (Scioli Montoto et al. 2018). Actualmente nos encontramos estudiando la citotoxicidad de la formulación seleccionada, y a futuro planeamos estudiar la biodistribución de las nanopartículas y su efectividad en el modelo murino de epilepsia refractaria desarrollado en nuestro laboratorio (Enrique et al. 2019).

Todos los resultados obtenidos para este capítulo fueron publicados en la revista internacional *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* de editorial Elsevier (Scioli Montoto et al. 2018).

2.4 Referencias del capítulo

- Aparecida M, Pinto L, Ambrozini B, Paula A, Ferreira G, et al. 2014. Thermoanalytical studies of carbamazepine: Hydration/dehydration, thermal decomposition, and solid phase transitions. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 50(4):877–84
- Asconapé JJ. 2010. The selection of antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy in children and adults
- Baig MS, Ahad A, Aslam M, Imam SS, Aqil M, Ali A. 2016. Application of Box–Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 85:258–70
- Baker RW. 1987. *Controlled Release of Biologically Active Agents*. Wiley
- Baker RW, Lonsdale HK. 1974. Controlled release: mechanisms and rates. In *Controlled Release of Biologically Active Agents*, pp. 15–71. Springer US
- Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaever V, Löscher W. 2007. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology*. 52(2):333–46
- Blom S. 1962. Trigeminal Neuralgia: Its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). *Lancet*. 279(7234):839–40
- Bruschi ML. 2015. Mathematical models of drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, ed. MLBT-S to M the DR from PS Bruschi, pp. 63–86. New York, NY: Woodhead Publishing. 1st ed.
- Chirio D, Peira E, Dianzani C, Muntoni E, Gigliotti CL, et al. 2019. Development of solid lipid nanoparticles by cold dilution of microemulsions: Curcumin loading, preliminary in vitro studies, and biodistribution. *Nanomaterials*. 9(2):
- Cirri M, Mennini N, Maestrelli F, Mura P, Ghelardini C, di Cesare Mannelli L. 2017. Development and in vivo evaluation of an innovative “Hydrochlorothiazide-in Cyclodextrins-in Solid Lipid Nanoparticles” formulation with sustained release and enhanced oral bioavailability for potential hypertension treatment in pediatrics. *Int. J. Pharm.* 521(1–2):73–83
- Das S, Chaudhury A. 2011. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 12(1):62–76

- Enna SJ, Bylund DB. 2011. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*
- Enrique AV, Di Ianni ME, Goicoechea S, Lazarowski A, Valle-Dorado MG, et al. 2019. New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmaco-resistant seizure model in mice. *Epilepsy Behav.*
- Fathy M, El-Badry M. 2003. Preparation and Evaluation of Piroxicam-Pluronic Solid Dispersions. *Bull. Pharm. Sci. Assiut.* 26(2):97–108
- Feng B, West M, Patel NC, Wager T, Hou X, et al. 2019. Validation of Human MDR1-MDCK and BCRP-MDCK Cell Lines to Improve the Prediction of Brain Penetration. *J. Pharm. Sci.* 108(7):2476–83
- Food and Drug Administration (FDA). 2018. Q3C: APPENDIX 6. Toxicological Data for Class 3 Solvents. Maryland
- Furubayashi T, Inoue D, Nishiyama N, Tanaka A, Yutani R, et al. 2020. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an in vitro transport study to predict nasal drug absorption in rats. *Pharmaceutics.* 12(1):
- Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Curr. Drug Deliv.* 1(1):27–42
- Grzesiak AL, Lang M, Kim K, Matzger AJ. 2003. Comparison of the Four Anhydrous Polymorphs of Carbamazepine and the Crystal Structure of Form I. *J. Pharm. Sci.* 92(11):2260–71
- Guo L, Santschi PH. 2007. Ultrafiltration and its Applications to Sampling and Characterisation of Aquatic Colloids. In *Environmental Colloids and Particles*, pp. 159–221. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- Higuchi T. 1961. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *J. Pharm. Sci.* 50(10):874–75
- Hixson AW, Crowell JH. 1931. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation: I—Theoretical Consideration. *Ind. Eng. Chem.* 23(8):923–31
- Hopfenberg HB, Hsu KC. 1978. Swelling-controlled, constant rate delivery systems. *Polym. Eng. Sci.* 18(15):
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5). 2011
- Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, et al. 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability

- Screening. *J. Pharm. Sci.* 88(1):28–33
- Jena L, McErlean E, McCarthy H. 2019. Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme
- Jenning V, Thünemann AF, Gohla SH. 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199(2):167–77
- Joseph E, Reddi S, Rinwa V, Balwani G, Saha R. 2017. Design and in vivo evaluation of solid lipid nanoparticulate systems of Olanzapine for acute phase schizophrenia treatment: Investigations on antipsychotic potential and adverse effects. *Eur. J. Pharm. Sci.* 104:315–25
- Keck CM, Müller RH. 2013. Nanotoxicological classification system (NCS) - A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84(3):445–48
- Korsmeyer RW, Peppas NA. 1981. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *J. Memb. Sci.* 9(3):211–27
- Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. 2001. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* 90(1):21–34
- Lv Y, He H, Qi J, Lu Y, Zhao W, et al. 2018. Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 547(1–2):395–403
- Makwana V, Jain R, Patel K, Nivsarkar M, Joshi A. 2015. Solid lipid nanoparticles (SLN) of Efavirenz as lymph targeting drug delivery system: Elucidation of mechanism of uptake using chylomicron flow blocking approach. *Int. J. Pharm.* 495(1):439–46
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review
- Mazuryk J, Deptuła T, Polchi A, Gapiński J, Giovagnoli S, et al. 2016. Rapamycin-loaded solid lipid nanoparticles: Morphology and impact of the drug loading on the phase transition between lipid polymorphs. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 502:54–65
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, eds. 2011. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Materia*. London, England: Pharmaceutical Press. 4th ed.
- Mura P, Maestrelli F, D'Ambrosio M, Luceri C, Cirri M. 2021. Evaluation and

- comparison of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as vectors to develop hydrochlorothiazide effective and safe pediatric oral liquid formulations. *Pharmaceutics*. 13(4):
- Nair R, Kumar ACK, Priya VK, Yadav CM, Raju PY. 2012. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. *Lipids Health Dis*. 11(1):72
- Neves AR, Martins S, Segundo MA, Reis S. 2016. Nanoscale Delivery of Resveratrol towards Enhancement of Supplements and Nutraceuticals. *Nutrients*. 8(3):131
- Nowak M, Brown TD, Graham A, Helgeson ME, Mitragotri S. 2019. Size, shape, and flexibility influence nanoparticle transport across brain endothelium under flow. *Bioeng. Transl. Med*.
- Owen A, Pirmohamed M, Tetley JN, Morgan P, Chadwick D, Kevin Park B. 2001. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 51(4):345–49
- Öztürk AA, Aygöl A, Şenel B. 2019. Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. 54:
- Pople P V, Singh KK. 2006. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech*. 7(4):E63--E69
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. 2001. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport*. 12(16):3557–60
- Qushawy M, Prabakar K, Abd-Alhaseeb M, Swidan S, Nasr A. 2019. Preparation and evaluation of carbamazepine solid lipid nanoparticle for alleviating seizure activity in pentylenetetrazole-kindled mice. *Molecules*. 24(21):
- Rawat PK, Tyagi CK, Shah SK, Pandey AK. 2020. Formulation, Characterization and in-vitro Evaluation of Famciclovir Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Oral Absorption. *J. Pharm. Res. Int*.
- Ritger PL, Peppas NA. 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release*

- Rodenak-Kladniew B, Islan GA, de Bravo MG, Durán N, Castro GR. 2017. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 154:123–32
- Rogawski MA, Löscher W, Rho JM. 2016. Mechanisms of action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic diet. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(5):28
- Rosiaux Y, Jannin V, Hughes S, Marchaud D. 2015. Solid Lipid Excipients as Matrix Agents for Sustained Drug Delivery. In *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*, pp. 237–71. Cham: Springer International Publishing
- Schärlt W. 2007. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg
- Schindler W, Häfliger F. 1954. Über Derivate des Iminodibenzyls. *Helv. Chim. Acta*. 37(2):472–83
- Scioli Montoto S, Sbaraglini ML, Talevi A, Couyoupetrou M, Di Ianni M, et al. 2018. Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 167:73–81
- Shekhar Deshkar S, Shivaji Jadhav M, Vasudeo Shirolkar S. 2021. Development of Carbamazepine Nanostructured Lipid Carrier Loaded Thermosensitive Gel for Intranasal Delivery. *Tabriz Univ. Med. Sci.* 7(1):113–17
- Shi K, Jiang Y, Zhang M, Wang Y, Cui F. 2010. Tocopheryl succinate-based lipid nanospheres for paclitaxel delivery: Preparation, characters, and in vitro release kinetics. *Drug Deliv.* 17(1):1–10
- Siddiqui A, Alayoubi A, El-Malah Y, Nazzal S. 2014. Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). *Pharm. Dev. Technol.* 19(3):342–46
- Singh J. 2012. The national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 3(1):87–89
- Singh SK, Kushwaha AK, Vuddanda PR, Karunanidhi P, Singh SK. 2013. Development and evaluation of solid lipid nanoparticles of raloxifene hydrochloride for enhanced bioavailability. *Biomed Res. Int.* 2013:
- Smith MD, Metcalf CS, Wilcox KS. 2011. Pharmacotherapy of the Epilepsies. In *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. LL

- Brunton, pp. 583–607. McGraw Hill Medical. 13th ed.
- Stables JP, Kupferberg HJ. The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. *Available at www.ninds.nih.gov/research/asp/addadd_review.pdf* (Accessed 09/23/2017)
- Talevi A, Bruno-Blanch LE. 2012. Efflux-Transporters at the Blood-Brain Barrier: Therapeutic Opportunities (pp. 117-144). In *The Blood-Brain Barrier: New Research*, eds. PA Montenegro, SM Juárez, pp. 117–44. Nova Science Publishers. 1st ed.
- Tannenbaum J, Bennett BT. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54(2):120–32
- Thackaberry EA, Wang X, Schweiger M, Messick K, Valle N, et al. 2014. Solvent-based formulations for intravenous mouse pharmacokinetic studies: tolerability and recommended solvent dose limits. *Xenobiotica.* 44(3):235–41
- The United States Pharmacopeia 34.* 2011. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention
- Theobald W, Kunz HA. 1963. On the pharmacology of the antiepileptic 5-carbamyl-5H-dibenzo(b,f)azepine. *Arzneimittelforschung.* 13:122–25
- Tinto WF, Elufioye TO, Roach J. 2017. Waxes. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, pp. 443–55. Elsevier Inc.
- Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, Najafi MR. 2013. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *J. Res. Med. Sci.* 18(SPL. 1):S81--5
- USP. 2018. The United States Pharmacopeia. . 41:
- Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Kwatra D, Earla R, Samanta SK, et al. 2012. Targeted lipid based drug conjugates: A novel strategy for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 434(1–2):315–24
- Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. 2011. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84(1):117–30
- Volpe DA. 2011. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines
- Zhang Y, Huo M, et al. 2010. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* 12(3):263–71

Capítulo 3

NLC de fenobarbital

El Fenobarbital (PB) es un derivado del ácido barbitúrico sustituido con un grupo etilo y un fenilo en la posición 5 (**Figura 3.1 A y B**), de baja solubilidad acuosa (1 mg/ml) (Jelveghari & Nokhodchi 2008).

La historia del descubrimiento del PB como fármaco antiepiléptico nace, tal vez, en la serendipia. En febrero de 1912, el joven asistente clínico Alfred Hauptmann, molesto por los sonidos provocados por los enfermos epilépticos durante sus crisis nocturnas, decidió administrarles PB debido a sus propiedades hipnóticas. Para su sorpresa, los sonidos cesaron al igual que las convulsiones. Si bien el Luminal (nombre comercial del PB) solo poseía licencia para ser usado como hipnótico, dada la historia de uso de este tipo de fármacos para tratar epilepsias (ver Capítulo 1), parecería probable que Hauptmann intentara probar esta droga como un posible antiepiléptico para sus pacientes. Ese mismo año, publicaría los

resultados de sus investigaciones, los que darían paso posteriormente a la aceptación del uso de PB como fármaco anticonvulsivante (Hauptmann & Alfred 1912).

Figura 3.1 | Estructura molecular del ácido barbitúrico (A) y el Fenobarbital (B).

El PB ejerce su efecto terapéutico aumentando el tiempo de apertura de los canales de Cl^- , lo que deriva en la depresión del SNC por estimulación de las neuronas inhibitorias. Específicamente, el PB actúa a nivel de los receptores GABA-A: cuando se une a estos receptores, los canales de Cl^- se abren y permanecen en ese estado, permitiendo el flujo constante de dichos iones al interior de las células neuronales (**Figura 3.2**). El ingreso de carga negativa hiperpolariza la membrana celular, aumentando el umbral para el potencial de

acción, y es precisamente este efecto lo que hace que PB sea efectivo para el tratamiento de las convulsiones (Davies 2007).

Figura 3.2 | Mecanismo de acción de PB: la unión del fármaco a la subunidad β del receptor GABA_A de la neurona postsináptica, produce la apertura de estos canales de Cl⁻ y los mantiene en ese estado durante un período más largo que el que produce la acción del agonista natural (GABA).

En cuanto a sus características farmacocinéticas, PB es rápidamente absorbido luego de la administración oral, con un tiempo máximo (T_{max}^{13}) comprendido entre 2 – 4 hs y una biodisponibilidad¹⁴ mayor al 90%. Posee un volumen de distribución

¹³ T_{max} corresponde al tiempo en el cual el fármaco alcanza el pico máximo de concentración plasmática (C_{max}).

¹⁴ La biodisponibilidad (F) es un parámetro farmacocinético que evalúa el grado en que una dosis extravascular (por ej. oral, subcutánea, intraperitoneal, etc.) se encuentra disponible en la circulación sistémica en relación a una dosis intravenosa.

aparente¹⁵ (V_D) de 0,61 L/kg y un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas del 55%. PB es ampliamente metabolizado en el hígado a través de las isoenzimas CYP2C9, CYP2C19 y CYP2E1 del CYP450, produciendo principalmente 2 metabolitos: *p*-hidroxi fenobarbital y 9-D-glucopiranosil fenobarbital, ambos inactivos. Dado que el PB es un inductor enzimático, puede inducir su propio metabolismo llevando a un aumento de su clearance. En adultos, alrededor de un 20 – 25% de la dosis administrada es excretada de manera inalterada a través de la orina.

En los primeros capítulos se describieron las hipótesis existentes en cuanto a la refractariedad a los tratamientos con fármacos antiepilépticos convencionales. Una de esas hipótesis hacía referencia a la sobreexpresión de transportadores de eflujo a nivel de la BHE, lo cual limitarían el ingreso de estos fármacos al sistema nervioso central. Si bien existen diversos tipos de proteínas de eflujo, la más estudiada resulta ser la P-gp (Löscher & Potschka 2005). Dentro de la batería de fármacos antiepilépticos, PB demostró ser sustrato de este transportador (Luna-Tortós et al. 2008). Lo anteriormente dicho, sumado a la baja solubilidad acuosa que presenta, hace de este fármaco un posible candidato para su incorporación en sistemas lipídicos nanométricos. Por este motivo, se decidió desarrollar sistemas lipídicos nanoestructurados, utilizando diseños estadísticos para su optimización, para evaluar las ventajas que estos sistemas podrían presentar en casos de epilepsias resistentes a fármacos.

¹⁵. El volumen de distribución aparente es el parámetro que permite relacionar la cantidad de fármaco en el cuerpo (por ejemplo, la dosis, mg) con la concentración de fármaco en el compartimento de muestreo (típicamente, C_{plasma} , mg/ml). Se denomina “aparente” ya que no necesariamente tiene significado fisiológico en términos de un espacio anatómico, sino que refleja el espacio que el fármaco parece ocupar en el cuerpo. Valores grandes de V_D implican valores pequeños de C_{plasma} . En otras palabras, a mayor V_D , mayor distribución del fármaco en órganos y tejidos periféricos.

3.1 Materiales y métodos

Reactivos

Análogamente a lo comentado en el capítulo anterior (ver Sección 2.1), también se utilizó un lípido sólido a temperatura ambiente para la preparación de las formulaciones: miristil miristato (Crodamol[®] MM, punto de fusión en el rango de 36 – 40 °C), junto a un aceite compuesto por triglicéridos de cadena media (Crodamol[®] GTCC-LQ, punto de fusión de -4°C), ambos donados por Croda (Argentina). Otros reactivos empleados fueron: agua destilada, agua calidad HPLC y agua ultrapura Mili-Q, PB (100% sdte, droguería Saporiti, Argentina) y Poloxamer 188 (Pluronic[®] F68 o Kolliphor[®] P188, Sigma-Aldrich, Argentina). El resto de los reactivos y solventes utilizados fueron de calidad HPLC o analítica, según el caso.

3.1.1 *Diseño, optimización racional y preparación de los nanosistemas*

Screening de factores principales

A la hora de desarrollar una nueva formulación o sistema, muchos son los factores que pueden influir en el resultado final o respuesta. Si bien el efecto individual de los factores sobre la variable respuesta puede resultar relativamente fácil de estudiar o medir, tratar de describir el sistema como un todo, donde los factores actúan conjuntamente, es una tarea algo más compleja. Esto se debe a que los factores pueden ser independientes o no entre sí, y en este último caso, la presencia de interacciones puede modificar la variable respuesta según el tratamiento que se esté aplicando. En este contexto, entonces, se define a los *factores* como a un grupo específico de variables (por ejemplo, la temperatura, cantidad de un

componente, etc.) las cuales pueden presentarse en diferentes *niveles* (por ejemplo, diferentes temperaturas) (Kuehl 2001). Para poder analizar cómo influyen todos los factores sobre el resultado final existen los denominados *diseños factoriales*¹⁶, y dentro de éstos, los *diseños factoriales* 2^k , un caso especial ampliamente utilizado en experimentos preliminares de optimización, los cuales permiten evaluar la influencia simultánea de k factores, siempre que los mismos se estudien a 2 niveles, un nivel “bajo” y uno “alto”. Estos diseños suelen ser útiles en etapas tempranas del desarrollo cuando son muchos los factores que desean evaluarse (Montgomery & Runger 2003). Sin embargo, a medida que el número de factores aumenta, el número de ensayos crece de manera geométrica, ya que la cantidad de corridas necesarias para estudiar k factores, en 2 niveles cada uno, y realizando r réplicas por corrida, es igual a $r2^k$. Por ejemplo, si se desean analizar 7 factores, el estudio completo requeriría de 128 corridas o experimentos, sin contar las réplicas, y permitiría obtener información sobre los 7 efectos principales y la mayoría de las interacciones presentes (dobles, triples y de mayor orden).

Sin embargo, generalmente existen limitaciones experimentales para el número total de corridas posibles (por ejemplo, el tiempo disponible, cantidad de reactivos, disponibilidad de equipos, etc.) a la vez que no toda la información que proveen estos experimentos resulta “aprovechable”, ya que las interacciones de orden mayor entre factores (triples, cuádruples, etc.) suelen ser difíciles de interpretar.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta que, generalmente, lo que se busca en las etapas preliminares es identificar cuáles son los factores principales que afectan la variable respuesta (es decir, realizar un *screening* de factores), una gran

¹⁶ Diseños estadísticos que permiten estudiar el efecto de todas las combinaciones de niveles de los factores (es decir, tratamientos) y así evaluar la posible presencia de interacciones entre los factores.

herramienta disponible para este tipo de estudios son los *diseños factoriales fraccionarios*. Estos diseños suelen representar la mitad, un cuarto o una fracción incluso menor del diseño 2^k completo y pueden proporcionar suficiente información para decidir cuáles son aquellos factores que serán analizados en etapas posteriores (Montgomery & Runger 2003).

En función de lo dicho hasta aquí, se decidió realizar el screening preliminar de factores mediante un diseño factorial fraccionario (fracción $\frac{1}{2}$, 2^{k-1}), completamente aleatorizado, de resolución¹⁷ V, considerando $k=5$ factores independientes del proceso de síntesis de los nanosistemas evaluados a 2 niveles cada uno (Diseño 2_V^{5-1} , de 16 corridas o ensayos): cantidad de lípido (X_1 , mg), cantidad de tensioactivo en la fase acuosa (X_2 , %), cantidad de aceite (X_3 , μl), tiempo de sonicado (X_4 , min) y potencia de sonicado (X_5 , %). Los factores y niveles fueron seleccionados en base a experiencias previas y a información bibliográfica.

Como variables dependientes de interés (variables respuesta) se seleccionaron tres características a optimizar en cualquier nanovehículo: el tamaño de partícula (Y_1 , diámetro en nm), el índice de polidispersión (Y_2 , PI, adimensional) y el potencial Z (Y_3 , Z-Pot en mV).

Para la creación y aleatorización de la tabla de contrastes del diseño se utilizó el paquete “FrF2” (Grömping 2014) del lenguaje R (R Core Team 2020), operado a través de la GUI (*graphic user interface*) RStudio (RStudio Team 2020). En la

¹⁷ La resolución de un diseño da cuenta de cómo los factores e interacciones se encuentran “confundidos”. El concepto de confusión aparece porque, al realizar menos corridas que las correspondientes al diseño completo, algunos efectos quedan estimados de la misma manera y, por lo tanto, resultan alias (o indistinguibles) entre sí (Montgomery & Runger 2003). En el caso de diseños de resolución V, ningún efecto principal o interacción de dos factores es alias de otro efecto principal o interacción doble (éstas son alias de las interacciones triples, y los efectos principales son alias de las interacciones cuádruples), lo que los hace especialmente útiles para experimentos de cribado o screening de factores.

Tabla 3.1 se muestra un resumen de los factores estudiados y sus niveles, junto a las tres respuestas consideradas.

Tabla 3.1 | Variables del diseño factorial fraccionario 2_V^{5-1} .

Variables independientes	Niveles	
	Bajo	Alto
X ₁ : Cantidad de lípido (mg)	100	400
X ₂ : Cantidad de tensioactivo (mg)	200	800
X ₃ : Cantidad de aceite (μl)	10	200
X ₄ : Tiempo de sonicado (min)	10	40
X ₅ : Potencia de sonicado (%)	60	80
Variables dependientes		
Y ₁ : Tamaño de partícula (nm)		
Y ₂ : Índice de polidispersión		
Y ₃ : Potencial Z (mV)		

Tabla 3.2 | Diseño factorial fraccionario (2_V^{5-1}) realizado en el presente estudio.

Nº Formulación	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (μl)	X ₄ (min)	X ₅ (%)
1	400	800	10	40	60
2	100	400	200	10	80
3	100	800	10	40	80
4	400	800	200	40	80
5	400	800	200	10	80
6	400	800	10	10	60
7	100	400	200	40	80
8	100	400	10	10	60
9	100	400	10	40	60
10	400	400	200	40	60
11	400	400	10	40	80
12	100	800	200	40	60
13	100	800	200	10	60
14	100	800	10	10	80
15	400	400	10	10	80
16	400	400	200	10	60

Luego de la síntesis de las formulaciones acorde a la **Tabla 3.2**, se midieron las tres variables respuesta para cada una de ellas y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar los factores principales que afectaron de manera significativa ($p < 0,01$), en términos estadísticos, a las mencionadas variables.

Optimización a través de la metodología de superficie de respuesta (RSM)

Finalizado el screening de factores principales, se continuó con la optimización del proceso de síntesis aplicando la metodología de superficie de respuesta (RSM, *response surface methodology*) a través de un diseño central compuesto (DCC) aplicado a dos factores (X_1 y X_2 , seleccionados en la etapa anterior). Para esto se utilizó el paquete “rsm” para R (Lenth 2009).

RSM es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el análisis y modelado en situaciones donde se busca optimizar una variable respuesta cuando esta es influenciada por múltiples factores (Montgomery & Runger 2003). El DCC, por otro lado, es un diseño muy utilizado para el ajuste de superficies de respuesta de segundo orden, que permite visualizar la curvatura de estas superficies. Para la construcción del espacio de diseño, se consideraron 3 grupos de puntos: (1) los puntos de un diseño factorial de 2 niveles por cada factor (cuatro puntos, marcados como p en la **Figura 3.3**), (2) puntos axiales (también llamados puntos “estrella” o puntos “alfa”, cuatro puntos marcados como α en la figura) y (3) el punto central (marcado como c en la **Figura 3.3**). Dado que el punto central se replicó 5 veces para tener una estimación interna del error, el DCC realizado requirió de un total de 13 corridas.

El agregado de los puntos centrales y axiales en un DCC es útil para evaluar curvaturas en la superficie de respuesta, principalmente para el ajuste de estas superficies a modelos cuadráticos (Chauhan et al. 2013). Una de las características principales de este diseño es su rotabilidad, es decir, el diseño debe poder predecir la variable respuesta $\hat{y}$, con la misma precisión en todos

Figura 3.3. | Esquema de un diseño central compuesto rotatable típico. En él pueden hallarse los puntos factoriales del diseño (p), los puntos alfa (α) y los puntos centrales (c).

los puntos equidistantes al origen del diseño (puntos centrales) (Draper 2008).

Para la construcción del DCC, a partir de los resultados del cribado de factores principales, se seleccionaron como variables regresoras (o factores del diseño) a la cantidad de lípido en la formulación (X_1 , mg) y la cantidad de tensioactivo en la fase acuosa (X_2 , mg), y como variables dependientes (o variables respuesta) al tamaño de partícula (Y_1), índice de polidispersión (Y_2) y potencial Z (Y_3). Los valores de los puntos correspondientes al diseño factorial (4 puntos del diseño), los puntos centrales (5 puntos en total) y los puntos axiales (4 puntos) se resumen en la **Tabla 3.3**.

Para mantener la rotabilidad del diseño, el valor de α queda definido por el número de corridas experimentales en la porción factorial del DCC, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\alpha = \left(\frac{2^k r_c}{r_s} \right)^{1/4} \quad (3.1)$$

Donde k es el número de factores del diseño, r_c corresponde a las réplicas de los puntos del diseño factorial y r_s corresponde a las réplicas de los puntos axiales. Dado que en este diseño $r_c = r_s = 1$, la ecuación queda de la forma (Box & Draper 2007):

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (3.2)$$

Por este motivo, y para el caso particular del DCC generado para las nanopartículas conteniendo PB ($k=2$), $\alpha = \sqrt[4]{2} = 1,41$.

Tabla 3.3 | Variables independientes (X_1 = cantidad de lípido y X_2 = cantidad de tensioactivo) evaluadas a 5 niveles diferentes (codificados como $-\alpha$, -1 , 0 , 1 y α) y variables dependientes (Y_1 = tamaño de partícula medido en nm, Y_2 = índice de polidispersión y Y_3 = potencial Z medido en mV) seleccionadas para el diseño central compuesto generado para la optimización de las formulaciones conteniendo PB. Para cada una de las variables dependientes se especifica el objetivo de la optimización.

Variables regresoras	Niveles				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X_1 (mg)	146,4	250	500	750	853,6
X_2 (mg)	417,2	500	700	900	982,8
Variables dependientes		Objetivo			
Y_1 (nm)		Minimizar			
Y_2		Minimizar			
Y_3 (mV)		Minimizar			

Por último, se procedió a optimizar las formulaciones, es decir, encontrar aquellos valores de los factores “*cantidad de lípido*” y “*cantidad de tensioactivo*” que dieran como resultado las mejores respuestas, evaluadas a través de una función de “*deseabilidad*”.

La función de deseabilidad fue introducida en 1965 por Harrington (Harrington 1965) y modificada por Derringer y Suich en 1980 (Derringer & Suich 1980). Para poder explicarla, es necesario suponer que contamos con R ecuaciones o funciones (funciones que estiman la variable respuesta surgidas a partir del DCC, que en el caso de este desarrollo equivalen a 3, una por cada respuesta), que se quieren optimizar conjuntamente, a las que llamaremos $f_r(x)$, con $r = 1, 2, \dots, R$. Cada una de las R funciones pueden ser transformadas a una función de deseabilidad individual, d_r , que variará entre 0 y 1 según $f_r(x)$ se encuentre en un valor no deseado o en el valor deseado, respectivamente. De esta manera, se proponen 3 tipos de funciones d_r , según el objetivo buscado (maximizar, minimizar o acotar a la variable respuesta a un rango objetivo), que quedarán definidas para cada una de las R funciones (relacionadas a cada una de las respuestas).

Para la maximización de la variable respuesta, la función d_r toma la forma:

$$d_r^{max} = \begin{cases} 0 & \text{si } f_r(x) < A \\ \left(\frac{f_r(x) - A}{B - A}\right)^s & \text{si } A \leq f_r(x) \leq B \\ 1 & \text{si } f_r(x) > B \end{cases} \quad (3.3)$$

donde A representa el mínimo valor aceptable de la respuesta $f_r(x)$, por debajo del cual el producto tendrá características inaceptables, y B corresponde al valor máximo de $f_r(x)$, por encima del cual no se evidencian mejoras significativas en la en la respuesta final. El parámetro s está relacionado a la flexibilidad con la cual se quiere satisfacer la deseabilidad general. Para valores altos de s ($s > 1$), la deseabilidad aumentará cuando el valor de $f_r(x)$ se aleje considerablemente de A. Por el contrario, a valores pequeños de s ($s < 1$) la deseabilidad aumentará significativamente con aumentos pequeños en $f_r(x)$. Todos estos parámetros son definidos por el investigador y dependerán, claramente, del modelo propuesto. En el caso del valor de s , el paquete de cálculo utilizado toma como valor por defecto

a $s = 1$, el cual asume un aumento lineal de la deseabilidad con el aumento de los valores de $f_r(x)$.

Cuando lo que se busca es minimizar una variable respuesta, la función d_r puede expresarse de la siguiente manera:

$$d_r^{min} = \begin{cases} 0 & \text{si } f_r(x) > B \\ \left(\frac{f_r(x) - B}{A - B}\right)^s & \text{si } A \leq f_r(x) \leq B \\ 1 & \text{si } f_r(x) < A \end{cases} \quad (3.4)$$

Donde A representa el mínimo valor de $f_r(x)$, por debajo del cual no se evidencian mejoras significativas en la en la respuesta final, y B corresponde al máximo valor aceptable de la respuesta $f_r(x)$.

Por otra parte, cuando se busca que la respuesta se encuentre dentro de un rango objetivo, la función d_r puede expresarse según:

$$d_r^{objetivo} = \begin{cases} \left(\frac{f_r(x) - A}{t_0 - A}\right)^{s_1} & \text{si } A \leq f_r(x) \leq t_0 \\ \left(\frac{f_r(x) - B}{t_0 - B}\right)^{s_2} & \text{si } t_0 \leq f_r(x) \leq B \\ 0 & \text{si } f_r(x) < A \text{ o } f_r(x) > B \end{cases} \quad (3.5)$$

donde t_0 se refiere al valor más deseable de $f_r(x)$, el cual debe estar comprendido entre A y B (valores aceptables mínimo y máximo, respectivamente).

Por último, al contar con R funciones de respuesta $f_r(x)$, se tendrán también R funciones de deseabilidad d_r , cada una con valores entre 0 y 1. Estas R funciones pueden, finalmente, ser combinadas en una única función de deseabilidad general utilizando la media geométrica. De esta manera, la función de deseabilidad general queda definida como:

$$D = \left(\prod_{r=1}^R d_r \right)^{1/R} \quad (3.6)$$

La ventaja de combinar las d_r mediante la media geométrica es que, si alguna de dichas funciones de deseabilidad individuales tiene un valor inaceptable (es decir, $d_r = 0$), entonces la deseabilidad general también es igual a cero. Por último, la deseabilidad general es optimizada utilizando el método de Nelder-Mead o método de búsqueda simplex (Olsson & Nelson 1975). Este método consiste en un algoritmo de optimización que utiliza un triángulo, denominado *simplex*, para determinar el punto óptimo de una función multivariable. Para esto, el algoritmo selecciona tres puntos al azar de la superficie de respuesta y evalúa la función de deseabilidad en cada uno de ellos. El punto del triángulo que haya dado el peor resultado es eliminado. Luego se busca la dirección de mayor crecimiento y se selecciona un nuevo punto, formando un nuevo triángulo entre éste y los dos puntos anteriores. El método converge cuando los tres puntos del simplex encuentran el punto óptimo. Los cálculos correspondientes a esta etapa se realizaron empleando el paquete de R “*desirability*” (Kuhn 2016).

Una vez finalizada la etapa de optimización, se continuó con la síntesis del sistema seleccionado para validar las predicciones generadas por los modelos anteriores y poder calcular el error de predicción correspondiente.

Preparación de las NLC cargadas con PB

Para cada una de las síntesis de las nanopartículas diseñadas acorde a lo descripto en la sección anterior (tanto para el diseño preliminar como para el DCC), se utilizó el método de homogeneización por ultrasonido. Una cantidad determinada de miristil miristato (definida por el diseño estadístico, ver **Tabla 3.2** y **Tabla**

3.3) y 24 μl de Crodamol® GTCC-LQ (aceite) se colocaron en un vaso de precipitados, el cual se mantuvo en un baño de agua termostatzado a 70 °C hasta la fusión completa del lípido. Por otro lado, 20 ml de una solución acuosa del tensioactivo (Pluronic F68, a la concentración definida por el diseño) se calentaron en las mismas condiciones que la fase lipídica. Alcanzada la misma temperatura en ambas fases, se agregaron 50 mg de PB sobre el lípido fundido y, luego de 15 minutos, la fase acuosa se volcó sobre la lipídica para ser sometida inmediatamente a ultrasonido. Para esta etapa de la síntesis se usó un sonicador de alta frecuencia, operando al 80% de su potencia, durante 20 minutos (130 W, Cole-Parmer, USA), utilizando una punta de titanio de 6 mm.

Medida de la eficiencia de encapsulación porcentual y capacidad de carga de los nanovehículos

Se midió la eficiencia de encapsulación (EE%) y la capacidad de carga (DL%, *drug loading*) porcentuales, utilizando las ecuaciones presentadas en el Capítulo 2 para tal fin (Ecuaciones 2.1 - 2.3). La separación del fármaco libre en solución de cada una de las formulaciones se realizó por el método de ultrafiltración por centrifugación. Para ello se utilizaron filtros para centrífuga Microcon® de 10 kDa de tamaño de poro (equivalente a 2,9 nm (Guo & Santschi 2007)): se tomaron 0,5 ml de muestra de cada formulación, se colocaron en filtros y los mismos se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos. Luego, se tomaron 10 μl del filtrado y se llevaron a 100 μl finales con fase móvil para su posterior análisis por HPLC.

Método para la cuantificación de Fenobarbital

Para la cuantificación de PB se utilizó un método por cromatografía líquida utilizando un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) equipado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000) y detector UV-Vis con arreglo de diodos DAD-3000. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Hibar RP18 (150 mm x 4 mm, 5 μ m, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La fase móvil consistió en metanol y buffer KH_2PO_4 10 mM pH 7,0 (40:60), y se trabajó de manera isocrática a un flujo de 1 ml/min. La detección del analito se realizó a una longitud de onda λ de 239 nm. Previo a su inyección por duplicado, las muestras fueron centrifugadas a 13000x g durante 5 minutos e inyectadas directamente o realizando una dilución 1:10 con fase móvil premezclada. Para la inyección se utilizó un inyector manual (Rheodyne, CA, EE. UU.), equipado con un loop fijo de 20 μ l.

Todas las formulaciones diseñadas acorde a los diseños estadísticos mencionados y preparadas siguiendo la metodología antes descrita, fueron evaluadas en términos de tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión. Estas variables fueron medidas mediante la técnica de DLS, utilizando un equipo Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcesterchire, UK) a una temperatura de trabajo de 25 °C, colocando la muestra en cubetas de poliestireno con un camino óptico de 10 mm. En el caso del potencial Z, las medidas fueron realizadas en el mismo equipo pero empleando celdas capilares de 10 mm de camino óptico y en agua Mili-Q como medio. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

3.1.2 Caracterización fisicoquímica

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para la evaluación del tamaño de partícula por AFM se trabajó a partir de diluciones 1:1000 de cada una de las formulaciones seleccionadas, las cuales fueron colocadas en placas de mica recientemente escindidas. Para la fijación de la muestra se colocaron 10 μ l de una solución de Cl_2Ca (10 mM). Luego de 15 minutos, las placas fueron lavadas con agua Mili-Q y el exceso de líquido removido con papel de filtro (Whatman, Alemania).

Todas las imágenes fueron obtenidas a temperatura ambiente utilizando el equipo Multimode-Nanoscope V (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) operando con modo *tapping* con una punta de silicio modelo RTesp-Bruker (frecuencia de resonancia del cantiléver: 300 kHz; fuerza constante de 42 N/m; radio del tip de 8 – 12 nm) con rango de escaneo típico de 1 Hz.

Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó la metodología de DSC para la caracterización térmica de la formulación optimizada y el vehículo nanoestructurado sin PB. Como control, se evaluó el comportamiento térmico de los componentes de las nanopartículas por separado. Para las medidas se utilizó un equipo Perkin. Elmer modelo Parys 1 (PerkinElmer INC., Waltham, MA, USA), bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en el rango de -25 a 200 °C. Para los ensayos se utilizaron celdas de muestreo de aluminio y se pesaron entre 2 – 14 mg de cada muestra seca (cada muestra a analizar fue previamente congelada y liofilizada durante 24 hs).

El objetivo de este ensayo fue buscar evidencias sobre la incorporación del PB dentro de la matriz lipídica, es decir, si éste se encontraba molecularmente disperso o en una forma amorfa dentro de la misma. A su vez, se evaluó el cambio en el ordenamiento de la red cristalina mediante el cálculo de: (1) la entalpía de fusión del miristil miristato puro y del mismo lípido cuando éste formaba parte de la matriz de las nanopartículas, y; (2) del índice de cristalinidad. El cambio porcentual en el índice de cristalinidad (IC, %) luego de la síntesis se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.4 descripta en el capítulo anterior.

Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de las formulaciones durante el proceso de síntesis fue evaluada mediante análisis termogravimétrico, utilizando el equipo TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, DE, EEUU). Para cada determinación se pesaron con precisión muestras de entre 4 – 32 mg en bandejas de platino, y las medidas fueron realizadas por triplicado bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde una temperatura de equilibrio de 30 °C hasta una temperatura final de 600 °C.

Análisis por difracción de rayos X (XRD)

Se empleó la metodología de difracción de rayos X para confirmar los resultados obtenidos por DSC respecto a la estructura cristalina de las nanopartículas. Se utilizó para ello un difractómetro PANalytica X'Pert PRO equipado con una fuente de rayos X (PANalytical, Philips PW 1839, Países Bajos) con radiación CuK α a 40 kV y 40 mA. Los espectros de difracción de cada muestra (PB, Pluronic F68, miristil miristato, NLC-vehículo y NLC – PB) fueron tomados en

el rango de 2θ de $0 - 45^\circ$ con intervalos de $0,002^\circ$ y a una longitud de onda, λ , de $1,54 \text{ \AA}$.

Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se estudiaron las posibles interacciones entre componentes de la formulación así como también la composición superficial de las nanopartículas lipídicas a través de FTIR. Para ello, se realizaron los espectros IR de cada una de las muestras (NLC-vehículo y NLC-PB) y de los componentes individuales (PB y excipientes por separado) en el rango de números de onda de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, con una resolución de 2 cm^{-1} , utilizando un espectrómetro JASCO FT/IR – 4200 con una corrección de fondo a 256 número de escaneos, una fuente de cerámica de alta energía y equipado con un detector DLATGS.

Las muestras se prepararon en fase sólida (pastillas), mezclando el material a medir (NLC o componente individual) al 5% (p/p) con bromuro de potasio calidad IR (KBr, Pike Technologies).

3.1.3 Ensayos de liberación in-vitro

Los perfiles de liberación de las nanopartículas conteniendo PB fueron estudiados en diferentes medios de disolución biorelevantes. En todos los casos, se utilizó el aparato 2 (paletas) USP, empleando un equipo Hanson Vision Classic 6 (Hanson Research, Chatsworth, CA, USA). Al igual que en el caso de CBZ, también aquí se colocaron 5 ml de formulación (NLC-PB) en bolsas de diálisis pre-hidratadas en agua calidad HPLC durante 24 hs, las cuales fueron sujetadas a las paletas del equipo de disolución. Como control se incluyó PB (droga libre) en las mismas condiciones experimentales que la nanoformulación.

Los medios utilizados fueron: solución reguladora KCl/HCl pH 1,2; solución reguladora acetato de sodio monohidrato/ácido acético pH 4,5 y solución reguladora fosfato monobásico de potasio/NaOH pH 7,4¹⁸. Los medios se prepararon acorde a las especificaciones de la USP (USP41, 2018).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, a $37 \pm 0,5$ °C, a una velocidad de agitación de 75 rpm y empleando 500 ml como volumen de medio. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares durante 24 h (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 24 h), 1 ml a cada tiempo, sin reposición de medio fresco, las cuales fueron inmediatamente centrifugadas y cuantificadas por HPLC, acorde al método descrito en la sección 3.1.1.

Los perfiles obtenidos en los distintos medios ensayados fueron ajustados a los modelos de liberación descritos en el capítulo anterior utilizando el complemento de Excel DDSolver (Zhang et al. 2010)

3.1.4 Evaluación de la actividad anticonvulsiva de las formulaciones

Al igual que en el capítulo anterior, los ensayos de actividad *in vivo* se diseñaron siguiendo las pautas del Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivos (ADD, *Anticonvulsant Drug Development*) del Instituto Nacional de Desórdenes y Ataques Neurológicos y de la Comunicación (NINDS, *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, NIH, *National Institute of Health*, EEUU) (Stables & Kupferberg), y fueron realizados siguiendo un protocolo previamente aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de

¹⁸ Cabe destacar que, si bien en el presente trabajo sólo se evaluó la actividad *in vivo* por vía *i.p.* (y, por lo tanto, el único medio de liberación relevante sería el correspondiente al pH plasmático), no se descarta el estudio, a futuro, de la administración oral de las nanoformulaciones, en cuyo caso éstas se verían sometidas a los otros dos valores de pH aquí ensayados, típicos del tracto gastrointestinal.

Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (Protocolo N° 018-06-15, ver **Anexo III**).

Se trabajó con ratones Swiss Albino machos, de entre 18 y 25 g al momento de los ensayos, provistos por la Facultad de Veterinaria, UNLP. Los ratones fueron alojados en jaulas colonia conteniendo un máximo de 10 ratones por jaula, con temperatura ambiente controlada a 20-22 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 hs y provistos de alimento y agua *ad libitum*. La adaptación de los animales al nuevo ambiente se llevó a cabo durante 5 días y consistió en la administración por vía intraperitoneal (ip) de 0,1 ml de solución fisiológica (SF) a cada animal, por día.

El modelo seleccionado para el caso de PB fue el de Pentilenetetrazol (PTZ). En el trabajo original de Everett y Richards de 1944, no sólo se desarrolla y se presenta este “nuevo” modelo, sino que también se demuestra la actividad anticonvulsivante del PB (Everett & Richards, Richard 1945). El modelo de PTZ se basa en la administración de este compuesto químico, por vía subcutánea, utilizando dosis que provoquen una convulsión en el 97% de los animales tratados (ED97, dosis efectiva del 97%), para la evaluación de la actividad anticonvulsivante de nuevos fármacos. Dependiendo de la dosis administrada pueden observarse diferentes tipos de convulsiones: (1) espasmos mioclónicos simple o repetitivos, (2) breve episodio de convulsiones clónicas mínimas caracterizadas por clonía de las mandíbulas y/o las vibrisas (bigotes), patas traseras y/o delanteras, sin pérdida del reflejo de corrección, (3) convulsiones clónicas de las patas delanteras y traseras con pérdida de reflejo de corrección y (4) extensión tónica de las patas delanteras y traseras. La eficacia de un compuesto en el test de PTZ está definida por su habilidad para bloquear las convulsiones clónicas mínimas de las patas delanteras y traseras, lo que se toma

como indicador de actividad farmacológica contra convulsiones generalizadas (Peterson & Albertson).

Con algunas excepciones (Löscher 2011), la prueba de PTZ predice de manera confiable la capacidad de un fármaco de elevar el umbral de convulsión y su potencial actividad contra las sacudidas mioclónicas y las convulsiones del tipo punta-onda.

Al igual que en el ensayo MES de CBZ, se realizaron 3 tipos de controles: un control positivo (solución de PB con una concentración equivalente a 25 mg/kg para un máximo de volumen administrado de 10 ml/kg) y dos controles negativos (SF y NLC sin PB, es decir, vehículo solo). Se evaluó la actividad convulsivante frente a PTZ a los 15, 30, 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de cada muestra por vía intraperitoneal. Para cada tratamiento y tiempo se utilizaron un total de 5 ratones por grupo. Tanto la droga libre como las formulaciones conteniendo PB se administraron a una dosis de 25 mg/kg por vía i.p. Además del test PTZ se realizó el test de RotoRod para evaluar los posibles efectos neurotóxicos de las nanopartículas sintetizadas.

3.1.5 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad de la formulación optimizada se realizaron en las condiciones de almacenamiento propuestas, es decir, en heladera. Para ello, las muestras fueron mantenidas a 2-8 °C en viales individuales de vidrio (uno para cada réplica y tiempo considerados). Inmediatamente luego de la síntesis de cada formulación y a los 30 días, el tamaño de partícula, PDI y potencial Z fueron evaluados utilizando los procedimientos descriptos en las secciones anteriores.

3.1.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un mínimo de 3 réplicas independientes. En los casos en que se realizó un mayor número de réplicas, el mismo se detalla en la sección correspondiente. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia (α) de 0,05. Previo a cada análisis paramétrico, los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron chequeados.

La etapa de diseño y optimización estadística de las formulaciones se realizó utilizando el lenguaje R, a través de RStudio, empleando los paquetes de cálculo indicados en cada sección. El resto de los análisis estadísticos presentados fueron realizados empleando el software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Diseño, optimización racional y preparación de los nanosistemas

Screening de factores principales

Se prepararon 16 formulaciones diferentes de acuerdo al diseño propuesto en la sección 3.1.1. En **Tabla 3.4** se muestra el diseño generado por RStudio junto con los resultados obtenidos a partir de los análisis por DLS.

Tabla 3.4 | Tabla del diseño experimental generado por el software R, a través del paquete “FrF2”. Donde X_1 corresponde a la cantidad de lípido (en mg), X_2 a la cantidad de tensioactivo (en mg), X_3 la cantidad de aceite (en μ l), X_4 el tiempo de sonicado (en min) y X_5 la potencia de sonicado (en %) utilizados para cada formulación, junto con los resultados obtenidos por DLS para el tamaño de partícula (nm, Y_1), índice de polidispersión (Y_2) y potencial Z (mV, Y_3).

N° Formulación	Parámetros experimentales					Y_1 (nm)	Y_2	Y_3 (mV)
	X_1 (mg)	X_2 (mg)	X_3 (μ l)	X_4 (min)	X_5 (%)			
1	400	800	10	40	60	208,6	-7,08	0,200
2	100	400	200	10	80	198,5	-11,37	0,189
3	100	800	10	40	80	188,5	-1,15	0,212
4	400	800	200	40	80	191,4	-1,49	0,208
5	400	800	200	10	80	210,7	-4,49	0,174
6	400	800	10	10	60	215,7	-11,15	0,207
7	100	400	200	40	80	201,2	-5,72	0,118
8	100	400	10	10	60	150,2	-9,56	0,236
9	100	400	10	40	60	144,0	-8,53	0,233
10	400	400	200	40	60	245,8	-16,8	0,158
11	400	400	10	40	80	242,6	-14,48	0,114
12	100	800	200	40	60	174,2	-4,86	0,165
13	100	800	200	10	60	199,5	-5,45	0,148
14	100	800	10	10	80	189,1	-4,42	0,234
15	400	400	10	10	80	240,1	-14,13	0,184
16	400	400	200	10	60	216,2	-18,14	0,064

En el caso del tamaño de partícula (**Tabla 3.5**), el análisis de varianza (ANOVA), teniendo en cuenta los 5 factores, reveló que el factor “cantidad de lípido (X_1)” fue el único que resultó muy significativo ($p < 0,01$), mientras que el resto de los factores no presentaron afectaron significativamente al tamaño de partícula obtenido ($p > 0,05$).

Tabla 3.5 | ANOVA de la variable Y_1 (tamaño de partícula, nm)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p-valor
X_1	1	6638,2	6638,2	13,37	0,0044 *
X_2	1	231,8	231,8	0,47	0,5100
X_3	1	215,4	215,4	0,43	0,5250
X_4	1	35,1	35,1	0,07	0,7957
X_5	1	727,7	727,7	1,47	0,2538
Residuos	10	4963,7	496,4		

Para el caso del índice de polidispersión (**Tabla 3.6**), ninguno de los factores presentó un efecto muy significativo ($p > 0,01$ en todos los casos); y únicamente X_3 (cantidad de aceite, μl) mostró efectos significativos ($0,01 < p < 0,05$).

Tabla 3.6 | ANOVA de la variable Y_2 (PDI, adimensional)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p-valor
X_1	1	0,0032	0,0032	1,75	0,2148
X_2	1	0,0040	0,0040	2,18	0,1705
X_3	1	0,0098	0,0098	5,39	0,0427
X_4	1	$4,90 \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^{-5}$	0,03	0,8729
X_5	1	$3,02 \times 10^{-5}$	$3,02 \times 10^{-5}$	0,02	0,9000
Residuos	10	0,0182	0,0018		

Por último, los factores “cantidad de lípido” (X_1) y “cantidad de tensioactivo” (X_2) mostraron tener un efecto muy significativo ($p < 0,01$) sobre la variable respuesta “potencial Z” (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.7 | ANOVA de la variable Y_3 (Potencial Z, mV)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p-valor
X_1	1	84,272	84,272	15,24	0,0029 *
X_2	1	215,062	215,062	38,90	$9,67 \times 10^{-5}$ *
X_3	1	0,303	0,303	0,05	0,8200
X_4	1	21,669	21,669	3,92	0,0759
X_5	1	36,906	36,906	6,67	0,0272
Residuos	10	55,291	5,529		

A partir de estos resultados se decidió seleccionar a los factores “cantidad de lípido” y “cantidad de tensioactivo” como variables del diseño para la optimización del sistema. Los factores que mostraron poco o ningún efecto significativo fueron fijados en los siguientes valores: 24 μ l para el factor “cantidad de aceite”, 20 minutos para el factor “tiempo de sonicado” y 80% para el factor “potencia de sonicado”.

Optimización de las formulaciones por RSM

En la sección anterior pudo comprobarse que tanto la cantidad de lípido como la de tensioactivo utilizados para la síntesis, fueron los factores que principalmente modificaban las variables respuesta. Por este motivo, esos dos factores fueron utilizados para la generación del DCC seleccionado para el análisis de las superficies de respuesta. Los niveles de cada factores y los objetivos buscados para cada una de las respuestas pueden verse en la **Tabla 3.3** de la sección 3.1.1. Para comenzar con la optimización, se generó el diseño y se aleatorizaron las síntesis utilizando el paquete “*rsm*” junto con la herramienta RStudio.

Una vez generado el diseño, las formulaciones fueron preparadas siguiendo la metodología descrita en la sección 5.310.1. Posteriormente, cada una de las formulaciones fue analizada por DLS para la obtención de los valores de las

variables respuestas necesarias para el análisis estadístico del diseño generado. La

Tabla 3.8 muestra los resultados de cada una de la síntesis.

Tabla 3.8 | Valores obtenidos por DLS de todas las formulaciones del DCC. Cantidad de lípido (X_1 , mg), cantidad de tensioactivo (X_2 , mg), tamaño de partícula (Y_1 , nm), índice de polidispersión (Y_2) y potencial Z (Y_3 , mV). El asterisco indica las réplicas del punto central del diseño.

Nº Síntesis	X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3
1*	500.0	700.0	144.19	0.254	-10.345
2*	500.0	700.0	145.61	0.248	-8.308
3*	500.0	700.0	146.04	0.260	-8.953
4	250.0	900.0	183.34	0.376	-2.143
5*	500.0	700.0	153.91	0.256	-9.348
6	750.0	500.0	199.23	0.240	-8.530
7	250.0	500.0	170.78	0.370	-1.101
8	853.6	700.0	164.13	0.263	-9.220
9	500.0	417.2	164.48	0.305	-11.250
10	750.0	900.0	169.66	0.238	-4.763
11*	500.0	700.0	153.30	0.280	-5.125
12	500.0	982.8	155.39	0.282	-7.433
13	146.4	700.0	219.22	0.433	-2.743

Con los datos obtenidos, el diseño se ajustó a cuatro modelos diferentes: el primer modelo considerado, fue el modelo lineal múltiple, o modelo de primer orden, donde se tienen en cuenta solo los factores principales. Este modelo puede expresarse, matemáticamente, de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon \quad (3.7)$$

donde X_1 y X_2 son las regresoras del modelo, Y es la variable respuesta y ε es el error al azar de modelo. por otro lado, β_0 es la intercepción al eje y β_1 y β_2 son los *coeficientes de regresión parcial* ya que β_1 es una medida del cambio esperado en Y por unidad de cambio en X_1 mientras X_2 se mantiene fijo y β_2 es la medida de cambio esperado de Y por unidad de cambio en X_2 cuando X_1 se mantiene fijo.

El segundo modelo considerado, fue el modelo lineal múltiple considerando las interacciones entre factores, el cual puede expresarse de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad (3.8)$$

en este caso, además de los términos considerados en el modelo lineal sin interacciones, se añade el efecto de la interacción entre las variables regresoras sobre la variable respuesta.

El tercer modelo analizado fue el modelo cuadrático puro, donde se tienen en cuenta los términos cuadráticos y lineales de las regresoras, pero no las interacciones. Este modelo puede escribirse de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_{11}^2 + \beta_{22} X_{22}^2 + \varepsilon \quad (3.9)$$

Por último, se analizó el modelo de segundo orden, donde además de los términos lineales y cuadráticos, se agrega la interacción entre factores. Matemáticamente, el diseño puede expresarse:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_{11}^2 + \beta_{22} X_{22}^2 + \varepsilon \quad (3.10)$$

En la **Tabla 3.9** se muestra un resumen con los resultados obtenidos para cada respuesta ajustada a cada uno de los modelos.

Tabla 3.9 | Valores de R^2 ajustado y significancia (p-valor) de cada uno de los modelos ajustados: L = lineal; L+I = lineal + interacciones; CP = cuadrático puro; SO = segundo orden

	Modelo	R^2 ajustado	<i>p-valor</i>
Tamaño de partícula (Y_1)	L	0	0,5840
	L+I	0	0,6072
	CP	0,58	0,0228
	SO	0,65	0,0224
PDI (Y_2)	L	0,65	0,0020
	L+I	0,62	0,0080
	CP	0,96	$3,3 \times 10^{-6}$
	SO	0,95	$2,9 \times 10^{-5}$
Z-pot (Y_3)	L	0,29	0,0714
	L+I	0,27	0,1262
	CP	0,46	0,0583
	SO	0,46	0,0885

A partir de estos resultados, se seleccionaron los modelos cuadráticos puros para las respuestas PDI y Z-pot y segundo orden para tamaño de partícula. Los modelos para cada respuesta quedan, a partir de los resultados dados por RStudio:

$$Y_1 = 148,61 - 7,89X_1 - 3,73X_2 - 10,5325X_1X_2 + 22,77X_1^2 + 6,90X_2^2 \quad (3.11)$$

$$Y_2 = 0,260 - 0,063X_1 - 0,003X_2 + 0,040X_1^2 + 0,013X_2^2 \quad (3.17)$$

$$Y_3 = -8,41 - 2,40X_1 + 1,01X_2 + 2,10X_1^2 + 0,42X_2^2 \quad (3.13)$$

Para estudiar la combinación de factores que logren dar las mejores respuestas, y a partir de los modelos generados, se crearon las superficies de respuestas correspondientes, las cuales se muestran en la **Figura 3.4**.

A

B

C

Figura 3.4. | Superficies de respuesta correspondientes a tamaño de partícula (A), índice de polidispersión (B) y potencial Z (C) en función de la cantidad de lípido (mg) y tensioactivo (mg).

Se prosiguió entonces con la optimización de las respuestas a través de la función de deseabilidad. Dado que se buscó minimizar todas las respuestas consideradas, se decidió usar la Ecuación 3.4 para cada una de las respuestas para luego unificarlas utilizando la Ecuación 3.6. De esta manera se calculó la deseabilidad general para todas las respuestas. Según esta función, con una deseabilidad igual a 0,8977, los valores óptimos de “*cantidad de lípido*” y “*cantidad de tensioactivo*” fueron de 616,9 mg y 706,8 mg, respectivamente. Con estos valores, se sintetizó la formulación optimizada, por triplicado, y se midió el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de cada una de ellas. Por último, se calculó el error de predicción del modelo utilizando la expresión:

$$S_{pred} = s \cdot \sqrt{\frac{1}{n} x_0 (X^T X)^{-1} x_0^T} \quad (3.14)$$

donde s representa la raíz cuadrada del cuadrado medio del error, x_0 es una matriz que refleja los valores de x expandidos en el espacio del modelo, X es la matriz del modelo que consiste en los niveles de las variables dependientes expandidas a la forma del modelo y el supra índice T indica que esas matrices se encuentran traspuestas (Myers et al. 2009). En la **Tabla 3.10** se muestran los valores medios obtenidos para cada respuesta junto con los errores estándar de predicción para cada una ellas.

Tabla 3.10 | Valores medios obtenidos para cada una de las respuestas consideradas (N=3) y sus respectivos errores estándar de predicción.

Respuesta	Valor medio	S_{pred}	CV%
Tamaño de partícula	178,57	9,52	5,35
Índice de polidispersión	0,244	0,009	3,69
Potencial Z	-12,16	1,57	12,91

Por último, se medió el %EE y %DL de la formulación optimizada obteniéndose valores medios de 98,24% y 7,7%, respectivamente.

3.2.2 Caracterización fisicoquímica

Microscopía de fuerza atómica

Además de la medida del tamaño de partículas obtenido por DLS, se utilizó la técnica de AFM para evaluar tanto la morfología como el tamaño¹⁹. En la **Figura 3.5** se muestra la imagen obtenida por esta metodología. En el plano xy pudieron observarse tamaños del orden de los 250 nm, mientras que en el eje z el tamaño fue de alrededor de los 10 nm.

Como se comentó anteriormente, las partículas de naturaleza “blanda” tales como SLN/NLC tienden a verse más planas y anchas por AFM que por otras metodologías, debido a la aparición de fuerzas de atracción con el soporte y a fuerzas débiles de la sonda, incluso en modo tapping (Dubes et al. 2003; Mazuryk et al. 2016; Peixoto et al. 2005; Vitorino et al. 2011). Es por ello que consideramos a esta técnica como una caracterización morfológica complementaria de nuestras muestras, mientras que consideramos a los resultados por DLS como “más confiables” para la determinación del tamaño de partículas blandas, debido a que esta técnica es más representativa de lo que ocurre con las partículas en suspensión acuosa (Schärlt 2007).

También se pudo notar la presencia de algunas partículas más pequeñas, responsables de generar una polidispersión superior a 0,200. Por otro lado, esta metodología logró evidenciar la morfología de estas partículas, viéndose en todos los casos partículas de forma esférica.

¹⁹ La pandemia de COVID-19 no permitió la evaluación de la morfología y tamaño de partícula a través de microscopía de transmisión electrónica (TEM). Sin embargo, se prevé realizar esta caracterización una vez los equipos se encuentren disponibles y funcionales.

Figura 3.5 | Imagen obtenida por AFM de las nanopartículas lipídicas cargadas con PB. El aplanamiento de las nanopartículas generado por las fuerzas atractivas del soporte y las fuerzas débiles de la sonda produce tamaños de partículas que difieren significativamente de los obtenidos por DLS.

Análisis por calorimetría diferencial de barrido

En la **Figura 3.6** se muestran los termogramas correspondientes a PB (A), miristil miristato (B) y Pluronic F68, por separado, y los termogramas superpuestos de los compuestos antes mencionados junto con los correspondientes a NLC-vehículo y NLC-PB (D). La curva de DSC correspondiente a PB muestra un solo pico endotérmico a 175,44 °C con una entalpía de fusión de 127,09 J/g, correspondiente al polimorfo I del PB (Hásl et al. 2019) (**Tabla 3.8**).

En el termograma correspondiente a miristil miristato (B) pueden observarse dos picos endotérmicos a 31,1 y 42,8 °C. El comportamiento térmico del miristil miristato puede explicarse en base a la estructura cristalina del mismo: como cualquier sólido, los lípidos sólidos forman cristales compuestos por arreglos tridimensionales regulares de moléculas (Pérez et al. 2017). Cada cristal está formado por una cantidad determinada de celdas unidad de dicho arreglo, y estas

celdas están compuestas por sub-celdas, siendo estas últimas las estructuras periódicas más pequeñas. En los lípidos existen tres tipos de sub-celdas predominantes que dan origen a distintos polimorfos, los polimorfos α , β' y β . La forma α es metaestable con un empaquetamiento hexagonal, la forma β' posee una estabilidad intermedia y posee un empaquetamiento del tipo ortorrómbico perpendicular y la forma β tiene una estabilidad mucho mayor y un empaquetamiento triclinico paralelo (Grotenhuis et al. 1999). El punto de fusión, entonces, quedará establecido en base a la energía de la red, es decir, aumentará a medida que aumente su estabilidad. La forma α suele transformarse rápidamente en β' ; pero para la conversión de esta última a la forma β se requiere más energía (posee una energía libre de activación mucho mayor) (Paula Badan Ribeiro et al.). De esta manera, podría decirse que el pico endotérmico a los 31,1 °C del miristil miristato podría corresponder al polimorfo α , mientras que el segundo pico (42,8 °C) correspondería al polimorfo β' , no pudiéndose observar formación de polimorfo β .

Por su parte, la curva de DSC del Pluronic F68 que puede observarse en la **Figura 3.6 C**, muestra un solo pico endotérmico a los 54,8 °C, comprendido dentro del rango de fusión que establece la hoja de especificaciones del proveedor (*Kolliphor® P 188 / Sigma-Aldrich*).

En el caso del nanovehículo (sin PB) pueden verse solo dos picos, uno a 41,3 °C y el otro a 51,7 °C. En este caso, el primer pico podría asociarse a la forma polimórfica β' del miristil miristato mientras que el segundo se trataría del Pluronic F68. La disminución del punto de fusión del polimorfo en la formulación, respecto de la materia prima es un indicativo de una disminución en el ordenamiento de la red cristalina del mismo (Freitas & Müller 1999).

Por último, el termograma de las nanopartículas conteniendo PB presenta las mismas características que el vehículo nanoestructurado sin presencia del pico característico del PB, lo que indica una buena dispersión del fármaco dentro de la matriz lipídica, es decir, el fármaco podría encontrarse en un estado amorfo o molecularmente disperso dentro de la matriz, no mostrando el pico característico de su estado cristalino. Luego de la obtención de los puntos de fusión y comparación de las muestras, se realizó un análisis del índice de cristalinidad del miristil miristato, formando parte de las nanopartículas, respecto al lípido puro. Este cálculo permite evaluar el grado de ordenamiento de la red cristalina del lípido luego del mezclado de los componentes y el proceso de síntesis. Un menor índice de cristalinidad está asociado a una mayor estabilidad de la formulación y a una disminución de la expulsión del fármaco desde la matriz durante el almacenamiento (Müller et al. 2000). Para el cálculo del área bajo la curva, primero debieron transformarse los datos de capacidad calorífica, expresados en mW, a su equivalente en $\text{J} \cdot \text{seg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Esto se logró dividiendo los mW obtenidos por la masa de muestra analizada en cada caso en particular.

Figura 3.6 | Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a PB (A), miristil miristato (B) y Pluronic F68 (C) y superposición de termogramas de A, B y C junto con las nanopartículas vacías (NLC-vehículo) y cargadas con PB (NLC-PB) (D).

Finalmente, para el cálculo del índice de cristalinidad (IC%), se consideró una concentración de lípido en cada formulación del 3% (p/v) y se utilizó la Ecuación (2.4), del capítulo anterior. Es de esperar que luego de la síntesis y debido al agregado de un aceite, el orden estructural del lípido, o dicho de otra manera, la energía necesaria para romper ese ordenamiento se vea reducida. El agregado de PB parece generar una red algo más estructurada, lo que incrementa levemente el índice de cristalinidad. En la **Tabla 3.11** | Cantidad de muestra analizada, temperatura de fusión (T_f), entalpía de fusión (ΔH_f) e índice de cristalinidad de las muestras analizadas se muestran la temperatura y entalpía de fusión de cada uno de los componentes puros, el vehículo y la formulación conteniendo PB, junto con el IC% obtenido para el vehículo y las nanopartículas conteniendo PB.

Tabla 3.11 | Cantidad de muestra analizada, temperatura de fusión (T_f), entalpía de fusión (ΔH_f) e índice de cristalinidad de las muestras analizadas

Muestra	mg de muestra	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	IC(%)
Fenobarbital	3,7	175,4	127,1	100
Miristil miristato	11,7	31,1 – 42,8*	241,6	100
Pluronic F68	14,4	54,2	156,6	100
NLC	2,0	41,3 – 51,7*	91,6	12,6
NLC-PB	3,1	41,4 – 49,7*	96,7	13,3

**Nota: los valores mostrados corresponden a los puntos de fusión de los polimorfos (α y β') correspondientes al miristil miristato.*

Análisis termogravimétrico

Se realizó el análisis termogravimétrico de muestras de Fenobarbital, miristil miristato, Pluronic F68, NLC y NLC-PB. La **Figura 3.7** muestra los termogramas obtenidos. El termograma obtenido para el PB mostró que este compuesto se mantiene estable térmicamente hasta los 160 °C, donde comienza

un proceso de degradación hasta los 275 °C, perdiéndose casi la totalidad de la masa utilizada en este ensayo. Respecto a la curva correspondiente a miristil miristato, se comprobó a partir de los análisis por DSC que éste poseía una temperatura de fusión entre 31,1 – 42,8 °C. Por TGA pudo observarse que en este punto la pérdida de peso se mantiene relativamente constante hasta los 190 °C aproximadamente. Este último punto se denomina $T_{5\%}$ y corresponde a la temperatura donde se ha perdido un 5% de la masa y por encima de la cual comienza la descomposición irreversible de la muestra (Stamatiou et al. 2017). El proceso de descomposición de la cadena carbonada se da en el rango de temperaturas de 190 – 323 °C aproximadamente, donde se pierde el 95% de la masa total de la muestra.

Por otro lado, el termograma del Pluronic F68 mostró un solo proceso térmico de descomposición comenzando a los 314 °C y culminando a los 414 °C, aproximadamente.

Por último, tanto NLC como NLC-PB mostraron dos procesos térmicos diferenciados. El primer proceso térmico se observa entre los 180 y 260 °C y podría corresponder a la descomposición térmica del miristil miristato que forma parte de la matriz de las nanopartículas. El segundo proceso térmico se da en el rango de 260 – 410 °C, lo que se correspondería con la descomposición térmica del Pluronic F68. La ausencia de un proceso de descomposición relacionado con el PB podría indicar que el mismo logró incorporarse dentro de las nanopartículas en una manera amorfa u homogéneamente disperso, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores.

Figura 3.7 | Termogramas directos (A) y derivados (B) obtenidos por TGA de PB (negro), miristil miristato (rojo), Pluronic F68 (azul), aceite (verde), NLC-vehículo (violeta) y NLC-PB (marrón).

Análisis por difracción de rayos X

Para confirmar la estructura cristalina de las nanopartículas sólidas e identificar el tipo de polimorfismo de la matriz lipídica luego del proceso de síntesis e incorporación de PB, se utilizó la metodología de difracción de rayos X a ángulos bajos (SASX) y ángulos amplios (WAXS). La **Figura 3.8** muestra los patrones de difracción del PB, de las materias primas utilizadas y la superposición con los NLC vacíos (vehículos) y NLC-PB.

La **Figura 3.8A** muestra el patrón de difracción del PB. Los picos principales extraídos del gráfico se presentan en los ángulos (2θ) $15,17^\circ$, $16,50^\circ$ y $21,96^\circ$. En base a estos resultados y los obtenidos en el ensayo por DSC, puede decirse que se trata del polimorfo I de PB (Zencirci et al. 2010). La **Figura 3.8B**, por otro lado, muestra el patrón de difracción del miristil miristato. Este patrón muestra sus picos principales a $2,54^\circ$, $21,67^\circ$ y $23,87^\circ$ dando como resultado un espaciamiento d (d -spacing²⁰) de $3,47 \text{ \AA}$, $0,41 \text{ \AA}$ y $0,37 \text{ \AA}$, respectivamente. Estos espaciamientos son característicos de los polimorfos α y β' en compuestos lipídicos (Jenning et al. 2000). Como se mencionó anteriormente, los lípidos pueden existir en tres formas polimórficas, la forma α , β' y β siendo la forma β' una forma metaestable intermedia con zonas relativamente desordenadas formando clústeres amorfos (Bunjies & Unruh 2007). Por su parte, el Pluronic F68 (**Figura 3.8C**) mostró 3 picos principales a $0,68^\circ$, $19,13^\circ$ y $23,31^\circ$ que coinciden con publicaciones de otros autores (Fathy & El-Badry 2003). En cuanto a las nanoformulaciones (**Figura 3.8D**), tanto el vehículo como la formulación conteniendo PB, presentaron 5 picos principales a $0,51^\circ$, $2,54^\circ$, $19,17^\circ$, $21,69^\circ$ y $23,90^\circ$, éste último pico parece estar superpuesto a otro situado a los $23,36^\circ$. Los picos a $2,54^\circ$, $21,17^\circ$

²⁰ El espaciamiento d (d -spacing) se define como el espacio interplanar entre 2 filas contiguas de átomos que da origen a los picos de difracción. Estos patrones de difracción son únicos para cada compuesto (Nasrollahzadeh et al. 2019).

y $23,90^\circ$ en ambos casos, sugieren la existencia de una estructura cristalina de la matriz lipídica, particularmente de su estado polimorfo β' . Por otro lado, los picos situados a $0,51^\circ$, $19,17^\circ$ y $23,31^\circ$, corresponderían al patrón de difracción del Pluronic F68. En la **Tabla 3.12** se muestra un resumen de los resultados obtenidos para las materias primas y las formulaciones con y sin PB.

Por último, no es posible identificar ningún pico característico de PB en la formulación NLC-PB, apoyando la hipótesis formulada en las secciones anteriores, a partir de los datos obtenidos por DSC y TGA, donde se planteó que el fármaco se encontraría en estado amorfo o molecularmente disperso dentro de la matriz lipídica.

Tabla 3.12 | Resumen de las posiciones de los picos principales de las materias primas utilizadas y de las formulaciones con y sin PB

$\lambda = 0,15419 \text{ nm}$			
Compuesto	Posición del pico (2θ)	Ángulo (θ)	d -spacing ($\text{\AA}$)
Miristil miristato	21,67	10,84	0,21
	23,87	11,93	0,19
Pluronic F68	19,13	9,56	0,24
	23,29	11,65	0,19
NLC (vehículo)	19,13	9,56	0,24
	21,64	10,82	0,21
	23,33	11,67	0,19
	23,90	11,95	0,19
NLC-PB	19,18	9,59	0,23
	21,64	10,82	0,21
	23,33	11,67	0,19
	23,90	11,95	0,19

Figura 3.8 | Patrones de difracción de rayos X correspondientes a Fenobarbital (A), miristil miristato (B), Pluronic F68 (C), y comparación de los patrones de difracción de las formulaciones con y sin PB con las materias primas.

Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se estudiaron las posibles interacciones entre componentes de la formulación así como también la composición superficial de las nanopartículas lipídicas a través de FTIR. Como puede observarse en la **Figura 3.9A**, el PB presentó una banda de baja intensidad a 3343 cm^{-1} que puede asignarse al sobretono que genera el estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$ unidos al C que posee los sustituyentes fenil y etil. En las frecuencias 3303 cm^{-1} y 3075 cm^{-1} se ven las bandas del estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos N-H, respectivamente. Las bandas presentes en 3170 , 2962 , 2931 y 2865 cm^{-1} pueden asignarse al estiramiento de los grupos CH_2 y CH_3 presentes en el sustituyente etilo, mientras que aquellas bandas a 3303 y 3075 cm^{-1} corresponderían al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos N-H, respectivamente. Sobre frecuencias más bajas, pueden observarse las bandas correspondientes al estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$: la banda situada a 1765 cm^{-1} , puede ser asignada al estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ situado entre los grupos N-H ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$). Estos nitrógenos podrían generar un efecto inductivo responsable del corrimiento hacia frecuencias más altas del grupo $\text{C}=\text{O}$, ya que al no encontrarse en el mismo plano que el grupo carbonilo, el sistema de conjugación se ve debilitado. Por otro lado, la banda situada a 1672 cm^{-1} podría corresponder al estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$ situados en el mismo plano que los grupos N-H ($-\text{C}-\text{CO}-\text{NH}-$). En este caso, la formación de un sistema de conjugación $p-\pi$, entre los grupos $\text{C}=\text{O}$ y N-H, podría ser el causante del corrimiento de la banda hacia frecuencias más bajas. Por último, pueden observarse bandas a 1374 , 1301 y 1221 cm^{-1} atribuibles a la frecuencia de estiramiento de los enlaces C-N (Gunasekaran et al. 2006; Lin et al. 2013).

Figura 3.9 | Espectros por FTIR correspondientes a PB (A), miristil miristato (B) y Pluronic F68 (C) y superposición de espectros de A, B y C junto con el aceite, nanovehículo sin cargar y las nanopartículas cargadas con PB (D).

La **Figura 3.9B**, muestra el espectro IR del miristil miristato, donde pueden observarse dos bandas características a 2914 y 2849 cm^{-1} debidas a los estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos metilo y metileno (C-H) de las cadenas carbonadas, respectivamente. También se observa una banda característica de los esteres a 1729 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo C=O y a 1176 cm^{-1} debida al estiramiento de la unión C-O. También puede verse una banda a 1466 cm^{-1} debida al movimiento de flexión de los grupos metilo y metileno. (Islan et al. 2016; Nosal et al. 2020). Por último, se genera una doble banda (722 y 708 cm^{-1}) debidas al movimiento de balanceo características del empaquetamiento ortorrómbico paralelo del polimorfo β' (de Ruig 1971).

En cuanto al espectro del Pluronic F68 (**Figura 3.9C**) pueden verse la banda característica a 3520 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos O-H. Por otro lado, puede observarse una banda intensa a 2876 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico de las uniones C-H de las cadenas alifáticas del copolímero, mientras que la banda a 1462 cm^{-1} correspondería con el movimiento de flexión de los grupos $-\text{CH}_2$. Las bandas a 1344 cm^{-1} y 1095 cm^{-1} pueden ser asignadas al movimiento de flexión de los grupos O-H y el estiramiento simétrico de las uniones C-O-C de las uniones éter. Finalmente, pueden observarse 2 bandas a 952 cm^{-1} y 837 cm^{-1} correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, de las uniones C-C-O (Li et al. 2016; Sharma et al. 2013; Wang et al. 2010).

Por último, en la **Figura 3.9D** se muestran los espectros superpuestos de los compuestos antes mencionados como así también del aceite utilizado y de las nanopartículas con y sin Fenobarbital (NLC y NLC-PB). En estos últimos espectros puede observarse la contribución del miristil miristato, aceite y el Pluronic F68. Sin embargo, las bandas asociadas a los componentes antes mencionados sufrieron un pequeño corrimiento hacia números de onda más altos, lo que podría indicar una restructuración parcial de la matriz lipídica luego de la

incorporación del Pluronic F68 (Rodnak-Kladniew et al. 2019). Finalmente, ninguna de las bandas características del Fenobarbital pudo evidenciarse en el espectro de las NLC-PB, lo que soporta la teoría de la incorporación del fármaco dentro de la matriz lipídica, discutida en el ensayo de XRD.

3.2.3 Ensayos de liberación in vitro

En la **Figura 3.10** pueden observarse los perfiles de liberación de PB a los diferentes pH desde las nanopartículas y los correspondientes al control. A todos los pH se logró una liberación del fármaco más lenta respecto a los controles.

Figura 3.10 | Liberación de PB desde la formulación optimizada a diferentes pH, utilizando como control comprimidos de PB 100 mg de la marca Luminal.

En la **Tabla 3.13** se presentan las medidas de bondad de ajuste obtenidas para cada modelo matemático a cada pH, calculada con el complemento de Excel

DDSolver (Zhang et al. 2010). El análisis de la cinética de liberación mostró un ajuste similar (en relevancia) a los mismos modelos matemáticos que en el caso de CBZ, resultado esperable considerando la similitud, tanto en composición como preparación, de las nanopartículas.

Tabla 3.13 | Medidas del ajuste a los modelos de liberación de los datos correspondientes a la formulación NLC-PB en los tres medios ensayados. Se muestran los grados de libertad (GL) y las siguientes medidas de bondad de ajuste: R^2 , R^2 ajustado, error cuadrático medio (MSE) el criterio de información de Akaike (AIC)

pH 1,2					
Modelo	G.L	R^2	R^2 adj	MSE	AIC
Primer orden	7	0,9016	0,9016	46,7488	28,15
Hopfenberg	6	0,8046	0,7394	123,7171	33,57
Baker-Lonsdale	7	0,9694	0,9694	14,5867	22,32
Korsmeyer-Peppas	6	0,9704	0,9605	18,8057	24,14
Hixon-Crowell	7	0,7775	0,7775	105,7979	32,24
pH 4,5					
Modelo	G.L	R^2	R^2 adj	MSE	AIC
Primer orden	7	0,9698	0,9698	15,1535	17,16
Hopfenberg	6	0,8932	0,8398	80,7792	24,32
Baker-Lonsdale	7	0,9457	0,9457	27,5886	19,64
Korsmeyer-Peppas	6	0,9900	0,9850	7,6320	14,87
Hixon-Crowell	7	0,8932	0,8932	53,8528	22,32
pH 7,4					
Modelo	G.L	R^2	R^2 adj	MSE	AIC
Primer orden*	7	0,9815	0,9815	10,3187	15,64
Hopfenberg	6	0,9036	0,8554	81,0209	24,35
Baker-Lonsdale	7	0,9335	0,9335	37,3972	20,86
Korsmeyer-Peppas	6	0,9733	0,9600	22,5702	19,15
Hixon-Crowell	7	0,9036	0,9036	54,0139	22,35

* Si bien en este caso el modelo de primer orden presenta mejores medidas de bondad de ajuste, el análisis comparativo de los gráficos $\text{Log}(M_t/M_\infty)$ vs. t o $\text{Log}(M_t/M_\infty)$ vs. $\text{Log}(t)$ muestra claramente que la dependencia entre la fracción disuelta y el tiempo es del tipo potencial, no exponencial.

En cuanto a la diferencia observada en la velocidad de disolución de los fármacos a partir de las formulaciones (NLC-CBZ vs. NLC-PB), sobre todo durante las primeras horas, es posible que la misma se deba a las diferencias de composición de las nanopartículas, y de lipofilia de los fármacos. Mientras que CBZ posee un valor de logP (medida de la lipofilia, equivalente al logaritmo de la constante de reparto octanol/agua) de 2,8 (Scheytt et al. 2005), PB posee un logP de 1,4 (Löscher & Rogawski 2012) (ver **Figura 3.11**). Estos valores, junto a las diferencias de formulación en cada caso, permitirían explicar el distinto empaquetamiento entre las formulaciones de CBZ y PB (el cual, a su vez, se reflejó en los valores de IC% obtenidos: 19,4 y 13,3 para NLC-CBZ y NLC-PB, respectivamente), responsable de la mayor velocidad de liberación de PB en el tramo inicial de la curva.

Figura 3.11 | Simulación tridimensional (Marvinsketch, ChemAxon Ltd, Budapest, Hungría) de las superficies moleculares de CBZ y PB. Con azul se representan las zonas lipofílicas (mayor cuanto más intenso) y con rojo las hidrofílicas.

3.2.4 Evaluación de la actividad anticonvulsiva

El porcentaje de protección de los diferentes grupos de tratamientos a los diferentes tiempo extraídos del ensayo de actividad anticonvulsiva se muestran en la **Figura 3.12**. Los resultados obtenidos para los controles negativos (SF), no fueron incluidos en el gráfico, debido a que en todos los casos el porcentaje de protección observado fue de 0%, es decir, todos los animales en este grupo sufrieron ataques convulsivos, luego de la administración de PTZ a los tiempos estudiados. Por otro lado, si bien el vehículo sin fármaco (barras violetas) no mostró actividad en los primeros tiempos, al menos 1 ratón, de los 5 correspondientes, mostró algún tipo de protección a los tiempos 4 y 6 hs. Dado que el vehículo no contiene PB, esta protección aparente podría asociarse a la variabilidad interindividual presente en los animales de experimentación. En cuanto al PB (como droga libre, barras anaranjadas) e incorporado dentro de las nanopartículas (NLC-PB, barras verdes), la protección frente a la acción de PTZ resultó ser muy similar entre los grupos.

Adicionalmente, ninguno de los ratones ensayados mostró tener efectos neurotóxicos, luego de la administración de cada uno de los tratamientos, al realizarse el test RotoRod.

Con el objetivo de diferenciar entre ambos grupos, se ensayó una dosis más: 15 mg/kg, correspondiente a la dosis efectiva 50% (ED50) de PB en el ensayo PTZ. Los resultados no se presentan ya que se comenzó ensayando únicamente dos tiempos (1 y 4 hs), y el ensayo no se continuó al no evidenciarse diferencias entre droga libre y NLC-PB (igual número de ratones protegidos frente al tratamiento con PTZ). Por lo tanto, si bien nos planteamos aumentar el número de animales a futuro, los datos de actividad *in-vivo* aquí presentados indicarían que, si bien

las nanopartículas de PB son efectivas para evitar las crisis convulsivas inducidas por PTZ, no evidenciarían mejoras respecto a la droga libre.

A pesar de lo antedicho, creemos que la similitud en cuanto a la protección entre estos dos grupos es un resultado prometedor, sobre todo si se analizan los datos en conjunto con los de la sección anterior. En otras palabras, estos resultados podrían ser un indicio (indirecto) de que las NP son capaces de ingresar al SNC como tales, o bien de que la droga liberada paulatinamente a partir de las NP (las cuales, por ejemplo, recién habían liberado alrededor del 30% a los 30 min) es suficiente para evidenciar una actividad anticonvulsiva similar a la solución de PB administrada por la misma vía, hecho que tal vez reportaría ventajas de haber prolongado el tiempo de evaluación *in-vivo*.

Figura 3.12 | Evaluación *in vivo* de la actividad anticonvulsivante, expresada como proporción (%) de ratones protegidos a cada tiempo post-dosis. Las barras anaranjadas representan el control positivo, solución de PB libre, las barras verdes la formulación optimizada, NLC-PB, y las barras violetas el vehículo sin droga. Tanto PB libre como las nanopartículas se ensayaron en una dosis de 25 mg/kg.

3.2.5 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad a 30 días no mostraron evidencia de cambios estadísticamente significativos ($p > 0,05$) respecto a los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z del tiempo 0, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente.

3.3 Conclusiones

En el presente capítulo se utilizó la metodología de superficie de respuesta para la optimización de nuevas formulaciones. Esta metodología permitió no sólo identificar la mejor formulación posible, sino también la estandarización de tiempo y la potencia aplicados sobre el sonicador de punta, lo que permite reducir los tiempos de síntesis a la vez que prolonga la vida útil de la sonda. Asimismo, el uso de la RSM permitió tener una comprensión más amplia de los efectos que los diferentes componentes de la formulación poseen en las características finales del sistema, a diferencia del desarrollo de las nanopartículas conteniendo CBZ, donde se utilizó la metodología “prueba y error” con cambios puntuales de los factores. En el caso de PB se lograron obtener buenos modelos predictivos que permitieron conocer o estimar de antemano los posibles cambios en las respuestas medidas.

Del análisis surge que solo los componentes mayoritarios de la formulación son responsables de los cambios significativos en las respuestas de interés y que los modelos que resultan de esta metodología son capaces de predecir las características finales de las nanopartículas.

Por lo tanto, la RSM demostró ser una estupenda herramienta para comprender el sistema desarrollado en este capítulo y una gran variedad de sistemas desarrollados en el laboratorio, lo que permitió generar una base de conocimiento para todo el grupo. Cada vez son más los trabajos en la temática de los nanovehículos que incorporan este tipo de herramientas estadísticas a la hora de seleccionar y optimizar las formulaciones (Cacicedo et al. 2019; Rajpoot & Jain 2019).

Al igual que con las nanopartículas lipídicas conteniendo CBZ, estos sistemas demostraron formar estructuras semicristalinas de forma esférica con tamaños alrededor de los 180 nm, una buena polidispersión y un potencial Z que, sumado

al impedimento estérico otorgado por el tensioactivo, posibilitan que estos sistemas sean estables frente a la agregación. Sistemas con potenciales Z cercanos a ± 30 mV pueden estabilizar una dispersión coloidal exclusivamente por repulsión electrostática (Lim et al. 2020; Mura et al. 2021). Sin embargo, el impedimento estérico otorgado por polímeros no iónicos como el poloxamer, ejerce una acción sinérgica en cuanto a la estabilidad de este tipo de sistemas, permitiendo tener valores de potencial Z menores pero preservando la estabilidad. Esto se encuentra en línea con resultados previos donde sistemas nanoparticulados con potencial Z en el rango aproximados de ± 10 mV resultan estables en suspensión (Rodenak-Kladniew et al. 2019; Shah et al. 2014). Zimmermann y colaboradores demostraron que debido a la estabilización estérica otorgada por el tensioactivo, valores de potencial Z entre -8 y -9 mV son suficientes para estabilizar las partículas en medios gastrointestinales simulados a diferentes pHs (Zimmermann & Müller 2001).

Por otro lado, los resultados de las caracterizaciones fisicoquímicas demostraron que el fármaco fue capaz de incorporarse en un estado no cristalino dentro de la matriz lipídica, sin interacción observable con los componentes de la formulación. Si bien tan sólo se cuenta con datos de estabilidad a 30 días, estos parecen prometedores para concluir que el PB permanece estable a las temperaturas alcanzadas durante el proceso de síntesis y de conservación.

La cinética de liberación observada a partir de la nanoformulación es una evidencia adicional de las características fisicoquímicas antes mencionadas, las cuales ajustan a matrices esféricas donde la droga se encuentra dispersa y es liberada por difusión/disolución, resultado frecuente en este tipo de formulaciones (Andrade et al. 2019; Boztepe et al. 2021; Kipriye et al. 2017). Si bien la menor lipofilia de PB (respecto a CBZ) y el menor empaquetamiento de la matriz lipídica podrían explicar la mayor velocidad de liberación encontrada en este caso, en

todos los medios evaluados el comportamiento de liberación fue significativamente más lento respecto a la droga libre en iguales condiciones.

Por otra parte, las nanopartículas mostraron ser igualmente efectivas, frente a las convulsiones inducidas por PTZ, que la droga libre, lo que posiciona a estos sistemas como una alternativa prometedora a los tratamientos orales tradicionales para la epilepsia. Estos resultados nos alientan a continuar el estudio y evaluación de este tipo de nanoformulaciones para su aplicación al tratamiento de la epilepsia refractaria. Cada vez son más las evidencias de que nanopartículas de tamaño similar a las aquí presentadas son capaces de pasar a través la BHE, permitiendo mejoras terapéuticas para diversas enfermedades del SNC, tales como la enfermedad de Parkinson (Esposito et al. 2008; Pardeshi et al. 2013), el Alzheimer (Dudhipala & Gorre 2020; Vakilinezhad et al. 2018), entre otras.

En cuanto a la vía de administración, si bien este sistema fue probado *in vivo* por administración intraperitoneal, podría ser viable su administración por vía oral. Kumar y colaboradores demostraron una mejora en la biodisponibilidad de metiltioadenosina, un fármaco utilizado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, a través de la incorporación de este fármaco en nanopartículas lipídicas y administrados por vía oral en modelos animales. A su vez, lograron demostrar una mejora de la llegada del fármaco al sistema nervioso central utilizando estos sistemas por esta vía (Kumar et al. 2019). Mohammadi y colaboradores también fueron capaces de mejorar considerablemente la biodisponibilidad relativa en cerebro del fármaco perfenazina (utilizado para el tratamiento de la esquizofrenia), incorporado en nanopartículas lipídicas y administrado por vía oral en ratas (Mohammadi et al. 2021).

Por último, y como nota final a este desarrollo, cabe mencionar que algunos de los ensayos que fueron programados para este capítulo, se vieron impedidos por

la pandemia de COVID-19 y las medidas de restricción impuestas en nuestro país. Por este motivo, no fue posible la evaluación de la permeabilidad de estas nanopartículas sobre monocapa celular ni la observación de las partículas a través de TEM.

Otros estudios se encuentran en curso actualmente. Se presentaron aquí datos de estabilidad de NLC-PB durante 30 días, pero los estudios de estabilidad están planteados para realizarse durante 90 días. También se comenzó el ensayo de citotoxicidad de las formulaciones (tanto de CBZ como de PB) en fibroblastos L929 de ratones. Si bien a la fecha ninguna de las dos formulaciones mostró evidencias de toxicidad, son necesarios más replicados para poder presentar los resultados, por lo cual no fueron incluidos aquí.

Por último, y como se comentó al final del capítulo 2, en este caso también nos proponemos extender los estudios de actividad anticonvulsiva en un modelo animal de epilepsia refractaria (inducido por ácido 3-mercaptopropiónico) (Enrique et al. 2017).

3.4 Referencias del capítulo

- Andrade LN, Oliveira DML, Chaud M V, Alves TFR, Nery M, et al. 2019. molecules Praziquantel-Solid Lipid Nanoparticles Produced by Supercritical Carbon Dioxide Extraction: Physicochemical Characterization, Release Profile, and Cytotoxicity. *Molecules*. 24:3881
- Box GEP, Draper NR. 2007. *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*. Wiley-Interscience
- Boztepe T, Scioli-Montoto S, Ruiz ME, Alvarez VA, Castro GR, León IE. 2021. 8-Hydroxyquinoline platinum(ii) loaded nanostructured lipid carriers: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of antitumor activity. *New J. Chem.* 45(2):821–30
- Bunjes H, Unruh T. 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(6):379–402
- Cacicedo M, Ruiz MC, Scioli Montoto S, Ruiz ME, Fernandez M, et al. 2019. Lipid nanoparticles – Metvan: reveling a novel way to deliver a vanadium compound to bone cancer cells. *New J. Chem.*
- Chauhan VS, Bhardwaj NK, Chakrabarti SK. 2013. Application of response surface methodology and central composite design for the optimization of talc filler and retention aid in papermaking
- Davies JA. 2007. Phenobarbital. In *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, pp. 1–5. Elsevier Inc.
- de Ruig WG. 1971. The infrared spectra of the triglycerides. In *Infrared Spectra of Monoacid Triglycerides with Some Applications to Fat Analysis*, pp. 41–124. Wageningen, Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and

- Documentation. 1st ed.
- Derringer G, Suich R. 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* 12(4):214–19
- Draper NR. 2008. Rotatable Designs and Rotatability. In *Encyclopedia of Statistics in Quality and Reliability*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- Dubes A, Parrot-Lopez H, Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H, et al. 2003. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55(3):279–82
- Dudhipala N, Gorre T. 2020. Neuroprotective effect of ropinirole lipid nanoparticles enriched hydrogel for parkinson’s disease: In vitro, ex vivo, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Pharmaceutics*. 12(5):
- Enrique A, Goicoechea S, Castaño R, Taborda F, Rocha L, et al. 2017. New model of pharmacoresistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. *Epilepsy Res.* 129:8–16
- Esposito E, Fantin M, Marti M, Drechsler M, Paccamiccio L, et al. 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. *Pharm. Res.* 25(7):
- Everett GM, Richards, Richard K. 1945. Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethylthioxazolidine-2,4-dione (Tridione), Dilaantin and Phenobarbital. *J. Nerv. Ment. Dis.* 81(4):402–7
- Fathy M, El-Badry M. 2003. Preparation and Evaluation of Piroxicam-Pluronic Solid Dispersions. *Bull. Pharm. Sci. Assiut.* 26(2):97–108
- Freitas C, Müller RH. 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN(TM)) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm.*

- Biopharm.* 47(2):125–32
- Grömping U. 2014. R Package FrF2 for Creating and Analyzing Fractional Factorial 2-Level Designs. *J. Stat. Softw.* 56(1):1–56
- Grotenhuis E Ten, Van Aken GA, Van Malssen KF, Schenk H. 1999. Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(9):1031–39
- Gunasekaran S, Thilak Kumar R, Ponnusamy S. 2006. Vibrational spectra and normal coordinate analysis of diazepam, phenytoin and phenobarbitone. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 65(5):1041–52
- Guo L, Santschi PH. 2007. Ultrafiltration and its Applications to Sampling and Characterisation of Aquatic Colloids. In *Environmental Colloids and Particles*, pp. 159–221. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- Harrington ECJ. 1965. The desirability Function. *Ind. Qual. Control.* 21(10):494–98
- Hásl T, Jiříček I, Jeremiáš M, Farták J, Pohořelý M. 2019. Cost/Performance Analysis of Commercial-Grade Organic Phase-Change Materials for Low-Temperature Heat Storage. *Energies.* 13(1):5
- Hauptmann, Alfred. 1912. Luminal bei Epilepsie. *Munch Med Wochenschr.* 59:1907–9
- Islan GAGAGA, Tornello PC, Abraham GA, Duran N, Castro GR. 2016. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 143:168–76
- Jelveghari M, Nokhodchi A. 2008. Development and chemical stability studies of

- alcohol-free phenobarbital solution for use in pediatrics: A technical note. *AAPS PharmSciTech.* 9(3):939–43
- Jenning V, Thünemann AF, Gohla SH. 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199(2):167–77
- Kipriye Z, Şenel B, Yenilmez E. 2017. Preparation and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for targeted drug delivery. *Trop. J. Pharm. Res.* 16(9):2057–68
- Kolliphor® P 188 / Sigma-Aldrich.
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/kolliphorp18812345900311611?lang=es®ion=AR&gclid=CjwKCAiAmrOBBhA0EiwArn3mfKxuDtIV52NCBX1HIE3xMwKP9Xb5YgInMkk74oKtbw6ZKoEgESq-KxoCl2YQAvD_BwE
- Kuehl RO. 2001. *Diseño de Experimentos: Principios Estadísticos de Diseño y Análisis de Investigación*. Mexico: Thomson Learning. 2nd ed.
- Kuhn M. 2016. desirability: Function Optimization and Ranking via Desirability Functions
- Kumar P, Sharma G, Gupta V, Kaur R, Thakur K, et al. 2019. Oral Delivery of Methylthioadenosine to the Brain Employing Solid Lipid Nanoparticles: Pharmacokinetic, Behavioral, and Histopathological Evidences. *AAPS PharmSciTech.* 20(2):
- Lenth R V. 2009. Response-Surface Methods in R, Using rsm. *J. Stat. Softw.* 32(7):1–17
- Li H, Xu Y, Wu M, Fan L, He C, et al. 2016. Vitamin E succinate-conjugated F68 micelles for mitoxantrone delivery in enhancing anticancer activity. *Int.*

- J. Nanomedicine*. Volume 11:3167–78
- Lim H, Jo M, Ban C, Choi YJ. 2020. Interfacial and colloidal characterization of oil-in-water emulsions stabilized by interface-tunable solid lipid nanoparticles. *Food Chem.* 306:125619
- Lin L, Lv J, Ji Y, Feng J, Liu Y, et al. 2013. Characterization of Barbiturates by Infrared and Raman Microscopy. *Anal. Lett.* 46(18):2890–98
- Löscher W. 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20(5):359–68
- Löscher W, Potschka H. 2005. Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *NeuroRx.* 2(1):86–98
- Löscher W, Rogawski MA. 2012. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia.* 53 Suppl 8:12–25
- Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. 2008. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology.* 55(8):1364–75
- Mazuryk J, Deptuła T, Polchi A, Gapiński J, Giovagnoli S, et al. 2016. Rapamycin-loaded solid lipid nanoparticles: Morphology and impact of the drug loading on the phase transition between lipid polymorphs. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 502:54–65
- Mohammadi P, Mahjub R, Mohammadi M, Derakhshandeh K, Ghaleiha A, Mahboobian MM. 2021. Pharmacokinetics and brain distribution studies of perphenazine-loaded solid lipid nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 47(1):
- Montgomery DC, Runger GC. 2003. Design of Experiments with Several Factors. In *Applied Statistics and Probability for Engineers*, eds. DC Montgomery,

- GC Runger, pp. 505–70. Danvers, MA: John Wiley & Sons Inc. 3rd ed.
- Müller RH, Mäder K, Gohla S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(1):161–77
- Mura P, Maestrelli F, D'Ambrosio M, Luceri C, Cirri M. 2021. Evaluation and comparison of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as vectors to develop hydrochlorothiazide effective and safe pediatric oral liquid formulations. *Pharmaceutics.* 13(4):
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. 2009. *Response Surface Methodology. Process and Product Optimization Using Designed Experiments*
- Nasrollahzadeh M, Atarod M, Sajjadi M, Sajadi SM, Issaabadi Z. 2019. Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. In *An Introduction to Green Nanotechnology*, Vol. 28, eds. M Nasrollahzadeh, M Atarod, M Sajjadi, SM Sajadi, Z Issaabadi, pp. 199–322. Elsevier B.V. 1st ed.
- Nosal H, Moser K, Warzała M, Holzer A, Stańczyk D, Sabura E. 2020. Selected Fatty Acids Esters as Potential PHB-V Bioplasticizers: Effect on Mechanical Properties of the Polymer. *J. Polym. Environ.* 29(1):38–53
- Olsson DM, Nelson LS. 1975. The nelder-mead simplex procedure for function minimization. *Technometrics.* 17(1):45–51
- Pardeshi CV, Rajput PV, Belgamwar VS, Tekade AR, Surana SJ. 2013. Novel surface modified solid lipid nanoparticles as intranasal carriers for ropinirole hydrochloride: Application of factorial design approach. *Drug Deliv.* 20(1):47–56

- Paula Badan Ribeiro A, Helen Masuchi M, Koji Miyasaki E, Aliciane Fontenele Domingues M, Luís Zuliani Stroppa V, et al. Crystallization modifiers in lipid systems
- Peixoto FS, Dias PM, Ramaldes GA, Vilela JMC, Andrade MS, Cunha AS. 2005. Atomic force microscopy applied to the characterization of solid lipid nanoparticles. *Microsc. Microanal.* 11(SUPPL. 3):52–55
- Pérez B, Li J, Gou Z. 2017. Chemistry and Properties of Lipids and Phospholipids. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, ed. CC Akoh, p. 1047. Boca Raton, Florida: CRC Press. 4th ed.
- Peterson SL, Albertson TE. *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research*
- Qushawy M, Prabahar K, Abd-Alhaseeb M, Swidan S, Nasr A. 2019. Preparation and evaluation of carbamazepine solid lipid nanoparticle for alleviating seizure activity in pentylenetetrazole-kindled mice. *Molecules.* 24(21):
- R Core Team. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing
- Rajpoot K, Jain SK. 2019. Irinotecan hydrochloride trihydrate loaded folic acid-tailored solid lipid nanoparticles for targeting colorectal cancer: development, characterization, and in vitro cytotoxicity study using HT-29 cells. *J. Microencapsul.* 36(7):
- Rodenak-Kladniew B, Scioli Montoto S, Sbaraglini MLL, Di Ianni M, Ruiz MEE, et al. 2019. Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. *Int. J. Pharm.* 569(569):13
- RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development Environment for R
- Schärlt W. 2007. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg

- Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T. 2005. 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: Carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water. Air. Soil Pollut.* 165(1–4):
- Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. 2014. Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *J. Phys. Sci.* 25(1):
- Sharma A, Jain CP, Tanwar YS. 2013. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with poloxamer 188. *J. Chil. Chem. Soc.* 58(1):1553–57
- Stables JP, Kupferberg HJ. The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. Available at www.ninds.nih.gov/research/asp/addadd_review.pdf (Accessed 09/23/2017)
- Stamatiou A, Obermeyer M, Fischer LJ, Schuetz P, Worlitschek J. 2017. Investigation of unbranched, saturated, carboxylic esters as phase change materials. *Renew. Energy.* 108:401–9
- USP41. 2018. Soluciones amortiguadoras. In *USP Convention*, pp. 6136–37
- Vakilinezhad MA, Amini A, Akbari Javar H, Baha’addini Beigi Zarandi BF, Montaseri H, Dinarvand R. 2018. Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer’s disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. *DARU, J. Pharm. Sci.* 26(2):
- Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. 2011. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84(1):117–30

- Wang T, Wu Y, Zeng AJ. 2010. Synthesis and characterization of amphiphilic pluronic (F68)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine copolymers and their micelles as a drug carrier. *J. Appl. Polym. Sci.* 117(1):NA-NA
- Zencirci N, Gelbrich T, Apperley DC, Harris RK, Kahlenberg V, Griesser UJ. 2010. Structural features, phase relationships and transformation behavior of the polymorphs I-VI of phenobarbital. *Cryst. Growth Des.* 10(1):302–13
- Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, et al. 2010. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* 12(3):263–71
- Zimmermann E, Müller RH. 2001. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52(2):203–10

Conclusiones

Acorde a la Organización Mundial de la Salud, la epilepsia es una de las enfermedades neurológicas crónicas más severas que afecta a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo (World Health Organization 2019). Si bien se han desarrollado muchos fármacos anticonvulsivos en los últimos años (Löscher et al. 2013), entre un 20 – 40% de los pacientes permanece siendo resistente a las terapias tradicionales, es decir, refractarios (Rubio-Donnadieu 2013). Por otro lado, los nuevos FACs, aunque con mejores perfiles farmacocinéticos y/o de seguridad, poseen precios en el mercado que representan entre 10-100 veces más el valor de los FACs clásicos (Mula 2016). Considerando que alrededor del 80% de los casos de epilepsia refractaria se dan en países de bajos y medianos ingresos (Epilepsy (Fact sheet N°999) 2016), nuevas estrategias que posibiliten una mejora de la biodisponibilidad de fármacos que ya se encuentran en el mercado, serían una opción muy prometedora para este grupo de pacientes.

Una de las hipótesis más estudiadas referidas a la refractariedad en la epilepsia es la hipótesis de la sobreexpresión de transportadores de eflujo a nivel de la BHE, que disminuyen o impiden el pasaje de fármacos hacia el parénquima cerebral. En este sentido, una estrategia para evitar la acción de estos transportadores es evitar el contacto de éstos con fármacos que resulten sustratos de los mismos. De esta manera surgen los sistemas nanométricos capaces de “esconder” el fármaco y mejorar el pasaje a través de la BHE.

Se ha desarrollado y probado un gran número de nanosistemas como posibles sistemas de administración de FACs. Entre ellos, los nanovehículos basados en polímeros sintéticos han sido los más estudiados (Darius et al. 2000; Dickens et al. 2013; Fang et al. 2016; Fresta et al. 1996; Liu et al. 2012; Lopalco et al. 2015; Sakthivel & Arunachalam 2017). Con la ventaja de tener un mayor control sobre algunas propiedades del sistema, como el tamaño de partícula, las propiedades de la superficie y la cinética de degradación, la preparación de nanopartículas poliméricas suele ser complicada, y muchas veces es necesario el uso de disolventes tóxico (Ali & Lamprecht 2013). Por otro lado, también se han utilizado biopolímeros como el quitosano (Hamidi et al. 2012; Hsiao et al. 2012) o la albúmina (Wilson et al. 2014) para preparar nanopartículas cargadas con FACs, con el objetivo de lograr una buena biocompatibilidad a través de procedimientos de preparaciones verdes. Sin embargo, estas moléculas de origen natural suelen presentar alta variabilidad lote a lote, y su alta solubilidad en agua conduce a una baja eficiencia de encapsulación de fármacos lipofílicos (Jiang et al. 2013; Vignaroli et al. 2016). Además, dado que son sistemas autoensamblados, su estabilidad tras la dilución en el entorno fisiológico puede verse comprometida (Cardoso et al. 2016), y las técnicas de entrecruzamiento químico pueden afectar el tamaño de partícula final y la cinética de liberación (Langer et al. 2008; Vandelli et al. 2001).

Entre los diferentes grupos de nanovehículos farmacéuticos, las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y vehículos nanoestructurados (NLC) parecen ser especialmente adecuados para la entrega de fármacos al cerebro debido a su habilidad inherente para cruzar la BHE (Graverini et al. 2018; Tapeinos et al. 2017). Poseen prácticamente las mismas ventajas que las nanopartículas poliméricas, pero pueden ser producidos con materiales lipídicos no tóxicos, lo que da como resultado diseños más seguros, estables, biodegradables y biocompatibles (Talevi et al. 2015). A la fecha, y en relación a los FACs, este tipo de nanovehículos se ha ensayado para la encapsulación de diazepam (Abdelbary & Fahmy 2009), valproato (Varshosaz et al. 2010), clonazepam (Leyva-Gómez et al. 2014), carbamazepina (Khan et al. 2020; Nair et al. 2012; Qushawy et al. 2019; Scioli Montoto et al. 2018), oxcarbazepina (Scioli Montoto et al. 2021) y lamotrigina (Alam et al. 2015), no encontrándose referencias de la encapsulación de Fenobarbital en SLN o NLC.

En este trabajo se logró obtener SLN/NLC conteniendo CBZ y PB, con morfología esférica y tamaño medio de 160 nm y 180 nm, respectivamente, con alta eficiencia de encapsulación, bajo índice de polidispersión (PDI) y valores de potencial Z que, junto con el impedimento estérico generado por el tensioactivo en su superficie, resultaron suficientes para mantener a las partículas estables en suspensión. Los sistemas mostraron ser físicamente estables, sin interacciones observables entre el fármaco y los excipientes utilizados en la formulación. Por otro lado, se logró un perfil de liberación sostenido de ambos fármacos a partir de las nanopartículas, y los ensayos *in vivo* en modelos animales de epilepsia aguda (MES y PTZ, para CBZ y PB, respectivamente) mostraron una actividad antiepiléptica similar a la droga libre.

En el caso de CBZ, también se pudo observar una permeabilidad celular mejorada respecto al fármaco libre, y el ensayo de actividad en el modelo MES mostró un

indicios de posibles mejoras, en tanto que la actividad antiepiléptica logro mantenerse por al menos 4 hs.

Por su parte, el desarrollo de las NLP de PB fue realizado mediante la metodología de superficie de respuesta, la cual permitió no sólo optimizar los valores de tamaño, potencial Z y PDI de manera racional, sino también conocer y caracterizar las variables operativas que afectan a este tipo de sistemas.

Creemos que son resultados muy prometedores, que nos alientan a seguir trabajando en la aplicación de nanovehículos lipídicos como opciones terapéuticas para el tratamiento de la epilepsia y la epilepsia refractaria.

Perspectivas a futuro

Actualmente, nos encontramos realizando los estudios de estabilidad de la formulación de PB (cuyos datos a 30 días se presentaron aquí) y el estudio de citotoxicidad en células L929 de los nanosistemas de CBZ y PB.

A continuación, planeamos realizar los estudios de permeabilidad en monocapa celular para el caso de los sistemas conteniendo PB, y los estudios de actividad anticonvulsiva en el modelo animal de epilepsia refractaria desarrollada por nuestro laboratorio.

Asimismo, buscaremos continuar esta línea de trabajo y aplicarla a otros FACs clásicos, por ejemplo, Fenitoína.

4.1 Referencias del capítulo

- Abdelbary G, Fahmy RH. 2009. Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: design and characterization. *AAPS PharmSciTech*. 10(1):211–19
- Alam T, Pandit J, Vohora D, Aqil M, Ali A, Sultana Y. 2015. Optimization of nanostructured lipid carriers of lamotrigine for brain delivery: In vitro characterization and in vivo efficacy in epilepsy. *Expert Opin. Drug Deliv*. 12(2):181–94
- Ali ME, Lamprecht A. 2013. Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. *Int. J. Pharm.* 456(1):135–42
- Cardoso AMLM, Guedes JR, Cardoso AMLM, Morais C, Cunha P, et al. 2016. Recent Trends in Nanotechnology Toward CNS Diseases: Lipid-Based Nanoparticles and Exosomes for Targeted Therapeutic Delivery. In *International Review of Neurobiology*, Vol. 130, pp. 1–40
- Darius J, Meyer FP, Sabel BA, Schroeder U. 2000. Influence of Nanoparticles on the Brain-to-serum Distribution and the Metabolism of Valproic Acid in Mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 52(9):1043–47
- Dickens D, Yusof SR, Abbott NJ, Weksler B, Romero IA, et al. 2013. A Multi-System Approach Assessing the Interaction of Anticonvulsants with P-gp. *PLoS One*. 8(5):
- Epilepsy (Fact sheet N°999). 2016
- Fang Z, Chen S, Qin J, Chen B, Ni G, et al. 2016. Pluronic P85-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles overcome phenytoin resistance in P-glycoprotein overexpressing rats with lithium-pilocarpine-induced chronic temporal lobe epilepsy. *Biomaterials*. 97:110–21

- Fresta M, Cavallaro G, Giammona G, Wehrli E, Puglisi G. 1996. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials*. 17(8):751–58
- Graverini G, Piazzini V, Landucci E, Pantano D, Nardiello P, et al. 2018. Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 161:
- Hamidi M, Azadi A, Mohamadi-Samani S, Rafiei P, Ashrafi H. 2012. Valproate-Loaded hydrogel nanoparticles: Preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci*. 124:4686–93
- Hsiao M-HH, Larsson M, Larsson A, Evenbratt H, Chen Y-YYY-YY, et al. 2012. Design and characterization of a novel amphiphilic chitosan nanocapsule-based thermo-gelling biogel with sustained in vivo release of the hydrophilic anti-epilepsy drug ethosuximide. *J. Control. Release*. 161(3):942–48
- Jiang L, Xu Y, Liu Q, Tang Y, Ge L, et al. 2013. A nontoxic disulfide bond reducing method for lipophilic drug-loaded albumin nanoparticle preparation: Formation dynamics, influencing factors and formation mechanisms investigation. *Int. J. Pharm*. 443(1–2):80–86
- Khan N, Shah FA, Rana I, Ansari MM, Din F ud, et al. 2020. Nanostructured lipid carriers-mediated brain delivery of carbamazepine for improved in vivo anticonvulsant and anxiolytic activity. *Int. J. Pharm*. 577:119033
- Langer K, Anhorn MG, Steinhäuser I, Dreis S, Celebi D, et al. 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *Int. J. Pharm*. 347(1–2):109–17
- Leyva-Gómez G, González-Trujano ME, López-Ruiz E, Couraud P-OO, Wekslerg

- B, et al. 2014. Nanoparticle formulation improves the anticonvulsant effect of clonazepam on the pentylenetetrazole-induced seizures: Behavior and electroencephalogram. *J. Pharm. Sci.* 103(8):2509–19
- Liu Y, Shi XW, Liu EH, Sheng LS, Qi LW, Li P. 2012. More accurate matrix-matched quantification using standard superposition method for herbal medicines. *J. Chromatogr. A.* 1254:
- Lopalco A, Ali H, Denora N, Rytting E. 2015. Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across in vitro models of the blood-brain barrier and human placental trophoblast. *Int. J. Nanomedicine.* 10:1985–96
- Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(10):757–76
- Mula M. 2016. Third generation antiepileptic drug monotherapies in adults with epilepsy. *Expert Rev. Neurother.* 16(9):1087–92
- Nair R, Kumar ACK, Priya VK, Yadav CM, Raju PY. 2012. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. *Lipids Health Dis.* 11(1):72
- Qushawy M, Prabahar K, Abd-Alhaseeb M, Swidan S, Nasr A. 2019. Preparation and evaluation of carbamazepine solid lipid nanoparticle for alleviating seizure activity in pentylenetetrazole-kindled mice. *Molecules.* 24(21):
- Rubio-Donnadieu F. 2013. Pharmacoresistance and epilepsy. In *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*, eds. L Rocha, EA Cavaleiro, pp. 1–9. New York: Springer
- Sakthivel D, Arunachalam G. 2017. Preparation and characterization of polymeric

- nanoparticles used in the treatment of epilepsy. . 9(3):298–301
- Scioli Montoto S, Muraca G, Di Ianni M, Couyoupetrou M, Pesce G, et al. 2021. Preparation, physicochemical and biopharmaceutical characterization of oxcarbazepine-loaded nanostructured lipid carriers as potential antiepileptic devices. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 63:102470
- Scioli Montoto S, Sbaraglini ML, Talevi A, Couyoupetrou M, Di Ianni M, et al. 2018. Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 167:73–81
- Talevi A, Gantner M, Ruiz M. 2015. Applications of Nanosystems to Anticancer Drug Therapy (Part I. Nanogels, Nanospheres, Nanocapsules). *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 9(1):
- Tapeinos C, Battaglini M, Ciofani G. 2017. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases
- Vandelli MA, Rivasi F, Guerra P, Forni F, Arletti R. 2001. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 215(1–2):175–84
- Varshosaz J, Eskandari S, Tabakhian M. 2010. Production and optimization of valproic acid nanostructured lipid carriers by the Taguchi design. *Pharm. Dev. Technol.* 15(1):89–96
- Vignaroli G, Calandro P, Zamperini C, Coniglio F, Iovenitti G, et al. 2016. Improvement of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines pharmacokinetic properties: nanosystem approaches for drug delivery. *Sci. Rep.* 6(1):21509

Wilson B, Lavanya Y, Priyadarshini SRB, Ramasamy M, Jenita JL. 2014.

Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: preparation, characterization and pharmacodynamic studies. *Int. J. Pharm.* 473(1-2):73–

79

World Health Organization. 2019. *WHO / Epilepsy: A Public Health Imperative*

Anexos

Anexo I

Equipamientos

Cromatografía

Las determinaciones de CBZ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron realizadas en un cromatógrafo Gilson, equipado con un sistema de bombeo doble modelo 322.H2, detector UV-VIS modelo 156, interfaz 506C y software de operación UniPoint LC versión 3.3 (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia). Se utilizó un inyector manual Rheodyne, modelo 7725i, con loop fijo de 20 µl (Rheodyne, CA, EE.UU).

Las determinaciones de PB por HPLC fueron realizadas en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000, equipado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000) y detector UV-Vis con arreglo de diodos DAD-3000 con software de operación Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU).

Ensayos de liberación

Los ensayos de liberación fueron realizados en un equipo de disolución Hanson Vision G2 Classic 6, con sistema de muestreo manual y baño con capacidad para 6 vasos.

Sonicador de punta

Las síntesis se realizaron con un procesador ultrasónico Cole-Parmer, modelo 44347 (Cole-Parmer, EE.UU), de 130W. Volumen: rango de 150 µl a 150 ml. Potencia de 50/60 Hz.

Otros equipos

Balanza: Metler Toledo, modelo AG 204 (Metler-Toledo, Greinfensee, Suiza).

Precisión: 0,1 mg. Capacidad máxima: 210 g.

Sonicador: Branson, modelo DTH.2210, equipado con reloj digital y calefacción. Volumen: 2,8 L. Potencia RF: 125W. Potencia calorífica: 109W.

pH-Metro: Altronix, modelo TPX (SAEN SRL, Buenos Aires, Argentina).

Rango de medida: 0,00 – 14,00 de pH. Resolución: 0,01.

Los caracterizaciones fisicoquímicas se realizaron a través de colaboraciones con diferentes institutos y facultades: DSC, TGA, XRD, FTIR (INTEMA; Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales) en colaboración con el grupo de la Dra. Vera Alvarez. Las imágenes obtenidas por las diferentes microscopías se realizaron a través del Sistema Nacional de Microscopía con la colaboración del Dr. Eduardo Prieto.

Anexo II

Producción científica

Trabajos publicados en revistas internacionales relacionados a esta tesis

- [1] Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Front Mol Biosci* 2020;7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>.
- [2] Scioli Montoto S, Sbaraglini ML, Talevi A, Couyoupetrou M, Di Ianni M, Pesce GO, et al. Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018;167:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.052>.
- [3] Scioli Montoto S, Muraca G, Di Ianni M, Couyoupetrou M, Pesce G, Islan GA, et al. Preparation, physicochemical and biopharmaceutical characterization of oxcarbazepine-loaded nanostructured lipid carriers as potential antiepileptic devices. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021;63:102470. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102470>.

Trabajos en colaboración publicados en revistas internacionales relacionados a la temática

- [1] Boztepe T, Scioli-Montoto S, Ruiz ME, Alvarez VA, Castro GR, León IE. 8-Hydroxyquinoline platinum(ii) loaded nanostructured lipid carriers: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of antitumor activity. *New J Chem* 2021;45:821–30. <https://doi.org/10.1039/d0nj03940c>.
- [2] Rodenak-Kladniew B, Scioli Montoto S, Sbaraglini ML, Di Ianni M, Ruiz ME, Talevi A, et al. Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. *Int J Pharm* 2019;569:13. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118575>.
- [3] Cacicedo ML, Ruiz MC, Scioli-Montoto S, Ruiz ME, Fernández MA, Torres-Sanchez RM, et al. Lipid nanoparticles-Metvan: Revealing a novel way to deliver a vanadium compound to bone cancer cells. *New J Chem* 2019;43:17726–34. <https://doi.org/10.1039/c9nj01634a>.
- [4] Morales JF, Scioli Montoto S, Fagiolino P, Ruiz ME. Current State and Future Perspectives in QSAR Models to Predict Blood- Brain Barrier Penetration in Central Nervous System Drug R&D. *Mini Rev Med Chem* 2017;17:247–57. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161013110813>.

Trabajos presentados en Congresos

Relacionados a esta tesis

- [1] **2019** – “Carbamazepine loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of refractory epilepsy”
Scioli Montoto, Sebastián; Islan, German; Ruiz, María Esperanza; Couyoupetrou, Manuel; Sbaraglini, Maria Laura; Muraca, Giuliana; Alvarez, Vera Alejandra; Pesce, Guido Oscar; Talevi, Alan; Castro, Guillermo Raúl
Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- [2] **2019** – “Sistemas nanoparticulados para la entrega de fármacos antiepilépticos para el tratamiento de la epilepsia refractaria”
Scioli Montoto, Sebastián; Islan, German; Ruiz, María Esperanza; Di Ianni, Mauricio; Couyoupetrou, Manuel; Sbaraglini, Maria Laura; Alvarez, Vera Alejandra; Pesce, Guido Oscar; Talevi, Alan; Castro, Guillermo Raúl.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- [3] **2019** – “Sistemas lipídicos nanoparticulados para el mejoramiento del delivery de carbamazepina en el tratamiento de la epilepsia refractaria”
Scioli Montoto, Sebastián; Islan, German; Ruiz, María Esperanza; Sbaraglini, Maria Laura; Talevi, Alan; Pesce, Guido Oscar; Castro, Guillermo Raúl
1er Congreso Nacional de Ciencia Reguladora; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

- [4] **2017** – “Desarrollo, caracterización, cinética de liberación y evaluación de la actividad *in vivo* de nanopartículas sólidas lipídicas conteniendo carbamazepina como posibles nanosistemas para el tratamiento de la epilepsia refractaria”
- Scioli Montoto S, Islan GA, Ruiz ME, Di Ianni M, Couyoupetrou M, Sbaraglini ML, Talevi A, Pesce GO, Bruno Blanch L, Castro GR
- Jornadas Científicas 2017 “Estado actual de la nanotecnología y sus aplicaciones en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas”
- Facultad de Farmacia y Bioquímica – Universidad Nacional de Buenos Aires
- [5] **2015** – “Síntesis, caracterización y cinética liberación *in vitro* de nanopartículas lipídicas conteniendo carbamazepina”
- Scioli Montoto S; Islan G. A.; Ruiz M.E.; Castro G.R.
- VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética.
- Ciudad de Córdoba, Argentina, 4 al 6 de Noviembre de 2015.
- [6] **2015** – “Desarrollo Racional de Sistemas Terapéuticos Nanométricos para el Tratamiento de la Epilepsia Refractaria”
- Sebastián Scioli Montoto; María Esperanza Ruiz; Guillermo R. Castro
- Nanomercosur 2015
- Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, 6 al 8 de Octubre de 2015

- [7] **2016** – “Physicochemical characterization of lipid nanosystems based on natural vegetable derived esters for antiepileptic drug delivery”
S Scioli Montoto, GA Islan, ME Ruiz, M Di Ianni, A Talevi, L Bruno-Blanch, GR Castro
International Conference on Current Trends in Biotechnology
Vellore, Tamil Nadu, India, Diciembre 2016
- [8] **2015** – “Synthesis and characterization of solid lipid nanoparticles for controlled release of Carbamazepine”
Sebastián Scioli Montoto; German Islan; María Esperanza Ruiz; Guillermo R. Castro
New Horizons in Biotechnology (NHBT)
Trivandrum, Kerala, India, 22 al 25 de Noviembre de 2015

Trabajos en colaboración presentados en congresos relacionados a la temática

- [1] **2019** – “Estudio de la liberación de compuestos bioactivos en microemulsiones alimenticias con distintas características microestructurales”
Mori Cortés, Noelia; Scioli Montoto, Sebastián; Ruiz, María Esperanza; Califano, Alicia; Lorenzo, Gabriel
XXI congreso latinoamericano y del caribe de ciencia y tecnología de alimentos & XVII congreso argentino de ciencia y tecnología de alimentos;
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

- [2] **2017** – “Estrategias basadas en micro- y nano-partículas híbridas para aumentar la biodisponibilidad de antibióticos en infecciones pulmonares de difícil erradicación”
German A. Islan; María E. Ruiz; Sebastián Scioli Montoto; Juan F. Morales; María L. Sbaraglini; Alan Talevi; Luis Bruno-Blanch; Nelson Durán; Guillermo R. Castro
Congreso de Investigación Aplicada y Desarrollo en Nanotecnología, en el marco del 6^o Nanomercosur.
- [3] **2017** – “Estrategias basadas en micro y nano partículas híbridas para aumentar la biodisponibilidad de antibióticos en infecciones pulmonares de difícil erradicación”
German A. Islan; María E. Ruiz; Sebastián Scioli Montoto; Juan F. Morales; María L. Sbaraglini; Alan Talevi; Luis Bruno-Blanch; Nelson Durán; Guillermo R. Castro
Jornadas Científicas 2017 “Estado actual de la nanotecnología y sus aplicaciones en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas”
Facultad de Farmacia y Bioquímica – Universidad Nacional de Buenos Aires
- [4] **2018** – “Lipid nanoparticles – Metvan: reveling a novel way to deliver a vanadium compound to cancer cells”
Cacicedo, M.L.; Scioli-Montoto, S.; Ruiz, M.E.; Fernandez, M.A.; Torres-Sanchez, R.M.; Baran, E.J.; Castro, G.R.; Leon, I.E.
11th International Vanadium Symposium, Montevideo, Uruguay.

Premios y becas para presentación de trabajo

- [1] Premio de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al mejor trabajo de investigación a “Estrategias basadas en micro- y nano-partículas híbridas para aumentar la biodisponibilidad de antibióticos en infecciones pulmonares de difícil erradicación”
German A. Islan; María E. Ruiz; Sebastián Scioli Montoto; Juan F. Morales; María L. Sbaraglini; Alan Talevi; Luis Bruno-Blanch; Nelson Durán; Guillermo R. Castro.
Agosto de 2017 – CABA
- [2] Mención especial en el Congreso de Investigación Aplicada y Desarrollo en Nanotecnología, en el marco del 6º Nanomercosur por el trabajo “Plataforma basadas en micro-y nano-partículas híbridas para aumentar la biodisponibilidad de antibióticos en infecciones pulmonares causadas por biofilms bacterianos”
German A. Islan; María E. Ruiz; Sebastián Scioli Montoto; Juan F. Morales; María L. Sbaraglini; Alan Talevi; Luis Bruno-Blanch; Nelson Durán; Guillermo R. Castro.
Septiembre de 2017
- [3] “Rational Development of Nanometric Therapeutic Systems for the Refractory Epilepsy Treatment”. Proyecto seleccionado para participar en BIOVISION – The World Life Sciences Forum dentro del programa BIOVISION.Next – TWAS. Beca de viaje otorgada por la Fundación de la Universidad de Lyon (Fondation pour l’Université de Lyon).
Lyon, Francia, 13 al 14 de Abril de 2016

Cursos realizados durante el período

- [1] Curso de Postgrado: “Introducción al Análisis Estadístico Robusto con R”
Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado
Descripción: 75 hs cátedra, teórico-práctico
Dictado por: Dr. Luis Acuña Rello – Dra. Eleana Spavento
Lugar: Facultad Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP
- [2] Curso de Postgrado: “Técnicas de Análisis y Caracterización de Polímeros/Biopolímeros, Nanocompuestos y Materiales Derivados”
Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado
Descripción: 30 hs cátedra, teórico-práctico, con evaluación final aprobada
Dictado por: Dr. Juan Manuel Lázaro Martínez - Dr. Guillermo Copello - Dra. Romina Glisoni - Dr. Sergio Giorgieri - Dra. Viviana Campodall’Orto - Dr. Daniel Vega - Dra. Lidia Piehl
Lugar: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires.
- [3] Curso de Postgrado: “Fundamentos Epistemológicos e Históricos de la Enseñanza de las Ciencias”
Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado
Descripción: 45 hs. cátedra, teórico-práctico, con evaluación final aprobada
Dictado por: Dr. Diego Petrucci - Dr. Osvaldo M. Cappannini - Lic. Daniel O. Badagnani
Lugar: Facultad de Ciencias Exactas - UNLP
- [4] Curso de Postgrado: “Diseño y Ejecución de Ensayos Biológicos Aplicados a la Biomedicina”

Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado

Descripción: 45 hs. cátedra, teórico-práctico, con evaluación final aprobada

Dictado por: Dr. Hugo Ortega

Lugar: Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet)– Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral (UNL)

- [5] Curso de Postgrado: “Descubrimiento de Fármacos Asistido por Computadora”

Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado

Descripción: 45 hs. cátedra, teórico-práctico, con evaluación final aprobada

Dictado por: Dr. Prof. Alan Talevi – Dra. Luciana Gavernet

Lugar: Facultad de Ciencias Exactas - UNLP

- [6] Curso de Posgrado: “Desarrollo de Métodos de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Estrategias de optimización”

Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado

Descripción: 50 hs. cátedra, teórico-práctico, con evaluación final aprobada

Dictado por: Dra. Prof. Cecilia Castells – Dr. Mario Reta

Lugar: Facultad de Ciencias Exactas - UNLP

- [7] Curso de Posgrado: “Fundamentos y aplicaciones de las microscopías de efecto túnel (STM) y de fuerzas atómicas (AFM)”

Carácter del curso: Acreditado para la carrera de doctorado

Descripción: 15 hs. cátedra, teórico-práctico, con evaluación final

Dictado por: Dra. María Elena Vela

Lugar: Instituto Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) – UNLP – CONICET

Anexo III

La Plata, 5 de Julio de 2016

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled **“Rational development of therapeutic nanosystems for the treatment of refractory epilepsy”** and submitted by Luis Bruno-Blanch (Alan Talevi as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

The above project is approved, effective on the above date.

Protocol Number 018-06-15

Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por Luis Bruno-Blanch (Alan Talevi como responsable alterno), titulado **“Desarrollo racional de sistemas terapéuticos nanométricos para el tratamiento de la epilepsia refractaria”**. Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

Número de Protocolo: 018-06-15

Fernando Chudo

PABLO F. PÉREZ

ALAN TALEVI

Fernando Chudo

N. LAUSADO

NATALIA LAUSADO

PROTOCOLO 018-06-15

“Desarrollo racional de sistemas terapéuticos nanométricos para el tratamiento de la epilepsia refractaria”

Responsable: Luis Bruno-Blanch

Responsables Alternos: Alan Talevi

Válido hasta 22 de Junio de 2019