



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE  
NANOVEHÍCULOS FARMACÉUTICOS PARA  
APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

---

**Tesista: Lic. Giuliana S. Muraca**

**Directores: Prof. Dr. Alan Talevi, Dr. Guido Pesce**

**Co-director: Dr. Germán Islan**

**Año: 2024**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA  
DE NANOVEHÍCULOS FARMACÉUTICOS  
PARA APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO  
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS***

---

**TESISTA:** *LIC. GIULIANA S. MURACA*

**DIRECTORES:** *PROF. DR. ALAN TALEVI, DR. GUIDO  
PESCE*

**CO-DIRECTOR:** *DR. GERMÁN ISLÁN*

**AÑO:** 2024



***A mis padres,***  
*por su esfuerzo y amor*



*“En el escenario de la maravillosa pero también dolorosa dialéctica de la vida, la ciencia se abre camino entre los fuegos cruzados de intereses contrapuestos. Por un lado, los de aquellos poderosos que buscan constreñirla y vaciarla de toda objetividad penetrante, y por el otro, las fuerzas colectivas, forjadas alrededor de las necesidades estratégicas de los pueblos, que anhelan una ciencia responsable, buscando un conocimiento independiente, holístico, profundo, veraz y liberador que acompañe sus luchas por la vida en equidad y por la salud.”*

Jaime Breilh en “La pandemia y el derecho a una ciencia veraz, humilde y emancipadora”. Prólogo de “Ciencias y pandemia. Una epistemología para los derechos humanos” EDULP 2022.

# Agradecimientos

A mis directores, el **Dr. Alan Talevi** y el **Dr. Guido Pesce**, por la paciencia, la confianza, los consejos y las oportunidades. Gracias por permitirme iniciar mi camino en sus laboratorios, y por sus palabras.

A mi co-director, el **Dr. Germán Islan**, por la buena predisposición, la confianza y el ánimo. Gracias por enseñarme el valor de apoyarnos unos a los otros.

A la **Dra. Esperanza Ruiz** y al **Dr. Sebastián Scioli-Montoto** por su gran ayuda con los experimentos. Aprendí mucho de ustedes, en especial sobre el valor del trabajo bien hecho y la dedicación.

A **Vero, Yani, Manu, Caro, Alina, Gallo, Laura y Paula**, por recibirme en el INAME. Gracias por los momentos compartidos, los chistes en los almuerzos y en el cuarto de cultivo celular, por el ánimo, por enseñarme con cariño e incluirme en sus reuniones.

Al **Bioq. y Farm. Leandro Lepera** del ANMAT, al **Lic. Agustín Martilotta** y a la **Lic. Cecilia Vázquez** por su acompañamiento, buena predisposición ante cualquiera de mis dudas y sus buenos deseos en cada paso de este camino.

A la **Dra. Yamil Chain** y **Sebastián Cisneros**, por la buena predisposición y las medidas del DLS. Al grupo de la **Dra. Vera Alvarez**, por su colaboración con las caracterizaciones fisicoquímicas. Al **Dr. Cristián Huck-Iriart** y al **Dr. Diego Lamas**, por su ayuda con las mediciones cristalográficas. A la **Dra. Catalina Soto**, por poner a disposición su laboratorio para los ensayos *in vitro* e *in vivo*. A la **Dra. Jessica Minaard**, por su buena onda, su gran asistencia y *expertise* con los experimentos de permeabilidad celular, por sus consejos y buenos deseos. A la **Dra. Sbaraglini** por su gran ayuda, por acompañarme en los experimentos *in vitro* en parásitos, por su calidez y consejos, por su apoyo, por escucharme y estar ahí siempre que la necesité.

A **Espe, Juli, Pachi y Seba** por recibirme en Control de Calidad y ayudarme a dar mis primeros pasos en un nuevo laboratorio. Por los lindos momentos compartidos, las risas

en los almuerzos, las charlas de libros con Juli y los viajes en tren con Pachi. Los extraño. Gracias por sus consejos y por compartir sus vivencias conmigo.

A mis compañeros del LIDeB, **Maxi, Tefi, Lu, Caro, Luqui, Nachito, Chaqui, Denis, Santi, Meli, Emi, Fede, Mauri, Juani, Sofi, Virgi**, por compartir tantos lindos momentos. Gracias a todos por los juegos, su apoyo y amistad. En especial, al cuartito de los piolas por convertirse en un gran sostén durante este último tiempo.

A mis compañeros del CINDEFI, **Nacho, Manu, Sergio, Vero, Fede y Flor**, por sus manos amigas, por compartir un mate, una charla de desahogo y los trucos de la mesada. A mis amigos del L4 por seguir siendo una compañía de oro, por quererme y preocuparse por mí.

A **Belu y Mati** del IMPaM por su gran ayuda con los cultivos celulares y los ensayos en animales. Muchas gracias por su buena onda, super predisposición, paciencia, y por compartir las charlas en el flujo laminar.

A mis compañeros de las cátedras de Biofarmacia y Elementos de Farmacología, **Tuty, Pedro, Seba, Juli, Ivana, Alan, Maru, Del, Juli, Juani, Gisela, Betiana, Paula y Rocío** por su inmensa ayuda, por bancarme, por el ánimo y los buenos deseos. Formar parte de la cátedra me enseñó muchísimo de un área que descubrí me encanta. Muchísimas gracias por la oportunidad y por todo lo que aprendo junto a ustedes. Muchas gracias a todos **nuestros alumnos** que, con sus preguntas y buena onda, me enseñaron a abrir un poco más la cabeza.

A **Ceci y Mari**, mis grandes amigas, por bancarme en todas, por cocinarme, por sus palabras sinceras desde el cariño, por permitirme desahogar, hacerme reír, abrazarme y sostenerme. Por enseñarme a ser más positiva, y a resistir frente a la adversidad. Las quiero con todo mi corazón.

A **Leo, Dani, Tuğçe, Juli, Flor, Cande, Ine, Cele, Viky, Didi, Gabi, Moni, Mari, Caro, Lu, Silvi y Pedrito** por su valiosísima amistad, por toda la ayuda que me brindan hace años, por la terapia, por los viernes de *viescribir* la tesis, por prestarme tantísimos libros, por darme todo su apoyo, escucharme, acompañarme, por bancarse que los

aburra contándoles cosas de la tesis, por aconsejarme, hacerme reír hasta las lágrimas, por el fútbol, los abrazos, por caminar juntas, compartir tantas alegrías y por su buena energía que siempre me renueva. Los quiero muchísimo. En especial a Gabi por su arte, y complicidad. Polis siktir.

A mis pupis, **Ennio** y **Tom**, por su valiosísima compañía y amor incondicional.

A mi **hermana**, mi **mamá** y mi **papá**, por su infinita paciencia y amor, por sostenerme en mis peores momentos y enseñarme a ser mejor persona, por su fuerza, por creer en mí, por ser mi ejemplo, por su inagotable esfuerzo, por darme todo. Los amo con todo mi corazón. Ma, te extraño siempre.

A la **UNQ**, mi segunda casa, a todos los profesores y compañeres que la conforman, por haberme formado académica y personalmente. A la **Dra. Brelles-Mariño** y a la **Dra. Soler-Arango** por haberme formado en mis primeros pasos.

A la **Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET** y **ANMAT** por los medios para realizar esta tesis y por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los **jurados** de esta tesis por su dedicación y compromiso en leerla atentamente, por sus aportes a nuestro trabajo.

Al **pueblo argentino**, habitantes de la patria que amo profundamente, por financiar la educación pública y por darme todo, mi familia, mis amigos y mi identidad.

**Muchas gracias a todes.**

# Acrónimos

**%IC** Grado de cristalinidad

---

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

---

**AUC** Área bajo la curva

---

**BNZ** benznidazol, N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida

---

**Caco-2** Línea celular inmortal de adenocarcinoma colorrectal humano (*Caucasian colon adenocarcinoma cell line*)

---

**CHO** Línea celular de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovarian cell line*)

---

**dpi** Días post-infección

---

**DLS** Dispersión dinámica de la luz (*Dynamic light scattering*)

---

**DMEM** Medio Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's modified eagle's medium*)

---

**DMSO** Dimetil sulfóxido

---

<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential scanning calorimetry</i> )
<hr/>	
<b>EE, %</b>	Eficiencia de encapsulación
<hr/>	
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ( <i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i> )
<hr/>	
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<hr/>	
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<hr/>	
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<hr/>	
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<hr/>	
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ( <i>Liquid Chromatography- Mass Spectrometry</i> )
<hr/>	
<b>MM</b>	Miristil miristato ( <i>Myristyl myristate</i> )
<hr/>	
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<hr/>	

**NLC** Nanovehículos lipídicos nanoestructurados (*Nanostructured Lipid Carriers*)

---

**OMS** Organización Mundial de la Salud

---

**OPS** Organización Panamericana de la Salud

---

**P188** Poloxámero P188, también Kolliphor® P188, o Pluronic® F68

---

**PBS** Buffer fosfato salino (*Phosphate-buffer saline*)

---

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

---

**PdI** Índice de polidispersión (*Polydispersity index*)

---

**P-gp** Glicoproteína P

---

**p.o.** Vía de administración oral (del Latín *per os*, por la boca)

---

**RPMI-164** Medio de cultivo 1640 obtenido en el Instituto Roswell Park Memorial (*Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium*)

---

**SLN** Nanopartículas sólidas lipídicas (*Solid Lipid Nanoparticles*)

---

**TEM** Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*)

---

**TGA** Análisis termogravimétrico (*Thermogravimetric analysis*)

---

**TDR** *Tropical Disease Research*

---

**XRD** Difracción de rayos X (*X-ray diffraction*)

---

**Pot Z o  $\zeta$**  Potencial Zeta

---

**Vero** Células epiteliales de riñón de mono del género *Chlorocebus sp.*, del esperanto  
“*verda reno*=riñón verde”

# Índice

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<i>Introducción.....</i>	2
<b>Enfermedad de Chagas.....</b>	<b>2</b>
1. Breve reseña histórica.....	2
2. Epidemiología.....	6
3. Vías de transmisión.....	7
4. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
5. Fases clínicas de la enfermedad de Chagas.....	12
6. Diagnóstico y farmacoterapia.....	15
7. Avances hacia nuevos medicamentos.....	19
<b>Nanovehículos farmacéuticos .....</b>	<b>25</b>
1. Mundo nano .....	25
2. Nanovehículos farmacéuticos.....	26
3. Nanopartículas lipídicas.....	28
4. Nanopartículas poliméricas.....	33
5. Nanovehículos farmacéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	34
<b>Referencias.....</b>	<b>37</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>46</b>
<i>Objetivo general.....</i>	47
<i>Objetivos específicos.....</i>	47
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>49</b>
<i>Especificaciones referentes a los materiales y metodologías empleadas en los experimentos.....</i>	49
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>49</b>
1. Materiales.....	49
2. Formulación de NLC-BNZ y EU-BNZ.....	49
3. Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	50
4. Determinación de tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión.....	51
5. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	51
6. Análisis termogravimétrico (TGA).....	51
7. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier/ Reflectancia total atenuada (ATR/FTIR).....	52
8. Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	52
9. Análisis estructural de rayos X (SAXS/WAXS).....	52
10. Ensayo de liberación de BNZ <i>in vitro</i> .....	53
11. Estudio de estabilidad fisicoquímica.....	54
12. Ensayo de toxicidad celular.....	55

13. Determinación del efecto hemolítico.....	56
14. Obtención de los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> .....	57
15. Efecto sobre los tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	57
16. Efecto sobre los amastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	58
17. Ensayo de permeabilidad a través de una monocapa celular.....	59
18. Evaluación farmacocinética de la formulación.....	60
19. Evaluación de la formulación en un modelo agudo <i>in vivo</i> .....	61
20. Determinación de BNZ por HPLC-UV.....	62
21. Determinación de BNZ por LC-MS/MS.....	63
22. Validación del método de cuantificación de BNZ.....	63
23. Análisis estadístico.....	64
<b>Referencias.....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>67</b>
<i>Desarrollo, caracterización y evaluación de un sistema lipídico cargado con benznidazol.....</i>	<i>67</i>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>67</b>
1. Validación de los métodos de cuantificación del BNZ.....	67
2. Formulación y caracterización fisicoquímica de NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO.....	68
3. Ensayos de liberación y estabilidad fisicoquímica.....	76
4. Citotoxicidad y actividad hemolítica.....	82
5. Actividad tripanocida <i>in vitro</i> .....	88
6. Ensayo de permeabilidad.....	97
7. Evaluación farmacocinética de la formulación.....	100
8. Evaluación en un modelo murino de infección aguda.....	104
<b>Conclusiones parciales.....</b>	<b>108</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>110</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>118</b>
<i>Desarrollo, caracterización y evaluación de un sistema polimérico cargado con benznidazol.....</i>	<i>118</i>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>118</b>
1. Formulación y caracterización fisicoquímica de EU-BNZ y EU-VEHÍCULO.....	118
2. Ensayos de liberación y estabilidad fisicoquímica.....	126
3. Citotoxicidad y actividad hemolítica.....	130
4. Actividad tripanocida <i>in vitro</i> .....	135
5. Evaluación de la permeabilidad.....	140
6. Evaluación farmacocinética de la formulación.....	142
7. Evaluación en un modelo murino de infección aguda.....	144
<b>Conclusiones parciales.....</b>	<b>150</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>152</b>
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>157</b>

<i>Discusión y conclusión general. Perspectivas</i> .....	157
<b>Referencias</b> .....	<b>165</b>
<b>Producción científica</b> .....	<b>167</b>
<b>Material suplementario</b> .....	<b>170</b>
<b>Anexo I</b> .....	<b>182</b>



CAPÍTULO 1  
***INTRODUCCIÓN***

# Capítulo 1

## *Introducción*

### **Enfermedad de Chagas**

#### 1. Breve reseña histórica

La enfermedad de Chagas ha afectado a nuestro continente desde épocas milenarias, como lo demuestra el estudio de asentamientos de comunidades precolombinas del sur de Perú (Ilo) y norte de Chile (Antofagasta). Allí, en yacimientos arqueológicos de las comunidades de los primeros habitantes de la zona, los chinchorros, se encontró material genético del agente etiológico de la enfermedad de Chagas gracias al análisis de tejidos conservados de momias que datan de 7050 a. C. (1). Los paleoparasitólogos postularon la hipótesis que con anterioridad a la llegada de los chinchorros a la región andina otros mamíferos eran reservorio del agente etiológico, y que el ciclo se estableció previamente a la llegada de los habitantes humanos, extendiéndose luego a las comunidades humanas cuando estas se introdujeron en ese ecosistema.

Avanzando hacia el siglo XX, en 1909 se realizó la primera descripción formal de la patología en el marco de una investigación académica llevada a cabo por Carlos Chagas, el investigador en honor a cuyo esfuerzo se nombró la enfermedad.

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934) nació en el pequeño pueblo de Oliveira, Minas Gerais, Brasil, en el seno de una familia que manejaba una modesta plantación de café. En esos momentos, Brasil era un país de unos 10 millones de habitantes en pleno crecimiento gracias al desarrollo del comercio en ciudades portuarias como Río de Janeiro. Estos incipientes puertos eran los lugares ideales de aglomeración donde abundaban enfermedades infecciosas como la fiebre amarilla, la viruela y la enfermedad producida por la bacteria *Yersinia pestis*, comúnmente conocida como la peste bubónica. La madre de Chagas quiso que él estudiara Ingeniería en Minería, proyectando un fructífero futuro laboral, pero fueron dos de sus tíos quienes lo llevaron hacia la Medicina alegando la necesidad del país de atacar el problema de las enfermedades infecciosas que obstaculizaban el progreso, excluyendo a los puertos de Brasil de alianzas con países europeos. En 1903, finalizando sus estudios académicos, Chagas eligió abordar los aspectos hematológicos de la malaria para su trabajo de maestría en la

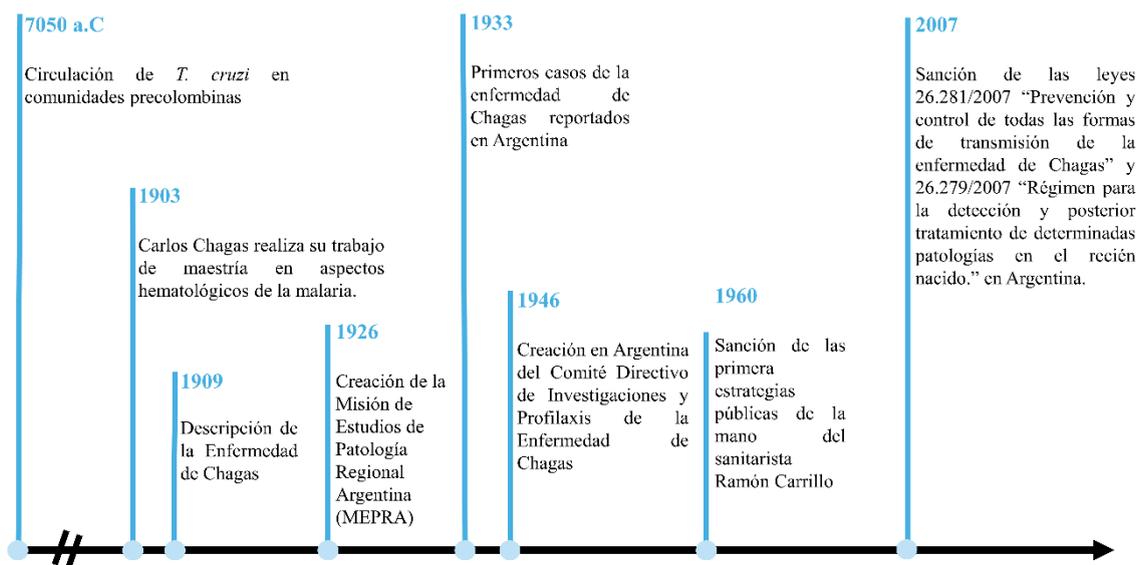
Facultad de Medicina de Río de Janeiro. Este entrenamiento fue decisivo para los aportes que luego haría en la descripción de una nueva enfermedad. Durante esos años conoció a Oswaldo Cruz quien trabajaba en la erradicación del mosquito vector de la fiebre amarilla y un proyecto de vacunación masiva contra la viruela en Manguinhos. Trabajando junto a Cruz, Chagas inició una campaña preventiva contra la malaria en Mina Gerais en beneficio de los trabajadores ferroviarios de lo que muchos años más tarde sería la *Rede Ferroviária Federal S.A. (RFFSA)*. En ese contexto, Cruz comenzó a profundizar el saber de la época realizando una red en salud que entretejería a la medicina asistencial con la investigación y educación, cambiando la concepción de la salud del Brasil de aquel entonces (2). Allí, en su base operativa en Lassance, Chagas observó por primera vez cierto insecto recurrente en los habitáculos de los trabajadores. A partir del contenido del intestino de esos insectos logró aislar un protozooario del género *Trypanosoma* que designó *Trypanosoma cruzi* en honor a su mentor. Seguidamente, en 1909, Chagas publicó una serie de trabajos de investigación, el primero de ellos titulado “*Über eine neue trypanosomiasis des menschen*”<sup>1</sup> (3) en el *Archiv für Schiffs und Tropen-Hygiene*, donde describió el desarrollo de la enfermedad a partir de la infección de animales por el parásito. En el transcurso de dos años Chagas caracterizó los signos clínicos, patología, la biología del insecto vector y los modos de transmisión, es decir, el ciclo completo de la enfermedad. Pese a haber conseguido visibilidad en la comunidad científica internacional, y haber sido candidato dos veces al premio Nobel, no obstante, su aporte científico fue puesto en duda por razones políticas: la dilucidación de la enfermedad representaba para los políticos brasileiros un problema en torno a la situación socioeconómica de los afectados (4). Sus últimos años se desempeñó en la cátedra de Medicina Tropical, manteniendo su interés en el estudio de las infecciones tropicales (5, 6).

En Argentina, la voz de Chagas se hizo eco llegando a miembros del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene, quienes se interesaron en la enfermedad ya que podían ver reflejadas en nuestro país condiciones propiciatorias de vivienda y clima similares a las del país vecino. Fue así como encomendaron la tarea a distintas misiones a recorrer provincias en búsqueda de evidencia autóctona de la enfermedad. Estas campañas no fueron muy fructíferas, y tendrían que pasar 10 años más para que el interés resurgiera. En 1926, la Universidad de Buenos Aires,

---

<sup>1</sup> “Sobre una nueva tripanosomiasis humana”, Carlos Chagas en “Archivos de Higiene Marítima y Tropical (1909).”

influenciada por la investigación de Charles Nicolle (médico y microbiólogo francés experto en enfermedades infecciosas) sobre la detección del agente etiológico en la sangre, creó la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA). Salvador Mazza, médico y bacteriólogo quien trabajara junto a Nicolle, fue director de la MEPRA al momento de identificarse los primeros casos de la enfermedad en 1933. En el año 1946, con la asunción del presidente Juan Domingo Perón y la designación del sanitarista Ramón Carrillo como ministro de salud, se comenzó a considerar a la enfermedad de Chagas como un problema nacional y se creó el Comité Directivo de Investigaciones y Profilaxis de la Enfermedad de Chagas, la primera organización a cargo de la problemática. Hacia 1960 se comenzaron a sancionar las primeras estrategias públicas para el control de la enfermedad en países de América Latina (7) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Línea temporal con algunos hechos e hitos en la historia de la enfermedad de Chagas.

En nuestro país, entre el período de tiempo desde la descripción de la enfermedad en el año 1920 hasta el año 2007 cuando se sancionaron la ley N° 26.281/2007 "Prevención y control de todas las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas" y la ley N° 26.279/2007 "Régimen para la detección y posterior tratamiento de determinadas patologías en el recién nacido." pasaron 87 años de olvido. Además, tuvieron que pasar 15 años más para que la ley sea reglamentada, lo que sucedió a principios del año 2022

a través del decreto 202/2022. Nuestro país ha dejado en el olvido a sus pacientes, y globalmente ha sido una enfermedad poco conocida hasta hace algunos años. Para visibilizar la problemática e incluirla en la agenda mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció hacia el año 2005 (8) la categoría de “enfermedades tropicales desatendidas” en la cual incluyó a la enfermedad de Chagas junto al dengue, la leishmaniasis y la lepra, entre otras enfermedades, que afectan en su mayoría a los sectores más empobrecidos de los pueblos, ya sea por las condiciones de vivienda, acceso a los servicios de salud o localización geográfica (9).

En las últimas décadas, países endémicos y no endémicos han mostrado interés en la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos y herramientas diagnósticas para la enfermedad de Chagas, ya que el número de pacientes ha ido incrementándose en esos países debido principalmente a las corrientes migratorias (10). Estados Unidos y España reportaron el mayor número de pacientes como países desarrollados en sus respectivos continentes cuyas cifras se incrementaron en los últimos años. Estados Unidos con 238.091 pacientes en el año 2012 (10) y un estimado de 300.000 según los últimos cálculos realizados en el año 2022 (11); en el caso de España solo se encontró el dato con estimaciones del año 2010 con un rango de pacientes entre 48.000 y 86.000 (12). El aumento del número de pacientes en países desarrollados llevó a una creciente inversión desde el sector industrial en la quimioterapia contra el Chagas. Compañías como Eisai, Co. Ltd. y Astellas Pharma Inc. en Japón, y Novartis en Suiza han invertido tanto en programas educativos como en investigación y desarrollo (13). En Argentina, históricamente la inversión ha sido dirigida principalmente a la erradicación del vector y el desarrollo de serologías diagnósticas (14), aunque actualmente la inversión se centra en la investigación básica y el desarrollo/reposicionamiento de fármacos (15).

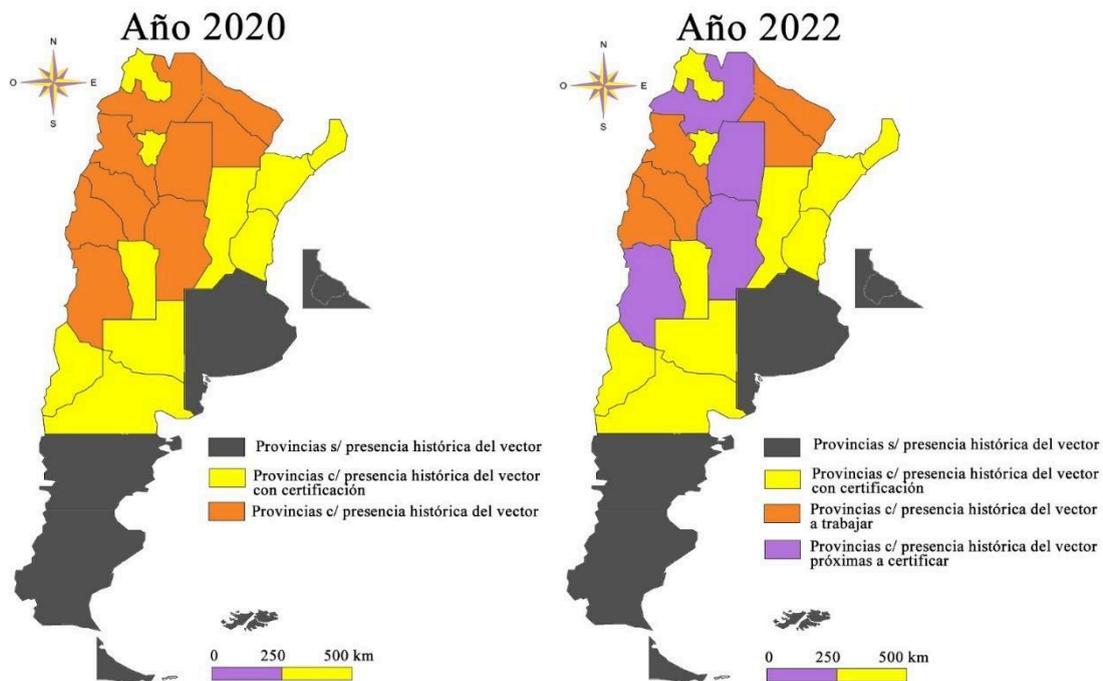
En relación con el tratamiento de la enfermedad, el fármaco de primera línea (el benznidazol, BNZ), desarrollado en 1970 por Roche, dejó de ser comercializado por la compañía hacia el año 2011; Roche transfirió entonces la tecnología a Lafepe, una compañía farmacéutica brasilera. Hubo que esperar poco tiempo para que la farmacéutica argentina Elea (con el apoyo de la fundación “Mundo Sano”) adoptara la tecnología para producir formulaciones de BNZ a nivel local, recibiendo la autorización para su comercialización de la autoridad regulatoria argentina (ANMAT) rápidamente en 2012. Desafortunadamente, se carece de información de biodisponibilidad vinculada este medicamento (16).

## 2. Epidemiología

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* perteneciente a la clase *Kinetoplastea*, orden *Trypanosomatidae*. Según cifras publicadas este año por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que 6-7 millones de personas en el mundo, la mayoría habitantes de América latina, están infectados con el parásito, las tasas de infección y de muerte son 30.000 y 12.000 anuales respectivamente; unos 70,2 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio (17), y 8.600 recién nacidos se infectan anualmente durante la gestación (18).

Existen varias vías de transmisión de *T. cruzi*, una de las cuales implica la transmisión por vectores invertebrados hemípteros de la familia *Reduviidae*, mayormente el grupo de la subfamilia *Triatominae*. La infección por *T. cruzi* es endémica en las zonas donde existe el vector, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y Argentina. El área del Gran Chaco en nuestro país es hiperendémica, mientras que otras zonas como el norte de Santa Fe, Corrientes, Córdoba y Misiones también presentan elevado riesgo de contagio y presencia del vector. 10 de las 19 provincias con registro histórico del vector lograron la certificación de la interrupción de la transmisión vectorial. Durante el 2022, 4 de las 9 provincias restantes se perfilaron como las próximas a obtener la certificación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) de la interrupción de la transmisión vectorial, certificación basada en datos epidemiológicos del vector y serológicos de la población (19) (**Figura 1.2**).

En Argentina, las cifras muestran que 1,6 millones de personas están infectadas, 7 millones están en riesgo de infectarse, y 1.500 bebés nacen infectados cada año (20). La mayor cantidad de casos se encuentran en zonas rurales donde el vector halla condiciones propicias para su reproducción, y un número muy importante de casos se localizan en las grandes ciudades, debido a las migraciones.



**Figura 1.2.** Provincias argentinas mayormente afectadas por la presencia del vector.

Fuente: Boletín epidemiológico 2022 (19).

**Provincias con presencia histórica de *T. infestans*:** Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán.

**Provincias que han logrado la certificación por la OPS de la interrupción de la transmisión vectorial del Chagas:** Tucumán, Santa Fe, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, San Luis, La Pampa, Neuquén y Río Negro.

**Provincias sin presencia autóctona histórica de *T. infestans* son aquellas en las que no se ha identificado la presencia de colonias autóctonas del vector:** Buenos Aires, Chubut, Tierra del Fuego, Santa Cruz.

**Provincias con presencia histórica de *T. infestans* priorizadas, tanto nacional como provincialmente, para consolidar departamentos y llegar a indicadores compatibles con la certificación por la OPS de la interrupción de la transmisión vectorial del Chagas:** Córdoba, Mendoza, Salta y Santiago del Estero.

### 3. Vías de transmisión

La principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas es vectorial, y representa un 80% de los casos. En Argentina, Bolivia, Brasil, Chile,

Paraguay, Uruguay y Perú la especie predominante del insecto vector es *Triatoma infestans*; en Colombia, Venezuela y Centroamérica, *Rhodnius prolixus*; en Ecuador, *Triatoma dimidiata* y en Panamá, *Rhodnius pallescens* (18). Estos insectos presentan poca actividad durante el día y se alimentan por la noche. La transmisión a través del vector opera mediante la alimentación de la sangre de un mamífero y posterior defecación, también conocida como transmisión estercorariana. En las heces del insecto se encuentran los parásitos, los cuales son depositados próximos a la herida dejada por el insecto al alimentarse; la picadura genera picazón y al rascarse se introduce el parásito a la circulación sanguínea del mamífero.

En países no endémicos, la transmisión puede ocurrir mayoritariamente por transfusiones de sangre o trasplantes de órganos. Estados Unidos, España, Suiza y, más recientemente, Japón han reportado casos de este tipo de transmisión. En Estados Unidos a partir de enero del 2007, luego de la aprobación de la FDA (**FDA**, *Food and Drug Administration*) de una prueba serológica certificada, comenzaron a realizarse exámenes cubriendo el 75-90% de todas las donaciones de sangre en busca del parásito. En Europa las pruebas comenzaron en 1999 en Reino Unido, seguidos por España en 2005 y Suiza en el 2012. En Japón, hasta el 2022 no se incorporó de rutina la prueba contra *T. cruzi* en el esquema de testeo de la Cruz Roja, aunque sí se realiza un cuestionario para evaluar el riesgo de contagio de los donantes (4). En estos países la presencia de la enfermedad está correlacionada con la inmigración de población latinoamericana.

De igual manera, el trasplante de órganos se ha establecido como una vía de transmisión similar a la transfusión sanguínea en países no endémicos. En Estados Unidos, el testeo en órganos fue implementado un año más tarde que el de sangre. En el 2008 se testearon 993 donantes de los cuales 6 resultaron positivos a las pruebas serológicas, representando un estimado de 17 órganos descartados para el trasplante (21).

La transmisión congénita o vertical es también una vía de contagio relevante. La Sociedad Argentina de Pediatría informó que el contagio por la vía transplacentaria ha crecido (22), y que muchos casos no se detectan ya sea porque los bebés no presentan síntomas o presentan síntomas inespecíficos que se desestiman, como remarcó el Dr. Jaime Altcheh, médico pediatra e investigador principal del CONICET especialista en la enfermedad, “Lamentablemente, un adulto enfermo es un niño que no se detectó” (22). Se estima que en países endémicos la transmisión ocurre en un 5% de los embarazos (23). La fundación “Mundo Sano” generó una campaña publicitaria

denominada “Ningún bebé con Chagas para el 2030” a fin de visibilizar la problemática (24). Cabe reiterar que desde el año 2007, en Argentina, se encuentra promulgada la ley de pesquisa neonatal 26.279 que impone la realización de pruebas de detección de agentes infecciosos para distintas patologías, entre ellas la enfermedad de Chagas, en recién nacidos. Dentro del alcance de la ley 26.281/07 llamada “Prevención y control de todas las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas”, los controles también se realizan en personas gestantes, idealmente en su primer control pre-natal, registrándose los resultados a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud SNVS2.0 (19,25). Otras vías de transmisión menos frecuentes son los accidentes en laboratorios de investigación o la ingesta de alimentos contaminados como sucedió en el 2006 en Pará, una zona endémica de Brasil en la que 178 personas se contagiaron por consumir fruta açáí contaminada (26).

#### 4. *Trypanosoma cruzi*

Como se ha mencionado anteriormente, *T. cruzi* es un microorganismo eucariota del reino protista. Es un protozoo unicelular flagelado, perteneciente a la clase *Kinetoplastea*, orden *Trypanosomatidae* a la cual también pertenecen los microorganismos *Trypanosoma brucei* y *Leishmania spp.* causantes de la tripanosomiasis africana y de la leishmaniasis, respectivamente. El orden *Kinetoplastida* se diferencia de otros grupos de protozoarios por poseer un kinetoplasto, una región especializada de la mitocondria que contiene “kADN”, material genético localizado cerca de la base del flagelo (27). El kADN representa 30% del ADN total y consiste en miles de moléculas circulares de dos tamaños: minicírculos de 0,5 a 10 kb, y maxicírculos de 20 a 40 kb concatenados entre sí (28). La función de este ADN es codificar a los genes que traducidos dan lugar a las proteínas de la cadena respiratoria, y RNA guías para la edición génica (29, 30). La posición del kinetoplasto-flagelo respecto al núcleo permite clasificar los diferentes estadios en el ciclo de vida del parásito (28). Clásicamente, se hizo referencia a cuatro estadios: los tripomastigotes metacíclicos, amastigotes, tripomastigotes no replicativos y epimastigotes. Los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en las heces del vector; estas formas motiles penetran la piel a través de la picadura o por membranas mucosas. Una vez en el organismo pueden invadir un número amplio de células fagocíticas o no fagocíticas. Hay tres mecanismos

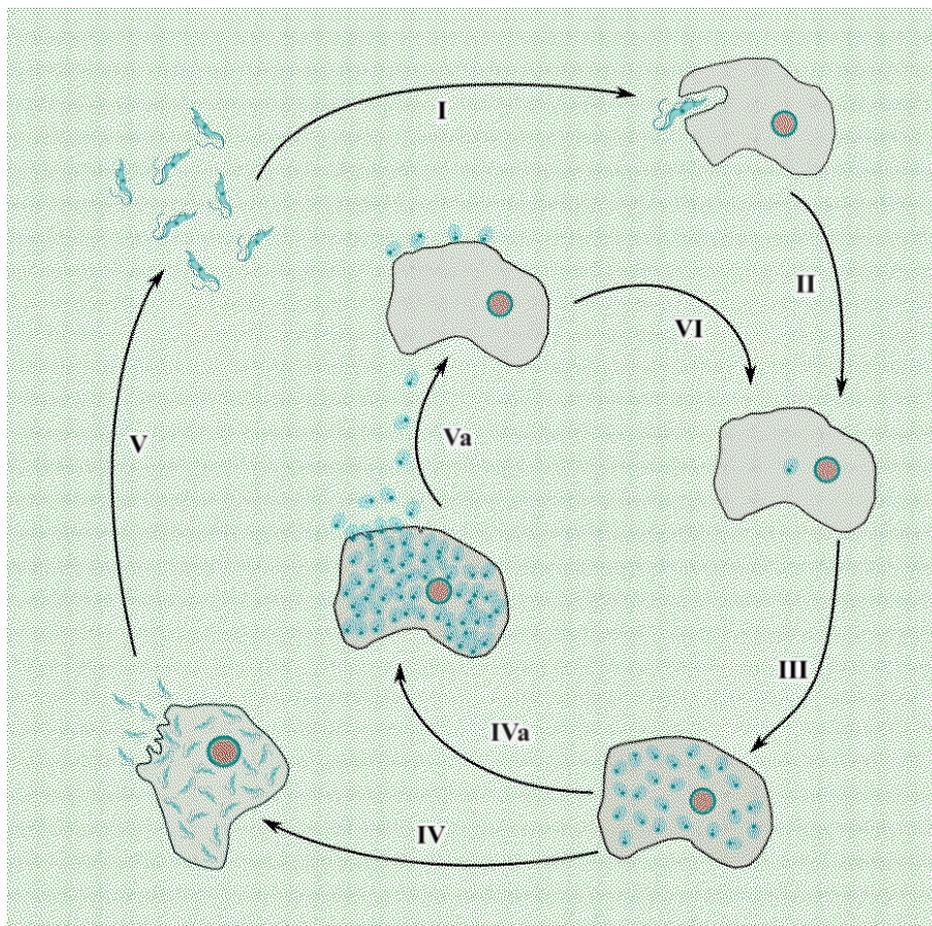
por los que *T. cruzi* ingresa a las células: mediado por la exocitosis de lisosomas (31), la vía endocítica (32) y el mecanismo autofágico (33).

En el mecanismo de exocitosis de lisosomas, el parásito ingresa a células fagocíticas no profesionales en un mecanismo independiente de actina, diferente de la fagocitosis, que involucra la movilización de lisosomas originada por señales de daño ocasionadas por el parásito, y posterior fusión de esos lisosomas con la membrana plasmática (10). Una invasión efectiva ocurre si los microtúbulos del citoesqueleto de la célula del hospedador son dirigidos a reclutar lisosomas para movilizarlos hacia el punto donde el parásito causó, con su movimiento flagelar, un daño en la membrana (34). Los lisosomas se fusionan con la membrana formando una vacuola y liberando su contenido al espacio extracelular, incluyendo una enzima lisosomal denominada esfingomielinasa ácida (35). Esta enzima produce ceramidas lo que facilita la internalización del microorganismo mediando la invaginación de la sección de la membrana plasmática donde se encuentra el parásito. Gracias al aporte de los lisosomas, la acidificación de la vacuola resulta en la expresión de una molécula formadora de poro Tc-Tox gracias a la cual los tripanosomas pueden escapar de la misma y continuar con el ciclo infeccioso (36).

El mecanismo de endocitosis es otra vía de entrada del parásito, evidenciada al bloquear experimentalmente la fusión de lisosomas con la membrana plasmática. La primordial diferencia con el mecanismo anteriormente descrito es la secuencia de fusión de los lisosomas, siendo tardía en este caso. *T. cruzi* puede ingresar por una vacuola resultado de la invaginación de la membrana plasmática que más tarde sí se fusiona con lisosomas ya que se encontraron marcadores de lisosomas en aquella (32). El último mecanismo mencionado, la autofagia, se manifiesta en condiciones de carencia de nutrientes o por inducción farmacológica en las que se observó un aumento de la infección y un paralelismo con el aumento de un marcador de autofagosomas (una vesícula de doble membrana que se fusiona con lisosomas, involucrada en procesos de catabolismo celular) rastreadas mediante video *in vivo* utilizando un marcador de vacuola (33).

Una vez en el citosol (**Figura 1.3**), los parásitos se diferencian a amastigotes (II) perdiendo el flagelo y adquiriendo una forma redondeada de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (37). Los amastigotes proliferan por fisión binaria hasta ocupar toda la célula (III), momento en el que comienzan a diferenciarse nuevamente a tripomastigotes (de un largo aproximado de 20  $\mu\text{m}$  y flageados), y lisan la membrana celular del hospedador para liberarse (IV). Si la lisis ocurre prematuramente aparecen amastigotes en sangre que

pueden ser tomados por el insecto vector o que podrían invadir otras células de mamífero, ya que este estadio también puede invadir células (38, 39). Luego de la lisis, abundan en sangre los tripomastigotes (I) capaces de invadir nuevas células o ingresar en el vector cuando este se alimenta (37). El insecto puede también incorporar hasta un 10% de amastigotes circulantes en sangre en una comida (38). En el tracto digestivo del vector los tripomastigotes se diferencian a amastigotes y epimastigotes, ambas formas replicativas para proliferar y finalmente migran hacia la porción final del tracto digestivo donde se unen hidrofóticamente a una cutícula de la pared del intestino, iniciando la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos. Una vez concluido ese proceso se desprenden de la cutícula y son excretados cerrando el ciclo (40).



**Figura 1.3.** Esquema del ciclo reproductivo de *T. cruzi*.

Diferentes aportes científicos sugieren que estas cuatro morfologías pueden no ser las únicas, dado que los ciclos en el insecto y en los mamíferos son más complejos de lo que se describió inicialmente (41, 42). Se encontró que los tripomastigotes circulantes

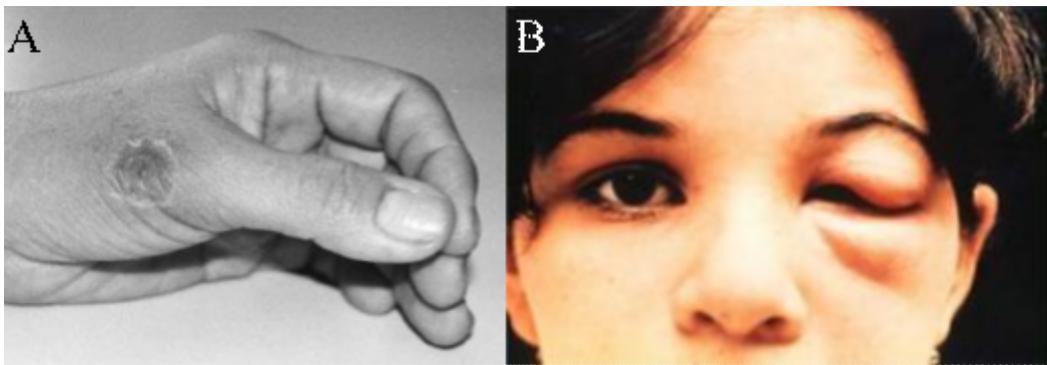
pueden describirse según una morfología ancha o angosta: la forma ancha tendría menor capacidad infecciosa y mayor resistencia a anticuerpos, dando lugar a una parasitemia tardía (41). Esta forma posee tropismo por músculo esquelético, liso y cardíaco. En cambio, la forma angosta genera una parasitemia temprana, es más sensible a anticuerpos y tiene tropismo por células del sistema fagocítico mononuclear (42). La proporción de cada una de estas morfologías en circulación sistémica depende de la cepa. Además, como ya se mencionó, la diferenciación de los tripomastigotes a amastigotes puede ocurrir extracelularmente, por lo que esta última morfología también podría encontrarse en la sangre. Por otra parte, se ha descrito a los llamados “zoid”, una célula de corta vida media sin núcleo, conteniendo únicamente el kinetoplasto y flagelo (43), resultado de la diferenciación asimétrica de tripomastigotes metacíclicos a amastigotes. Tal vez uno de los hallazgos más interesantes, reportado en el año 2017, sea el de una población de amastigotes quiescentes, así como se han descrito para otros protozoarios como *Plasmodium* y *Toxoplasma*. Estas formas pueden residir en tejidos infectados durante largos períodos de tiempo y restablecer espontáneamente su ciclo celular luego de concluido un ciclo de tratamiento farmacológico. Todavía se desconocen los detalles de este proceso (44).

Por otro lado, *T. cruzi* puede clasificarse en unidades discretas de tipificación (DTU, por sus siglas en inglés: *Discrete Typing Unit*), de acuerdo con su amplia variabilidad genética y fenotípica. Existen 7 DTUs; TcI a TcVI más Tcbat; las cepas correspondientes a cada una de ellas presentan características en común de acuerdo con su distribución geográfica, asociaciones eco-epidemiológicas y manifestaciones clínicas, aunque pueden presentar otros atributos altamente variables como virulencia o respuesta a tratamiento. Por ejemplo, Brasil presenta una mayor prevalencia de TcI mientras que en Argentina predominan cepas de TcV y TcVI (45, 46).

## 5. Fases clínicas de la enfermedad de Chagas

Pueden distinguirse tres fases clínicas de la enfermedad: la aguda, la crónica-indeterminada y la crónica-sintomática. La fase aguda se caracteriza por una amplia diseminación del parásito en la circulación sanguínea, la cual puede evidenciarse fácilmente con la observación de una muestra de sangre al microscopio. Las manifestaciones de la fase aguda ocurren luego de un período de incubación de 7 a 30 días, y en ella se observan signos y síntomas en su mayoría inespecíficos característicos

de procesos infecciosos, tales como fiebre, anorexia, vómitos, mialgia, taquicardia, linfocitosis. Esta inespecificidad conduce a que en un alto porcentaje de los pacientes los síntomas se desestimen; nada más un 10% de los casos desarrollan síntomas más específicos (47). Si el contagio es vectorial, la entrada del parásito a una persona en ocasiones puede evidenciarse por un proceso de inflamación (nombrado como chagoma), que a nivel ocular puede generar conjuntivitis, adenopatía satélite preauricular en la conjuntiva ocular o edema unilateral palpebral (identificada como signo de Romaña) (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** (A) Chagoma y (B) Signo de romaña. (A) Compartido de Kinoshita-Yanaga A, et al. *Accidental infection by Trypanosoma cruzi follow-up by the polymerase chain reaction: case report*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. (2009) (B) OMS/TDR (*Tropical Disease Research*) bajo los términos de la licencia *Creative Commons Attribution licence* (CC-BY).

*T. cruzi* produce una batería de moléculas que le permite evadir la respuesta inmune del paciente: cruzipaina, una cisteín-proteasa que bloquea la activación de NF- $\kappa$ B; mucina que reduce la interacción con anticuerpos; peroxidases para resistir el estrés oxidativo en la entrada a la célula; y la glicoproteína de membrana T-DAF (factor acelerador del decaimiento del complemento en tripomastigotes) similar a la DAF humana, que ayuda a inhibir la unión en la membrana de las proteínas del complemento, entre otras (48).

En los niños, la fase aguda congénita bien puede ser asintomática o producir hepatoesplenomegalia, ictericia, hemorragias en la piel, y signos neurológicos, en especial en infantes prematuros (49). 5-10% de los pacientes sintomáticos sin tratamiento mueren durante la fase aguda debido a encefalomiелitis o falla cardíaca severa (49). Caso contrario, la fase aguda puede durar de 4 a 16 semanas, disminuyendo

la parasitemia después de los 90 días hasta raramente poder detectar parásitos en la sangre periférica.

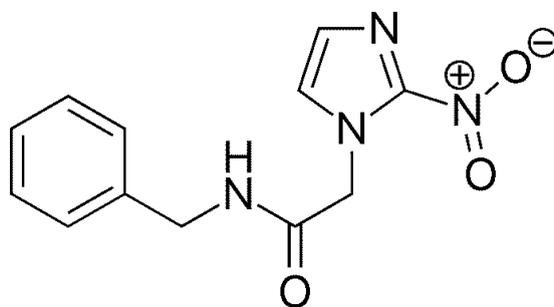
Si no reciben tratamiento los pacientes ingresan en una primera fase crónica indeterminada caracterizada por una latencia clínica que puede durar de 10 a 30 años o durante toda la vida del paciente. La mitad del grupo de infectados en zonas endémicas pasan por la fase indeterminada de la enfermedad presentando hemograma, electrocardiogramas y ecografías del corazón, esófago y colon normales. Aun así, las pruebas serológicas y la determinación de la carga parasitaria son positivas, y en algunos casos pueden observarse leves anomalías en esófago y corazón. 60% de las biopsias endomiocardiales de pacientes transitando una fase crónica indeterminada revela focos de lesiones. Aún se debate si estas lesiones son remanentes de la fase aguda o si son activas (49).

Al parecer existe una dependencia, aún todavía no enteramente dilucidada, entre la DTU infectiva y la aparición de manifestaciones clínicas distintivas en la reactivación de la fase crónica (50), siendo los órganos más afectados en la fase crónica sintomática el corazón, el sistema digestivo y el sistema nervioso (51). Las afecciones al corazón suceden en un 20-30% de los casos, las gastrointestinales en el orden del 15-20%, y menos frecuentemente las lesiones al sistema nervioso periférico con la aparición de polineuropatías sensoriales en menos de un 5% de los pacientes (47). La miocardiopatía es la complicación más común de la enfermedad, asociada a tromboembolismos, dolores precordiales, aneurismas del ventrículo izquierdo y muerte súbita (49). Volviendo sobre las DTU, las cardiomiopatías están asociadas a TcI en la zona del norte del Amazonas, mientras que TcII, IV y VI se asocian con la aparición de megaesófago y megacolon en el centro de Brasil y la región del cono sur. En última instancia, la patogénesis es un proceso complejo que dependerá de una combinación de factores como la carga parasitaria, la DTU y el sistema inmune del paciente (47). La complejidad de la patogénesis aumenta aún más si se tiene en cuenta la posibilidad de infecciones mixtas con cepas de *T. cruzi* categorizadas en distintas DTU conviviendo en un mismo paciente (52). Este tipo de infecciones podrían ocasionarse ya sea por dos o más mordeduras de distintos vectores infectados con cepas del parásito, o por la mordedura de un vector cuyo tracto digestivo alberga una combinación de cepas, como se logró identificar en triatominos en Bolivia (53).

## 6. Diagnóstico y farmacoterapia

El diagnóstico en la fase aguda se basa en la aparición de una alta tasa de tripomastigotes en sangre periférica reflejo del pico de la parasitemia que caracteriza a esta fase, por lo que las muestras requeridas para el diagnóstico son muestras de sangre sin pasar por un proceso de congelamiento y con menos de 6 horas desde la extracción. La sangre es procesada para microscopía por gota fresca, gota gruesa, frotis o para xenodiagnóstico (exponiendo a un vector sin infectar al paciente bajo la observación posterior del vector) o PCR (54). En casos de sospecha de transmisión congénita luego de los 8 meses de edad o en casos de seroconversión en la fase aguda por contagio por otras vías de transmisión se realiza el seguimiento mediante la prueba patrón de referencia, que es una prueba serológica (ya sea un ensayo ELISA o una prueba de inmunoprecipitación) (55). En casos de pacientes con sospecha de estar cursando la fase crónica indeterminada o la sintomática se utilizan como diagnóstico dos métodos serológicos (ELISA o inmunocromatografía rápida), seguidos de un tercero en caso de resultados no coincidentes. En el caso de mujeres embarazadas se suma además la prueba de PCR en búsqueda de ADN de *T. cruzi*, ya que cantidades de material genético detectables incrementan el riesgo de transmisión congénita; esta prueba también se adiciona al seguimiento de pacientes inmunosuprimidos para verificar la eficacia del tratamiento (46).

Actualmente, se utilizan dos fármacos para el tratamiento: BNZ (**Figura 1.5**) y nifurtimox (NFX). Ambos datan de las décadas de 1960-1970, y están asociados frecuentemente a una discontinuación del tratamiento debido a los efectos adversos que provocan (56, 57).



**Figura 1.5.** Estructura química del BNZ.

Los mecanismos de acción de estos fármacos se basan en la biotransformación a metabolitos que poseen actividad contra *T. cruzi*. En el caso del NFX la formación de un grupo nitroso y uno hidroxilamina seguida por fragmentación produce un nitrilo de cadena abierta insaturada que puede formar aductos con el ADN y los grupos tiol de las proteínas. La metabolización del BNZ, por otra parte, da lugar a un grupo hidroxilamina y un hidroxilo cuyos re-arreglos generan un grupo dihidroxidihidro que al descomponerse forma el producto reactivo glioxal, causante de daño a nivel del ADN, kADN, proteínas y esteroides, entre otras macromoléculas (58). Como se mencionó anteriormente, el uso de estos fármacos está asociado a efectos adversos genotóxicos, carcinogénicos, toxicidad fetal, reacciones de hipersensibilidad de la piel, efectos en el sistema nervioso central y periférico, y manifestaciones hematológicas por depresión de la médula ósea, además de que el tratamiento es largo (60-90 días) lo que contribuye a la baja adherencia de los pacientes. En los últimos 20 años, BNZ fue aprobado por la FDA para su comercialización en Estados Unidos (en el año 2017), para el tratamiento de niños de 2 a 12 años (59), y el uso pediátrico de NFX fue aprobado por la FDA en el año 2021 (60).

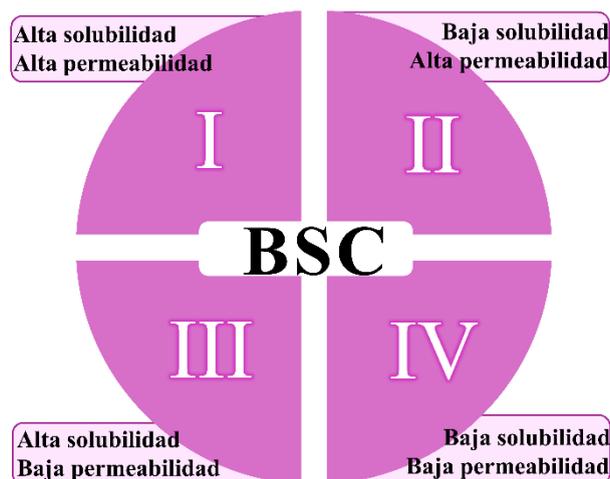
El seguimiento de la eficacia clínica de los fármacos utilizados presenta controversias. Algunas aristas a evaluar son los métodos de detección y los biomarcadores utilizados para el seguimiento de la infección. El criterio actual para establecer el éxito en el tratamiento es la conversión serológica de positiva a negativa en asociación con los resultados negativos de las pruebas parasitológicas (hemocultivo/xenodiagnóstico). Vermelho y colaboradores (61) remarcan en su artículo “Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery?” los avances que hubo y las posibilidades de mejora en el proceso de descubrimiento, siendo el monitoreo de la respuesta al tratamiento uno de los ítems clave desarrollados. El monitoreo del tratamiento también puede llevarse a cabo mediante métodos microscópicos y/o PCR. Estos métodos suelen ser costosos por lo que hoy en día comienza a apostarse por la integración de herramientas de plataformas proteómicas para la generación de marcadores. Por otra parte, el desarrollo de ensayos *in vitro* y modelos *in vivo* con mayor capacidad predictiva, la contemplación de la diversidad genética del parásito en el screening de nuevas terapias potenciales, la promoción de consorcios público/privado en la búsqueda de financiación, y la eficacia de los fármacos en las distintas fases de la enfermedad son, según los autores, puntos para mejorar (61).

La eficacia del BNZ en la etapa aguda de niños y adultos es del 80-90%. En niños cursando la etapa crónica-indeterminada, la respuesta al tratamiento es del 90% para NFX y 94% para BNZ. En adultos en etapa crónica, el 7-8% de los pacientes responden adecuadamente al tratamiento con NFX (62, 63), mientras que para BNZ la tasa de curación es más variable del 8-20%. Aún se esperan los reportes de los resultados de los ensayos clínicos TESEO (#NCT03981523) y EQUITY (#NCT02369978) que estudian la equivalencia entre ambos fármacos en adultos.

El primer estudio prospectivo, multicéntrico y aleatorizado de adultos en la fase crónica “*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT)*” (#NCT00123916), cuyos resultados se reportaron en 2016, arrojó esa última conclusión: el BNZ no redujo la progresión clínica en pacientes con una cardiomiopatía establecida (64). Sin embargo, varios investigadores han discutido estas conclusiones, siendo los aportes más interesantes, a nuestro juicio, aquellos brindados por Rassi, Rassi Jr y Marin-Neto (2017) (para tener en cuenta, Rassi y Marin-Neto fueron dos de los autores de los lineamientos del protocolo original del ensayo clínico) (65). Ellos discuten las conclusiones estableciendo que los resultados de BENEFIT podrían haber sido positivos si se hubiera tenido en cuenta, por ejemplo, la admisión en el hospital como criterio de punto de corte, ya que en el tratamiento del Chagas crónico es una de las metas principales que los pacientes no tengan que ser hospitalizados (65). También critican el uso del criterio de tiempo hasta la aparición del primer evento considerándolo como sub-óptimo en una enfermedad crónica en la que muchos eventos no fatales pueden ocurrir, y que comprende un período prolongado antes de la muerte. Las conclusiones de BENEFIT establecen que BNZ no mejora las cardiopatías crónicas del Chagas, lo que llevaría a muchos médicos a no prescribir el fármaco en pacientes cursando esa etapa de la enfermedad; Rassi y Marin-Neto, en cambio, recomiendan usar BNZ en el tratamiento crónico alegando que “la ausencia de evidencia no significa evidencia de ausencia”. En esa línea, Crespillo-Andújar y colaboradores realizaron un meta-análisis a partir de ensayos clínicos y estudios observacionales en los que concluyen que en niños cursando la fase crónica sería recomendable continuar el tratamiento con BNZ, asimismo en adultos contagiados con una DTU asociada a síntomas gastrointestinales (66). Se esperan los resultados del ensayo clínico “*TRAtamiento EN pacientes Adultos (TRAENA)*” (#NCT02386358) para evaluar el efecto del BNZ en las alteraciones cardíacas causadas por la enfermedad.

Contribuyendo a la falla terapéutica, se ha observado resistencia a BNZ y NFX *in vitro*, *in vivo* y en escenarios clínicos. El concepto de dormancia ha adquirido peso en los últimos años; los amastigotes demostraron ser resistentes a extensos períodos de tratamiento, pudiendo reestablecer la infección hasta luego de 30 días de la exposición al fármaco (61). En el laboratorio, la exposición de *T. cruzi* a los fármacos, por un período largo de tiempo, está asociado a una expresión defectuosa de *ntr-i*, el gen que codifica la nitroreductasa tipo I, enzima que reduce el grupo nitro de los fármacos formando especies citotóxicas (67). Otro mecanismo de resistencia está dado por la participación de transportadores de eflujo del tipo *ATP-binding cassette* (en particular ABCG-1, así como Pgp-1 y Pgp-2) en la membrana del parásito. Estas proteínas están involucradas en el fenotipo resistente a multidroga (MDR, *Multiple Drug Resistance*). En particular se describieron dos genes tipo *mdr* en *T. cruzi*: TcPGP1 y TcPGP2 (68). Estos transportadores remueven moléculas de fármaco del citosol, por lo que la sobreexpresión de las bombas de eflujo en el parásito se asociaría a una disminución en el efecto de sus sustratos, entre ellos BNZ.

Por otra parte, la falla terapéutica del BNZ podría estar relacionada a una cuestión farmacocinética, como el proceso de absorción del fármaco. En 1995, Amidon y colaboradores (69) desarrollaron el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BSC, *Biopharmaceutical Classification System*) (**Figura 1.6**) que clasifica a los principios activos en cuatro categorías en función de su solubilidad y permeabilidad intestinal, características fundamentales que impactan en la absorción. Se consideran fármacos de alta solubilidad a aquellos cuya máxima dosis terapéutica entregada por vía oral es completamente soluble en 250 mL en el rango de pH 1,2- 6,8 a una temperatura de  $37 \pm 1$  °C, y se consideran fármacos de alta permeabilidad a aquellos con una fracción absorbida de la dosis por vía oral mayor al 85%.



**Figura 1.6.** Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BSC).

Algunos autores clasifican al BNZ como un fármaco de clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) por su valor de solubilidad en el rango 0,2- 0,4 mg/mL en agua o fluidos gástricos (70). La limitación en la absorción de los fármacos de clase II puede deberse a su baja velocidad de disolución (que guarda una correlación directa con la solubilidad) y/o a su escasa solubilidad, ocasionando una biodisponibilidad variable que podría aumentar si se incrementara la velocidad de disolución. Otros autores clasifican al BNZ como fármaco de clase IV (baja solubilidad, baja permeabilidad) (71). En este caso, el proceso de absorción se verá perjudicado tanto por la baja solubilidad, la baja velocidad de disolución y por la dificultad para atravesar la pared gastrointestinal.

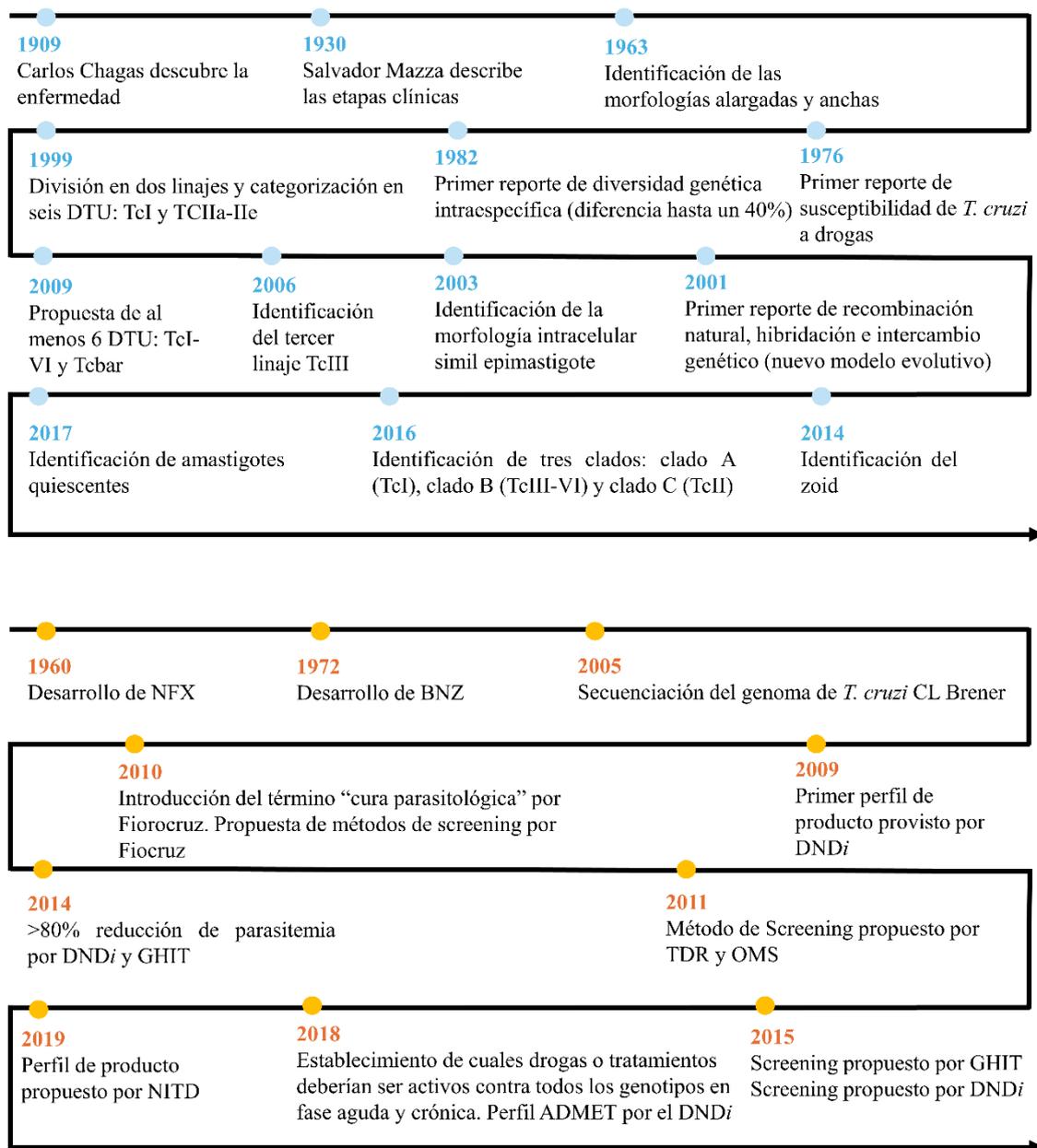
## 7. Avances hacia nuevos medicamentos

Los problemas de eficacia y seguridad de la limitada farmacoterapia disponible, junto con la ampliación en el conocimiento de la biología del parásito, incluyendo su tropismo hacia distintos tejidos, la diversidad genética y los estadios morfológicos, son clave para orientar el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas. Sin embargo, dentro de las enfermedades desatendidas, la enfermedad de Chagas no ha ocupado el primer lugar en la lista de prioridades de las grandes carteras de inversión; en el período comprendido del 2009-2018 se invirtieron 35 billones de USD en enfermedades desatendidas, de los cuales tan solo 236,31 millones de USD se destinaron a la enfermedad de Chagas, es decir un 0,67% de lo invertido. Comparativamente con otras enfermedades como HIV, tuberculosis y malaria, a las que se destinaron 25 billones de

USD, los fondos destinados para la enfermedad de Chagas son, evidentemente, mucho menores (15). En este contexto, la colaboración entre los laboratorios académicos y las organizaciones no gubernamentales han sido claves para el progreso en las fases tempranas del descubrimiento de nuevos fármacos (61, 72). La iniciativa sin fines de lucro “Drogas para Enfermedades Desatendidas” (DNDi, *Drugs for Neglected Diseases initiative*) constituyó una red de colaboración con industrias farmacéuticas y laboratorios académicos para la mejora del tratamiento de la enfermedad de Chagas. Una de las colaboraciones de DNDi es el consorcio denominado *Neglected Tropical Diseases Drug Discovery Booster* financiado, entre otros, por Tecnología Global en Salud Innovativa (GHIT, *Global Health Innovative Technology*, la fundación de Bill y Melinda Gates (*Bill & Melinda Gates Foundation*), etc. (61, 73).

La Plataforma de Investigación Clínica de Chagas (CCRP, *Chagas Clinical Research Platform*), lanzada por la DNDi, ha definido el primer perfil de producto para un fármaco contra la enfermedad de Chagas en el año 2009, así como la revisión de las pautas para un segundo uso de fármacos aprobados para otras enfermedades (**Figura 1.7**) (40). Inicialmente, para el perfil de producto se estableció que el fármaco ideal debiera ser eficaz tanto en la fase aguda como en la crónica, no tener contraindicaciones ni genotoxicidad, teratogenicidad o potencial pro-arritmico.

En el año 2008, el Programa Fiocruz de Investigación y Desarrollo Tecnológico (FPRTD, *Fiocruz Program for Research and Technological Development*) organizó y presentó el workshop “Modelos experimentales y *screening* de drogas en la enfermedad de Chagas” donde se discutió e introdujo el término “cura parasitológica”, y donde se propuso un procedimiento para el *screening in vitro* e *in vivo* de fármacos. En 2011, el grupo de TDR y la OMS propusieron una ampliación al protocolo para el *screening* de fármacos (74). Profundizando brevemente sobre este segundo protocolo de *screening*, se realizó un cribado de la librería de compuestos *Life Chemicals* (Ucrania) (10.000 compuestos) que luego fueron ensayados *in vitro* contra amastigotes y para toxicidad celular en células de pulmón (MRC-5). 171 compuestos resultaron activos con un criterio inicial de  $EC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$  contra la cepa Tulahuen CL2 utilizando NFX como control; 109 compuestos fueron eliminados por toxicidad celular y 11 por características químicas desfavorables; de los 51 compuestos restantes, una serie fue transferida a la Universidad de São Paulo para continuar las pruebas, y otra serie de 14 moléculas presentó selectividad ante el patógeno y actividad a concentraciones muy bajas (0,22  $\mu\text{g/mL}$ ), aunque la toxicidad en células no fue muy alentadora (74).



**Figura 1.7.** Hitos en la investigación (celeste, cuadro superior) y línea temporal del desarrollo de perfil de producto para fármacos (naranja, cuadro inferior) contra la enfermedad de Chagas.

Seguidamente, en el 2015, DNDi y GHIT propusieron nuevas ampliaciones a los protocolos de screening, estableciendo que el tratamiento debería reducir la carga parasitaria al menos en un 80%, (75,76). El protocolo planteado por GHIT hizo énfasis en la necesidad de focalizar la búsqueda de compuestos en nuevas series químicas cambiando los rigurosos criterios de actividad por unos que no excluyeran series

químicas descartadas anteriormente. Cabe destacar que los criterios previos de selección ( $EC_{50} < 3 \mu M$ ) hubieran dejado desestimado tempranamente a los fármacos que se usan actualmente en uso. Propusieron como criterio de selección de un compuesto una  $EC_{50} < 10 \mu M$  contra amastigotes, y como criterio de selección para la optimización que en un modelo agudo el compuesto candidato demostrara una reducción en la carga parasitaria de un 80% en órganos y tejidos, o que no se detectaran parásitos al final del tratamiento; también incluyeron como criterio un incremento en la sobrevida con hasta 10 dosis de 50 mg/kg administradas oralmente (75). El protocolo de screening propuesto por DNDi para una nueva serie química partió de un screening en amastigotes de la cepa Tulahuen con un valor de corte de  $EC_{50} < 5 \mu M$ , citotoxicidad con un índice de selectividad  $> 10$ , potencia contra todos los genotipos del parásito y en ensayos contra tripomastigotes, solubilidad a pH 2 y 6,5  $> 50 \mu g/mL$ ,  $gLog D < 4$ , metabolismo hepático *in vitro*  $< 0,5$ , tolerabilidad en la cepa de ratones Balb/c, obtención de información de perfiles farmacocinéticos en Balb/c con dosis 20 mg/kg en administración oral y 1 mg/kg intraperitoneal, validación contra la cepa *T. cruzi* CL Brener, eficacia en un tratamiento a la máxima dosis durante 5 días en ratones Balb/c infectados con esa cepa, información sobre estabilidad en plasma, unión a proteínas plasmáticas, permeabilidad en modelo Caco-2, eficacia *in vitro* en la cepa Tulahuen, eficacia *in vivo* en modelo agudo y crónico, y un modelo de dosis-respuesta en el modelo crónico (76).

En el 2018, DNDi, propuso que los fármacos candidatos y los tratamientos efectivos deberían alcanzar la cura parasitológica tanto en la fase aguda como crónica, con la adición de un renovado énfasis en el perfil ADME (procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) de potenciales candidatos (77). Más recientemente, en el 2019, el Instituto Novartis de Enfermedades Tropicales (NITD, *Novartis Institute for Tropical Diseases*) hizo una revisión del perfil de producto, agregando que los tratamientos debieran eliminar todos los parásitos de sangre y tejidos y ser bien tolerados y seguros. Esto lleva a los requerimientos de un nuevo fármaco a que cruce sin dificultades barreras biológicas, que sea activo ante amastigotes quiescentes (40). Actualmente, según DNDi, el perfil de un compuesto candidato debiera reunir requisitos específicos en distintas categorías como eficacia, régimen de tratamiento, etc. (Tabla 1.1).

Un aspecto para tener en cuenta es que la investigación abocada al descubrimiento de fármacos enfoca parte de sus esfuerzos a la realización de ensayos *in vitro* e *in vivo* para la búsqueda de compuestos activos contra blancos moleculares específicos y/o en

cribado fenotípico (tamizaje de moléculas con actividad tripanocida), y es común que de una gran diversidad de compuestos pocos sean seleccionados para pasar a etapas clínicas de evaluación, menos aún que tengan un desempeño exitoso. Considerando las bajas tasas de éxito, tal vez deberían reevaluarse de manera continua o periódica los criterios que se aplican en los *screening* (78), por ejemplo, la utilidad de una evaluación fenotípica *in vitro* en epimastigotes o tripomastigotes, o los puntos de corte que se utilizan para considerar que un candidato es eficaz, ya que los compuestos elegidos de acuerdo a estos criterios suelen fracasar en las próximas rondas de evaluación, representando una pérdida muy alta de inversión.

Por otra parte, la desatención en el desarrollo y la investigación en fármacos novedosos contra la enfermedad de Chagas se evidencia considerando que el último compuesto cuya eficacia clínica se probó en pacientes es el fexinidazol, resultado de un reposicionamiento de fármacos ya utilizados para la tripanosomiasis africana. Hacia el 2020 se probó que este fármaco fue eficaz en dosis de 1200 a 1800 mg/d en pacientes en fase crónica indeterminada (#NCT02498782). Más tarde se realizó un nuevo ensayo clínico para probar regímenes de tratamiento más cortos y dosis más bajas para intentar minimizar los efectos adversos observados en los estudios anteriores. Los resultados estuvieron disponibles a principios de 2022 concluyendo en una eficacia no confirmada luego de un año. Se planea continuar con la investigación del fexinidazol en combinación con otros fármacos o en nuevas indicaciones, como por ejemplo, en pacientes inmunocomprometidos con riesgo de reactivación (79). Por otra parte, otros compuestos que surgieron de estudios de reposicionamiento no obtuvieron resultados prometedores, entre ellos el posaconazol y E-1224 (prodroga de ravuconazol). Sin embargo, en el caso del antimicótico de uso tópico oxaborol (DNDI-6148) se observaron resultados prometedores contra el Chagas en un modelo *in vivo* (80). Por otra parte, se obtuvieron resultados esperanzadores en modelos *in vivo* para la colchicina utilizada como un cardioprotector en cardiomiopatías chagásicas (81) al igual que en el caso del selenio para reducir la progresión de la enfermedad cardíaca (82).

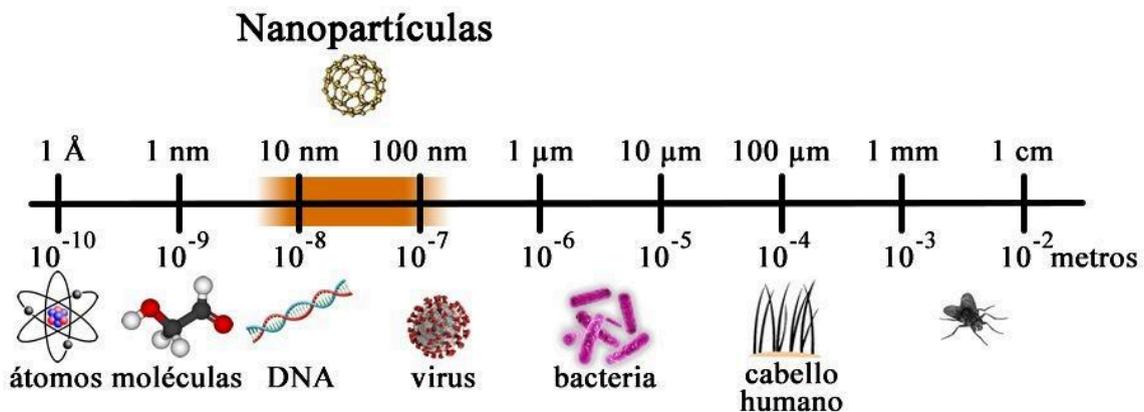
**Tabla 1.1.** Perfil de producto para la enfermedad de Chagas. Fuente: sitio web DNDi.

	<b>Ideal</b>	<b>Aceptable</b>
<b>Población a la que está dirigida la terapia</b>	Aguda y crónica	Crónica
<b>Distribución geográfica</b>	Todas las regiones	Todas las regiones
<b>Eficacia</b>	Superior a la dosis estándar de BNZ en fase aguda y crónica (cura parasitológica)	No inferior a la dosis estándar de BNZ
<b>Seguridad/ Tolerabilidad</b>	Superior al BNZ en la frecuencia de interrupciones del tratamiento por indicación médica. Sin genotoxicidad, sin teratogenicidad ni potencial pro-arrítmico.	Superior al BNZ en la frecuencia de interrupciones del tratamiento por indicación médica. Sin genotoxicidad ni potencial pro-arrítmico.
<b>Contraindicaciones</b>	Sin contraindicaciones	Contraindicaciones en el embarazo
<b>Interacciones con otros fármacos</b>	Sin interacciones clínicas significativas	Sin interacciones clínicas significativas con antiarrítmicos y anticoagulantes
<b>Formulación</b>	Oral, adaptada a la edad	Oral/ parenteral, adaptada a la edad
<b>Estabilidad</b>	5 años en zona climática IV	3 años en zona climática IV
<b>Régimen de tratamiento</b>	<30 días	Oral: cualquier duración Parenteral: <7días
<b>Costos</b>	El más bajo posible	Similar a los tratamientos actuales

## Nanovehículos farmacéuticos

### 1. Mundo nano

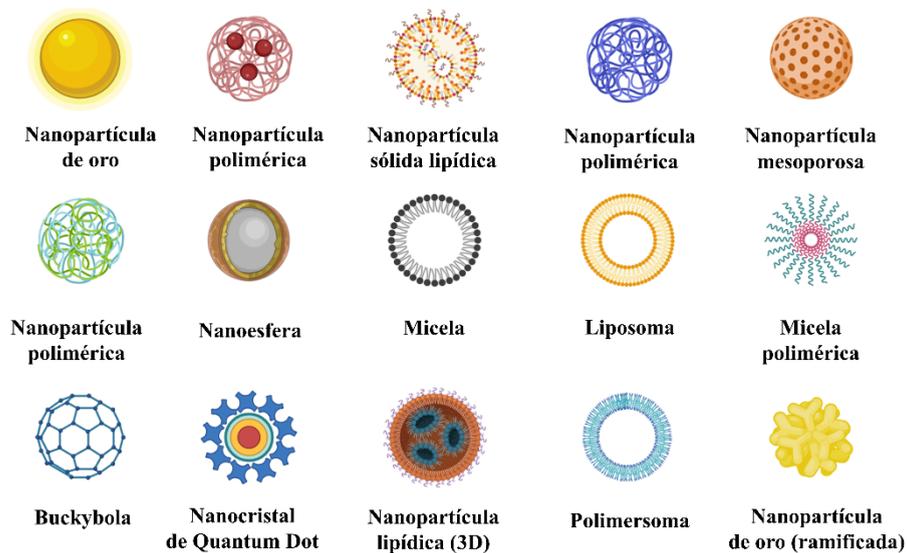
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de EE. UU. (NSTC, *National Science and Technology Council*) definió a la nanotecnología como “el entendimiento y control de la materia en el rango aproximado entre 1-100 nm en el que fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. En la nanoescala, la materia puede exhibir propiedades físicas, químicas y biológicas inusuales, difiriendo de las propiedades de la materia a granel. Algunos materiales nanoestructurados son más fuertes o tienen distintas propiedades magnéticas en comparación con otras formas o tamaños de la misma materia” (83). En esta escala (**Figura 1.8**), el comportamiento de los materiales están influenciados por fenómenos como la dispersión de la luz, el confinamiento cuántico y la resonancia superficial de plasmones, existiendo un predominio de las fuerzas electromagnéticas y el movimiento browniano (84). Un nanomaterial podría resultar de cualquier material natural o sintético si más del 50% de las partículas que lo componen tienen al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm. Este requisito tal vez sea demasiado exigente, ya que frecuentemente partículas de tamaño mayor a 100 nm exhiben propiedades “nano”, por ejemplo, son reconocidas y procesadas endocíticamente por células del sistema inmune (85). Entonces, flexibilizando la definición, y acorde al *Handbook of Nanomedicines*, en el ámbito de las aplicaciones terapéuticas que nos compete, el límite superior de la nanoescala se hallaría en los 300-400 nm (86).



**Figura 1.8.** Escala nanométrica.

## 2. Nanovehículos farmacéuticos

El área de la salud ha sido interpelada por la nanotecnología en los campos de la ingeniería de tejidos, la toxicología, el diagnóstico y la terapéutica. Particularmente, en el área de la terapéutica, la implicancia de la nanotecnología ha permitido el desarrollo de un abanico extenso de nanomedicinas basadas en liposomas, nanocristales y nanopartículas poliméricas, entre otras (**Figura 1.9**). La Fundación Europea de Ciencia (ESF, *European Science Foundation*) señala que “la nanomedicina usa herramientas en la escala nano para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y para incrementar el entendimiento de los procesos pato-fisiológicos subyacentes de la enfermedad” (87).



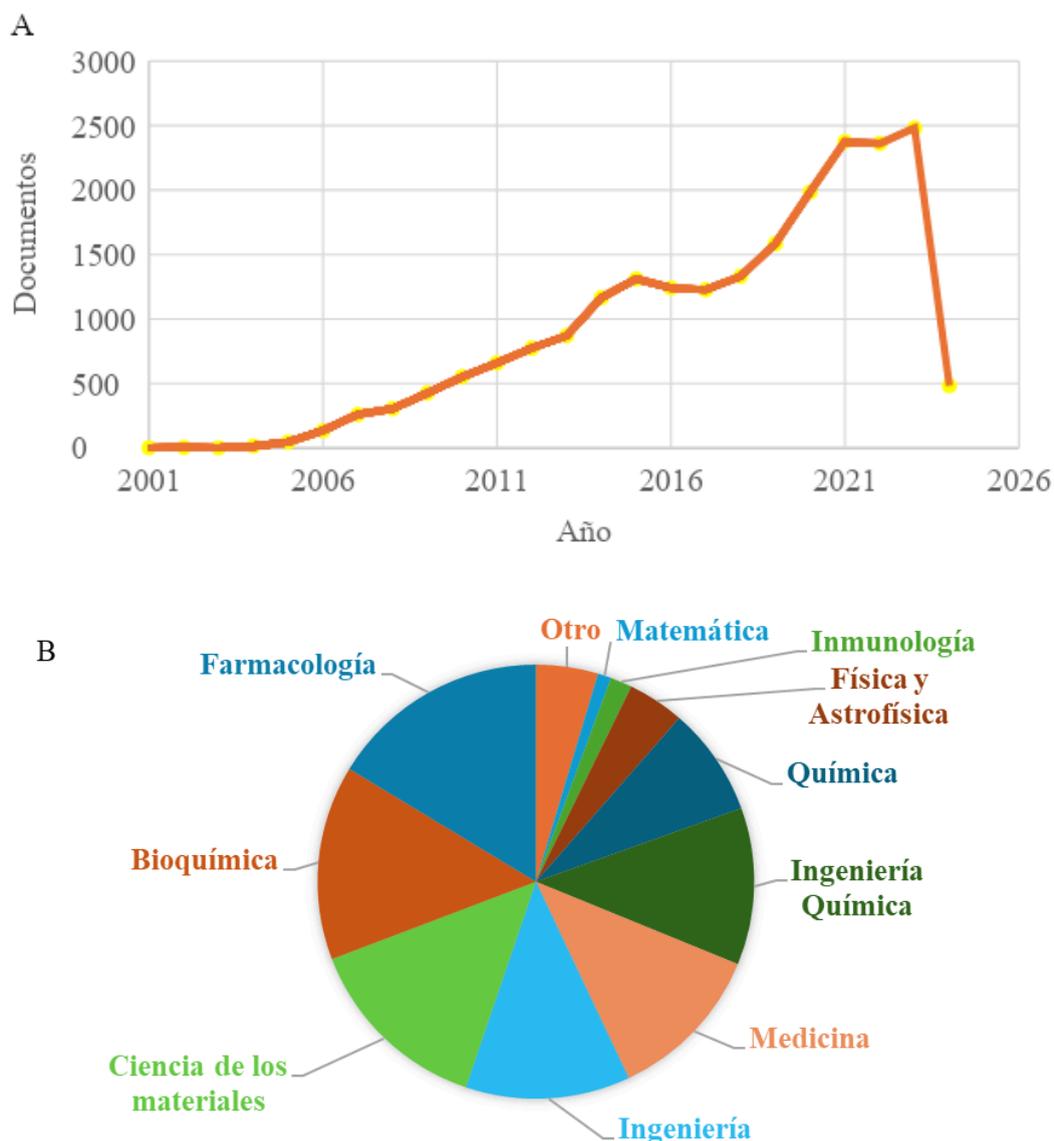
**Figura 1.9.** Abanico de nanopartículas. Modificado de Hicham Wahnou (2023), compartido bajo los términos de la licencia *Creative Commons Attribution licence* (CC-BY).

Para tener un panorama de la importancia actual de las nanomedicinas, solamente involucrando liposomas, según una revisión a abril del 2024 en el sitio web de ensayos clínicos (clinicaltrials.gov) hay 169 ensayos clínicos activos, mayormente orientados al tratamiento de distintos tipos de cáncer, y algunos estudios enfocados en enfermedades respiratorias (bronquiolitis e infecciones causadas por micobacterias), manejo del dolor postquirúrgico, y como adyuvantes de vacunas contra los virus de HIV y SARS-COV-2. En relación al crecimiento económico, se espera que el mercado de las nanomedicinas

crezca de 219.850 millones de dólares en 2020 a 461.252 millones en 2026 (88), incrementándose el número de productos aprobados para su comercialización a más de 100 nanomedicinas (89).

Las primeras publicaciones directamente vinculadas a sistemas nanoparticulados con aplicaciones biomédicas se remontan a 1970; sin embargo, hasta 2005 menos de 30 artículos habían empleado el término “nanomedicina” (90). El impacto posterior de este campo del conocimiento ha sido tal que diez años después se relevaron más de 1.000 artículos en la base de datos Web of Science (90). Actualmente esa cifra se eleva a más de 26.000 artículos, la mayoría de los cuales corresponden al área de farmacología (**Figura 1.10**).

Los nanovehículos farmacéuticos cambiaron el paradigma clásico de la terapéutica según el cual la liberación del fármaco desde su vehículo farmacéutico era una condición necesaria para que fuera absorbido. El advenimiento de las nanopartículas significó el desarrollo de vehículos adaptados a las necesidades específicas de las patologías, como, por ejemplo, el direccionamiento a ciertos tipos celulares a partir del agregado de ligandos específicos, y la protección, transporte y entrega del fármaco en el sitio de acción siguiendo una distribución diferente a la del fármaco libre. Gracias a la nanotecnología podría ser posible obtener un sistema que logre encapsular al fármaco protegiéndolo de procesos degradativos o biotransformaciones indeseables; dirigir el principio activo a su sitio de acción liberándolo de manera localizada, reduciendo las dosis requeridas, maximizando la eficacia y evitando la interacción con inespecífica (*off-target*); incrementar la permeabilidad y la velocidad de disolución cuando fuera necesario; y, finalmente, ser biodegradable y no acumularse en el organismo.



**Figura 1.10.** A) Cantidad de artículos publicados por año. B) Porcentaje de artículos publicados agrupados según área temática. Búsqueda utilizando “nanomedicine” en título, *abstract* y palabras clave.

### 3. Nanopartículas lipídicas

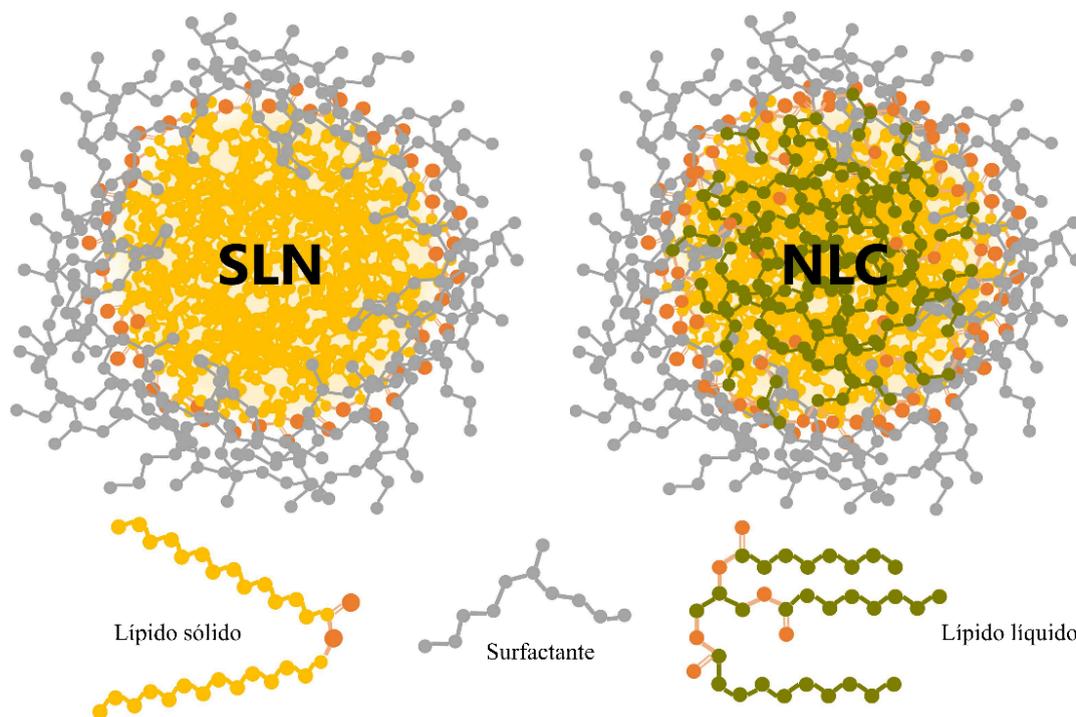
Volviendo sobre el abanico de nanopartículas existentes, en este trabajo de tesis se hará foco en nanopartículas lipídicas y poliméricas. En relación con las nanopartículas lipídicas, específicamente a los vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC, *Nanostructured Lipid Carriers*), son una dispersión coloidal de nanopartículas esféricas con un núcleo lipídico sólido a temperatura ambiente desestructurado por la

incorporación de un lípido líquido a temperatura ambiente y estabilizado mediante uno o más surfactantes (**Figura 1.11**). Surgieron a partir de la investigación del grupo del Dr. Müller (91) en nanopartículas con un núcleo lipídico sólido (SLN<sup>®</sup>, *Solid Lipid Nanoparticles*) que a su vez se establecieron como una alternativa más segura, barata y/o estable en comparación con emulsiones, micropartículas, nanopartículas compuestas de materiales inorgánicos o liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos. Luego de cumplidos unos 10 años del desarrollo de las SLN, surgieron las NLC a raíz de la evidencia de la expulsión del fármaco desde el núcleo de las nanopartículas debido a cambios en la estructuración de la matriz lipídica durante el almacenamiento (92). La síntesis de las SLN introduce configuraciones cristalinas de alta energía que se reestructuran a otras de baja energía conforme transcurre el tiempo. En ese reestructuramiento se observó la expulsión de fármaco de la matriz lipídica. El agregado del aceite y la aparejada reducción en la cristalinidad del núcleo sólido resultó en formulaciones más estables y con mayor capacidad de carga (93).

Las características más prometedoras de esta formulación son su hidrofobicidad, escalabilidad industrial, tamaño, carga superficial, permeabilidad, liberación paulatina de los principio activos, carga de fármaco, la innecesaridad de solventes orgánicos durante la síntesis y biocompatibilidad.

Siendo fuertemente hidrofóbicas, las nanopartículas lipídicas no se hidratan en medios acuosos por lo que no se disuelven en agua (ni se dispersan en el medio sin el agregado de un tensioactivo). Su obtención implica una alta tasa de transferencia de energía para obtener partículas con amplia área superficial siendo la homogeneización a alta temperatura y a alta presión las metodologías más comúnmente realizadas. Además, esta última es un procedimiento establecido a gran escala en la industria farmacéutica desde el año 1950, cuando se comenzó a aplicar para la producción de emulsiones parenterales. Esa línea de producción actualmente suele estar equipada con unidades de control de temperatura, por lo que podrían adaptar su uso a cualquiera de las dos metodologías (93).

Por otro lado, el tamaño, la distribución de tamaños y las moléculas/carga en la superficie de las nanopartículas son características de las formulaciones que impactan ampliamente en su aplicabilidad y son parámetros fundamentales en el control de calidad de los desarrollos. En primer lugar, el tamaño de las nanopartículas afecta sustancialmente su estabilidad, biodistribución, su velocidad de disolución y su internalización celular.



**Figura 1.11.** Esquema de SLN y NLC. En naranja los átomos de oxígeno de los lípidos. Modificado de Scioli-Montoto S, *et al.* *Solid lipid nanoparticles for drug delivery: pharmacological and biopharmaceutical aspects*, Front. Mol. Biosci. (2020), bajo los términos de la licencia *Creative Commons Attribution licence (CC-BY)*.

Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas no se dispersan espontáneamente en agua, sino que tienden a agregarse para disminuir el área superficial expuesta y minimizar la energía del sistema, por lo que las formulaciones necesitan ser estabilizadas. Esto se consigue principalmente a través de dos estrategias: el impedimento estérico provisto, por ejemplo, por surfactantes no iónicos, y la estabilización electrostática como resultado de repulsión entre cargas, provisto por ejemplo mediante decoración con surfactantes iónicos (94). Se ha reportado que en partículas obtenidas de compuestos orgánicos aquellas con tamaños mayores a 500 nm tienden a agregarse formando precipitados (95).

La extravasación desde capilares hacia los tejidos también depende del tamaño, encontrándose, por ejemplo, que solamente aquellas con un valor  $\leq 150$  nm son capaces de movilizarse por los capilares fenestrados del endotelio hepático, pero que estas mismas poseen menor penetrabilidad en capilares continuos que perfunden órganos como el corazón (96). Por este motivo es interesante tener en cuenta los límites de

tamaño de las barreras fisiológicas (93). Por ejemplo, los capilares sanguíneos tienen un diámetro de aproximadamente 5 a 40  $\mu\text{m}$  y un diámetro promedio de poro de 5 nm, por debajo de este tamaño las nanopartículas pueden atravesar el endotelio hacia el espacio extracelular. Los constituyentes del plasma tienen diámetros menores a 4 nm, con excepción de las proteínas plasmáticas que presentan diámetros mayores de 7 nm. El punto de corte de tamaño en el riñón es de aproximadamente 48 kDa y 10 nm de diámetro. A nivel celular, la membrana celular no permite el pasaje de compuestos mayores de 1 kDa y los poros nucleares tienen un diámetro de alrededor de 10-25 nm. El tamaño de las vesículas internalizadas varía de 60 a 120 nm, dependiendo del tipo de endocitosis y es generalmente mucho mayor (rango micrométrico) para la macropinocitosis y la fagocitosis (97).

La velocidad de disolución de los fármacos también depende del tamaño de las partículas aumentando la velocidad con la disminución del tamaño. Esto se expone a partir del aumento en el área superficial de las nanopartículas, según la expresión para la velocidad de disolución planteada en la ecuación de Noyes-Whitney,

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{h}$$

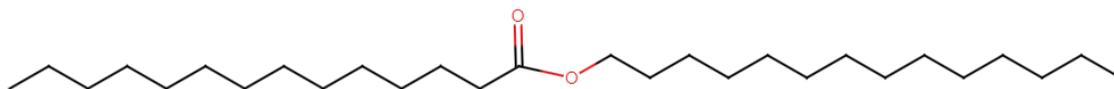
donde  $dC/dt$  es la velocidad de disolución de las partículas,  $D$  es el coeficiente de difusión (por ejemplo, en el medio gastrointestinal),  $A$  es el área superficial,  $h$  es el espesor de la capa difusional alrededor de cada partícula,  $C_s$  es la solubilidad del fármaco en la capa difusional y  $C$  la concentración de fármaco en el medio (98).

Aquí se evidencia que a mayor área superficial, mayor la velocidad de disolución, por lo que reduciendo las partículas del fármaco a la escala nanométrica podría mejorar la disolución de este, especialmente para fármacos de baja solubilidad como el BNZ.

Se ha mencionado el efecto de la carga superficial en la estabilidad de la formulación, falta mencionar su rol en la interacción con las células. Las nanopartículas con carga positiva son captadas e internalizadas más rápidamente por las células en comparación con las de carga negativa o neutra. Se sabe que las membranas celulares poseen una carga ligeramente negativa (99) y que la internalización celular es impulsada por las atracciones electrostáticas. Varios estudios demostraron que la interacción electrostática entre la membrana y nanopartículas positivas favorece la adhesión y facilita la internalización (100, 101). Para partículas pequeñas (2nm) una carga positiva puede alterar el potencial de la membrana provocando un influjo de calcio e inhibiendo la

proliferación celular. Para partículas más grandes (4-20 nm) la carga superficial puede inducir la remodelación de la bicapa lipídica. La interacción de partículas negativas con una membrana podría causar gelación local mientras que la interacción con nanopartículas positivas induciría la fluidez (102). Adicionalmente, componentes del plasma, como la albúmina, interaccionan preferentemente con nanopartículas positivas (103) formando la corona proteica que afecta a la internalización celular, y parámetros farmacocinéticos (dependiendo también del tamaño, la morfología de la nanopartícula y de la composición de la corona proteica); en algunos casos protegiendo a las nanopartículas del sistema inmune, acumulándose en órganos, o por el contrario, si la interacción es con opsoninas o fibrinógenos, acelerando su aclaramiento en el organismo (104).

Entre los lípidos más frecuentemente utilizados para la obtención de SLN y NLC encontramos triglicéridos, ésteres de glicerol parciales, ácidos grasos, esteroides (el de uso más común es el colesterol) y ceras (105). Dentro de este último grupo se incluye al miristil miristato (**Figura 1.12**), un compuesto formado por la unión éster entre el ácido mirístico y el alcohol miristílico, ambos con cadenas carbonadas saturadas de 14 carbonos constituyendo un producto ampliamente utilizado en cosmética como emoliente por sus agradables características sensoriales y baja-nula toxicidad tópica, ocular y oral (106, 107). Existe en la naturaleza en pequeñas cantidades que pueden ser extraídas a partir de coco, nuez moscada o almendras, aunque habitualmente se obtiene sintéticamente mediante catálisis enzimática con lipasas. Debido a su biocompatibilidad se comenzó a utilizar en la síntesis de nanopartículas proporcionando un portfolio de formulaciones eficientes para el encapsulamiento de fármacos (108-110).



**Figura 1.12.** Estructura química del miristil miristato.

#### 4. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas son vehículos muy atractivos desde el punto de vista de la versatilidad que tienen los polímeros a sufrir modificaciones. Los avances en el control de los procesos de polimerización han sembrado el terreno para el desarrollo de la ingeniería de nanopartículas con un control sobre su morfología, tamaño, superficie y funcionalización, como, por ejemplo, nanopartículas con respuesta a estímulos como el pH, la temperatura, la presencia de enzimas y/o reacciones redox.

Las nanopartículas poliméricas (**Figura 1.13**) puede obtenerse a partir de polímeros naturales como, por ejemplo, alginato o quitosano, extraídos de especies marinas, o bien de materiales sintéticos como los poloxámeros o los derivados de polimetacrilatos.

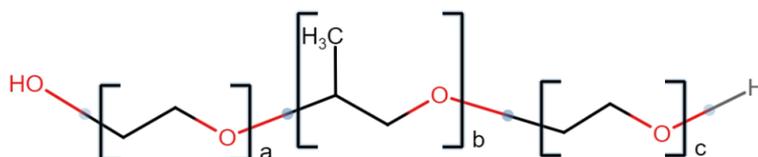
Los poloxámeros son copolímeros no iónicos compuestos por una cadena central hidrofóbica de poli-oxipropileno flanqueada por dos cadenas hidrofílicas de poli-oxietileno (111) (**Figura 1.14**). Los polimetacrilatos son polímeros de metacrilatos de dimetilaminoetilo, ácido metacrílico y ésteres de ácido metacrílico en proporciones variables (112).



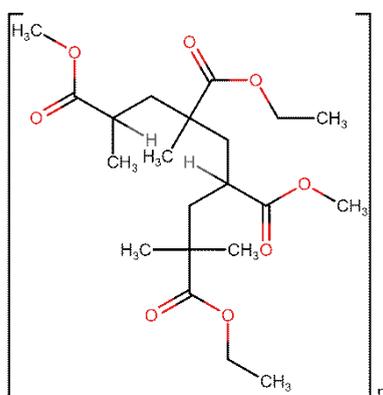
**Figura 1.13.** Esquema de una nanopartícula polimérica esférica sencilla sin recubrimiento. Modificado de Gagliardi A, *et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors*, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) bajo los términos de la licencia *Creative Commons Attribution licence (CC-BY)*.

Los polimetacrilatos se idearon como recubrimientos entéricos de especialidades medicinales con propiedades superadoras a los materiales que se utilizaban hasta ese momento, azúcar y resinas. Comenzaron a comercializarse bajo la marca Eudragit<sup>®</sup>, que se mantiene hoy con más de 25 derivados de polimetacrilatos diferentes. En particular,

el Eudragit® NE30D (**Figura 1.15**) es de interés por ser un polímero neutro, biodegradable que se presenta como una dispersión acuosa ahorrando un paso previo de disolución del polímero (método que puede resultar trabajoso), y con propiedades de liberación modificada de fármacos (113).



**Figura 1.14.** Estructura química del poloxámer 188. a, c = 80; b = 27.



**Figura 1.15.** Estructura química del Eudragit® NE 30D

## 5. Nanovehículos farmacéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

Las investigaciones previamente mencionadas se han concentrado mayormente en la caracterización estructural de las nanopartículas, sus propiedades fisicoquímicas, interacciones biológicas, toxicológicas y aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, incluyendo sus posibilidades como sistemas de entrega de fármacos (*drug delivery*) en las cercanías del blanco terapéutico. Antes de sumergirnos en las aplicaciones de las nanomedicinas en la enfermedad de Chagas, vale la pena mencionar que la leishmaniasis es la enfermedad causada por tripanosomátidos donde las nanomedicinas han tenido mayor desarrollo. La primera formulación aprobada para uso clínico por autoridades sanitarias fue Ambisome®, una formulación liposomal cargada con anfotericina B, pensada inicialmente para enfermedades fúngicas, especialmente de los pulmones, pero reposicionada para el tratamiento de la leishmaniasis.

Gran cantidad de nanopartículas han sido diseñadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, incluidas aquellas de tipo polimérico. Por ejemplo, se han ensayado nanopartículas de polietilenoacrilato (PECA) encapsulando NFX que lograron una reducción de la  $EC_{50}$  en epimastigotes de  $0,0015 \pm 0,0006 \mu\text{g/mL}$  comparado con  $0,683 \pm 0,269 \mu\text{g/mL}$  en el caso de NFX libre (en solución) (114), o también nanopartículas de PECA encapsulando alopurinol, con una reducción en la proliferación de epimastigotes de 91,5% frente a 45,9% del fármaco libre a una concentración de  $16,7 \mu\text{g/mL}$ . Este último caso es interesante porque se reportó, además, que el vehículo vacío ensayado tenía actividad frente a los epimastigotes (115). Otro sistema reportado consiste en BNZ encapsulado en nanopartículas de carbonato de calcio obteniendo una reducción en la viabilidad del parásito con una cantidad 25 veces menor en una solución de nanopartículas frente al fármaco en solución (116). Un tipo formulación que ha resultado muy interesante en los últimos tiempos es la de nanocristales, por su amplia versatilidad en la elección de la vía de administración y por su fácil manufactura (117). Scalise y colaboradores probaron su formulación de nanocristales de BNZ en un modelo agudo tratando durante 30 días con 50, 25 y 10 mg/kg/día observando que los animales tratados con las dosis de 50 y 25 mg/kg/día presentaron una supervivencia del 100 % frente a una del 75 % para los animales tratados con la dosis de 10 mg/kg/día (118). Además, evaluaron la eficacia de los nanocristales de BNZ en ratones cursando una fase crónica que presentaron una reactivación de la parasitemia luego de ser inmunosuprimidos. Una dosis de 25 mg/kg/día durante 90 días mostró una reducción del 50% de ratones con anticuerpos anti *T. cruzi*, mientras que los ratones tratados con BNZ libre o sin tratar no mostraron diferencias (119). Un punto aparte merece los sistemas lipídicos, que han obtenido resultados dispares. En esta segunda categoría podrían incluirse a las formulaciones liposomales encapsulando BNZ a partir de liposomas hechos con fosfatidilcolina derivada de soja o archeolípidos de archeobacterias, que no consiguieron un efecto superador sobre la parasitemia en comparación con el fármaco libre, en un modelo murino de infección aguda (120). Hacia el 2017 se publicaron los resultados de lo obtenido a partir del consorcio BERENICE (*BE*nznidazol *and* *triazol RE*search group for Nanomedicine and Innovation on Chagas disease, por sus siglas en inglés, investigación en innovación y nanomedicinas para la enfermedad de Chagas) establecido para la investigación de nanopartículas sólidas lipídicas, ciclodextrinas, liposomas y quatsomas contra el Chagas (121). Estos sistemas tampoco aportaron

mejoras significativas frente a la administración del fármaco libre en términos de disminución en la parasitemia, excepto en el caso de las ciclodextrinas cuya toxicidad no permitió el avance de la formulación hacia etapas posteriores de desarrollo. No todo fueron derrotas para las nanomedicinas lipídicas del BNZ, ya que Streck y colaboradores formularon al fármaco como nanoemulsión a partir de triglicéridos de cadena mediana mejorando la solubilidad aparente y la eficacia frente a formas motiles del parásito (122). Por otra parte, algunos fármacos no aprobados por los organismos regulatorios para el tratamiento del Chagas también han sido candidatos para ser formulados como nanopartículas lipídicas, tales como los ejemplos de liposomas sensibles al pH encapsulando el nitroimidazol, etanidazol (123), o las SLN con un complejo de benzilditiocarbazato cuyos resultados fueron superiores *in vitro* e *in vivo* frente al fármaco libre (124). Otros casos incluyen al ya mencionado ravuconazol en sistemas auto-emulsionantes (125), el imiquimod y la hipericina en liposomas (126,127), la violaceína en nanopartículas sólidas lipídicas, y el interesante caso de la actinomicina D cargada en estructuras dodecaédricas compuestas a partir de una saponina (128). Esta estructura funcionalizada con un anticuerpo anti-*T. cruzi* es, a nuestro conocimiento, la primera clase de nanopartícula diseñada con un direccionamiento activo a los parásito.

Considerando lo expuesto anteriormente, el presente trabajo de tesis se basó en la hipótesis de que las formulaciones de nanovehículos farmacéuticos pueden modificar la velocidad de disolución y la permeabilidad del BNZ aumentando la biodisponibilidad del fármaco. Al mismo tiempo, se hipotetizó que el BNZ nanoencapsulado vería modificada su biodistribución, su eliminación sistémica y su perfil de seguridad, permitiendo una mayor adhesión de los pacientes al tratamiento.

## Referencias

1. Aufderheide A, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101(7):2034-9. DOI: 10.1073/pnas.0307312101.
2. Araujo-Jorge T. History of the discovery of the American Trypanosomiasis (Chagas disease). Elsevier. 2017; p. 1-22.
3. Chagas C. Über eine neue trypanosomiasis des menschen. *Archiv für schiffs- und tropenhygiene.* Leipzig. 1909; p. 351- 353.
4. Lidani K, Andrade F, Bavia L, Damasceno F, Beltrame M, Messias-Reason I, *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front Public Health.* 2019;7. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00166.
5. Chagas C Filho. Meu pai. Fundação Oswaldo Cruz. Universidad de Texas. 1993; p.293.
6. Lewinsohn R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). *J R Soc Med.*1981;74(6):451-5. PMID: 6788953.
7. Zabala J. La enfermedad de Chagas en la Argentina: investigación científica, problemas sociales y políticas sanitarias. Universidad Nacional de Quilmes Editorial. 2010; p. 13-171.
8. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241502870>. [Último acceso Abril 2024].
9. World Health Organization. Neglected tropical diseases. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>. [Último acceso Abril 2024].
10. Altech J, Freilij H. Chagas Disease: a clinical approach. Springer. 2019; p. 91-142.
11. Irish A, Whitman J, Clark E, Marcus R, Bern C. Updated estimates and mapping for prevalence of Chagas disease among adults. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(7):1313-20. DOI: 10.3201/eid2807.212221.
12. Gascon J, Bern C, Pinazo M. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):22-7. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019.
13. Dumonteil E, Bottazzi M, Zhan B, Heffernan M, Jones K, Valenzuela J, *et al.* Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(9):1043-55. DOI: 10.1586/erv.12.85.
14. Segura E. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América: Historia de una iniciativa internacional. 2002. Disponible en: <https://www3.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-historia-incosur.htm>. [Último acceso Abril 2024].

15. Sengenito L, Branquinha M, Santos A. Funding for Chagas disease: A 10-year (2009–2018) survey. *Trop Med Infect Dis.* 2020;5(2):88. DOI: 10.3390/tropicalmed5020088.
16. ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica 2012. Disposición 5855-12. Disponible en: [https://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/octubre\\_2012/Dispo\\_5855-12.pdf](https://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2012/Dispo_5855-12.pdf). [Último acceso Junio 2024].
17. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Releve Epidemiol Hebd.* 2015;90(6):33-43.
18. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas - OPS/OMS. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>. [Último acceso Abril 2024].
19. Boletín Epidemiológico Nacional. Dirección de Epidemiología; 2022. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-epidemiologico-nacional-n-616-se-34-2022>. [Último acceso Abril 2024].
20. Mundo Sano. Chagas, una enfermedad desatendida en Argentina: por año nacen 1.200 bebés y muchos no reciben tratamiento. Disponible en: [www.mundosano.org/es/chagas-una-enfermedad-desatendida-en-argentina-por-ano-nace-n-1-200-bebes-y-muchos-no-reciben-tratamiento/](http://www.mundosano.org/es/chagas-una-enfermedad-desatendida-en-argentina-por-ano-nace-n-1-200-bebes-y-muchos-no-reciben-tratamiento/). [Último acceso Junio 2024].
21. Schwartz B, Paster M, Ison M, Chin-Hong P. Organ donor screening practices for *Trypanosoma cruzi* infection among US Organ Procurement Organizations. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011;11(4):848-51. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03436.x.
22. Sociedad Argentina de Pediatría. Urbanización de la enfermedad de Chagas. Disponible en: [www.sap.org.ar > general > files\\_chagas-19-06-18\\_1577061222/](http://www.sap.org.ar/general/files_chagas-19-06-18_1577061222/). [Último acceso Junio 2024].
23. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):363-8. DOI: 10.1590/0074-02760140405.
24. Mundo Sano. Ningún bebé con Chagas. Disponible en: <https://ningunbebeconchagas.com/>. [Último acceso Abril 2024].
25. Resolución Ministerial 1337/14. Enfermedades infecciosas. Chagas. Atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*. Guía para el equipo de salud. Disponible en: [www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-1337-2014-233808](http://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-1337-2014-233808) [Último acceso Abril 2024].
26. Nóbrega A, Garcia M, Tatto E, Obara M, Costa E, Sobel J, *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):653-5. DOI: 10.3201/eid1504.081450.
27. Jackson A, Otto T, Aslett M, Armstrong S, Bringaud F, Schlacht A, *et al.* Kinetoplastid phylogenomics reveals the evolutionary innovations associated with the origins of parasitism. *Curr Biol.* 2016;26(2):161-72. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.055.

28. Cavalcanti D, de Souza W. The kinetoplast of trypanosomatids: from early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. *Scanning*. 2018;2018:e9603051. DOI: 10.1155/2018/9603051.
29. Lukeš J, Lys Guilbride D, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund P. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. 2002;1(4):495-502. DOI: 10.1128/EC.1.4.495-502.2002.
30. Vianna Martins A, Patrícia Gomes A, de Mendonça E, Rangel Fietto J, Alberto Santana L, de Almeida Oliveira M, *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 2012;16(1):45-58. DOI: 10.1016/S0123-9392(12)70057-7.
31. Andrews N. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol*. 1995;5(3):133-7. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)88965-5.
32. Woolsey A, Sunwoo L, Petersen C, Brachmann S, Cantley L, Burleigh B. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci*. 2003;116(17):3611-22. DOI: 10.1242/jcs.00666.
33. Romano P, Arboit M, Vázquez C, Colombo M. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy*. 2009;5(1):6-18. DOI: 10.4161/auto.5.1.7160.
34. Rodríguez A, Samoff E, Rioult M, Chung A, Andrews N. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol*. 1996;134(2):349-62. DOI: 10.1083/jcb.134.2.349.
35. Fernandes M, Cortez M, Flannery A, Tam C, Mortara R, Andrews N. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med*. 2011;208(5):909-21. DOI: 10.1084/jem.20102518.
36. Andrews N. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol Res*. 1993;26(1-2):65-7. PMID: 7670547.
37. Tyler K, Engman D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31(5):472-81. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.
38. Ley V, Andrews N, Robbins E, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*. 1988;168(2):649-59. DOI: 10.1084/jem.168.2.649.
39. Ferreira E, Bonfim-Melo A, Mortara R, Bahia D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. *Front Immunol*. 2012;3:363. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00363.
40. Martín-Escolano J, Marín C, Rosales M, Tsaousis A, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: intervention points for an effective treatment. *ACS Infect Dis*. 2022;8(6):1107-15. DOI: 10.1021/acsinfecdis.2c00123.
41. Brener Z, Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1963; 5:220-4. PMID: 14110094.

42. Abegg C, Abreu A, Silva J, Araújo S, Gomes M, Ferreira É, *et al.* Polymorphisms of blood forms and *in vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Exp Parasitol.* 2017;176:8-15. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.02.013.
43. Kurup S, Tarleton R. The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Host Microbe.* 2014;16(4):439-49. DOI: 10.1016/j.chom.2014.09.003.
44. Sánchez-Valdéz F, Padilla A, Wang W, Orr D, Tarleton R. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *eLife.* 2018;7:e34039. DOI: 10.7554/eLife.34039.
45. Higuera S, Guhl F, Ramírez J. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):112. DOI: 10.1186/1756-3305-6-112.
46. Martínez S, Nardella G, Rodríguez M, Rivero C, Agüero F, Romano P. Biological features of TcM: A new *Trypanosoma cruzi* isolate from Argentina classified into TcV lineage. *Curr Res Microb Sci.* 2022;3:100152. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100152.
47. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore D, Chiodini P. Diagnosis and clinical management of Chagas disease: an increasing challenge in non-endemic areas. *Res Rep Trop Med.* 2022; 13:25-40. DOI: 10.2147/RRTM.S278135.
48. de Castro Neto A, da Silveira J, Mortara R. Comparative analysis of virulence mechanisms of trypanosomatids pathogenic to humans. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:669079. DOI: 10.3389/fcimb.2021.669079.
49. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(2):92-100. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2.
50. Nielebock M, Moreira O, Xavier S, Miranda L, de Lima A, Pereira T, *et al.* Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *PLoS ONE.* 2020;15(12):e0243008. DOI: 10.1371/journal.pone.0243008.
51. Moseley V, Miller H. South american trypanosomiasis (Chagas disease). *Arch Intern Med.* 1945;76(4):219-29. DOI: 10.1001/archinte.1945.00210340033005.
52. Ledezma A, Blandon R, Schijman A, *et al.* Mixed infections by different *Trypanosoma cruzi* discrete typing units among Chagas disease patients in an endemic community in Panama. *PLoS One.* 2021 ;16(4):e0250184. DOI: 10.1371/journal.pone.0250184.
53. Abolis N, Araújo S, Toledo M, Fernandez M, Gomes M. *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.* 2011;120(3):167-172. DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.08.001.
54. Peña-Callejas G, González J, Jiménez-Cortés J, Fuentes-Vicente J, Salazar-Schettino P, Bucio-Torres M, *et al.* Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Rev Espec En Cienc Quím-Biológicas;* 2022;25(0). DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2022.449.
55. Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Panam Salud Pública.*

2020;44(e28). Disponible en: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.28>. [Último acceso Abril 2024].

**56.** Crespillo-Andújar C, Venanzi-Rullo E, López-Vélez R, Monge-Maillo B, Norman F, López-Polín A, *et al.* Safety profile of benznidazole in the treatment of chronic chagas disease: experience of a referral centre and systematic literature review with meta-analysis. *Drug Saf.* 2018;41(11):1035-48. DOI: 10.1007/s40264-018-0696-5.

**57.** Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Norman F, Monge-Maillo B, López-Vélez R, Pérez-Molina J. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(12):1344. e1-1344.e4. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.06.006.

**58.** Franco J, Scarone L, Comini M. Drugs and drug resistance in african and american trypanosomiasis. *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* Academic Press. 2018; p. 97-133.

**59.** Food and Drug Administration; 2020. FDA approves first U.S. treatment for Chagas disease. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-us-treatment-chagas-disease>. [Último acceso Abril 2024].

**60.** Food and Drug Administration; 2021. Lampit® Nifurtimox. Disponible en: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/213464s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/213464s000lbl.pdf). [Último acceso Junio 2024].

**61.** Vermelho A, Rodrigues G, Supuran C. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery? *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15(2):145-58. DOI: 10.1080/17460441.2020.1681394.

**62.** Lascano F, García Bournissen F, Altcheh J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2022;88(2):383-402. DOI: 10.1111/bcp.14700.

**63.** Martín-Escolano J, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. Chagas disease: current view of an ancient and global chemotherapy challenge. *ACS Infect Dis.* 2020;6(11):2830-43. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00353.

**64.** Mansoldo F, Carta F, Angeli A, Cardoso V, Supuran C, Vermelho A. Chagas disease: perspectives on the past and present and challenges in drug discovery. *Molecules.* 2020;25(22):5483. DOI: 10.3390/molecules25225483.

**65.** Rassi A, Marin JA, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(3):224-35. DOI: 10.1590/0074-02760160334.

**66.** Crespillo-Andújar C, Comeche B, Hamer D, Arevalo-Rodriguez I, Alvarez-Díaz N, Zamora J, *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(5):e0010386. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010386.

**67.** Campos M, Leon L, Taylor M, Kelly J. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;193(1):17-9. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.01.002.

68. Campos M, Castro-Pinto D, Ribeiro G, Berredo-Pinho M, Gomes L, da Silva Bellieny M, *et al.* P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitol Res.* 2013;112(6):2341-51. DOI: 10.1007/s00436-013-3398-z.
69. Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison J. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-420. DOI:10.1023/a:1016212804288.
70. Ferraz L, Alves A, Nascimento D, Amariz I, Ferreira A, Costa S, Rolim L, Lima Á, Rolim Neto P. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on benzimidazole. *Acta Trop.* 2018;185:127-132. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.02.008.
71. da-Revert A, Gonzalez-Alvarez M, Navarro-Ruiz A, Amidon G, Bermejo M. Biopharmaceutical optimization in neglected diseases for paediatric patients by applying the provisional paediatric biopharmaceutical classification system. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(10):2231-2241. DOI: 10.1111/bcp.13650.
72. Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature.* 2010;465(7301):S12-5. DOI: 10.1038/nature09224.
73. Drugs for Neglected Diseases initiative. Screening Chagas disease. 2017. Disponible en: <https://dndi.org/research-development/portfolio/screening-chagas/>. [Último acceso Abril 2024].
74. Nwaka S, Besson D, Ramirez B, Maes L, Matheussen A, Bickle Q, *et al.* Integrated dataset of screening hits against multiple neglected disease pathogens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1412. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001412.
75. Katsuno K, Burrows J, Duncan K, van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(11):751-8. DOI: 10.1038/nrd4683.
76. Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 2015;20(1):22-35. DOI: 10.1177/1087057114550585.
77. Chatelain E, Ioset J. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(2):141-53. DOI: 10.1080/17460441.2018.1417380.
78. Scannell J, Bosley J, Hickman J, Dawson G, Truebel H, Ferreira G, Richards D, Treherne J. Predictive validity in drug discovery: what it is, why it matters and how to improve it. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(12):915-931. DOI: 10.1038/s41573-022-00552-x.
79. Drugs for Neglected Diseases initiative. Fexinidazole for Chagas. 2012. Disponible en: <https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-chagas/>. [Último acceso Abril 2024].
80. Drugs for Neglected Diseases initiative. DNDI-6148 Chagas disease. 2019. Disponible en: <https://dndi.org/research-development/portfolio/dndi-6148-chagas/>. [Último acceso Abril 2024].

81. Fernandes F, Alvarez Ramires F, Ianni B, Cury Salemi V, Oliveira A, *et al.* Effect of colchicine on myocardial injury induced by *Trypanosoma cruzi* in experimental chagas disease. *J. Card. Fail.* 2012; 18(8):654-659. DOI: 10.1016/j.cardfail.2012.06.419.
82. Souza A, Jelicks L, Tanowitz H, Olivieri B, Medeiros M, Oliveira G, *et al.* The benefits of using selenium in the treatment of Chagas disease: prevention of right ventricle chamber dilatation and reversion of *Trypanosoma cruzi*-induced acute and chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:746-51. DOI: 10.1590/S0074-02762010000600003.
83. National Nanotechnology Initiative. About Nanotechnology. Disponible en: nano.gov. [Último acceso Abril 2024].
84. Asha A, Narain R. *Polymer Science and Nanotechnology.* Elsevier; 2020. p. 343-59.
85. Oh N, Park J. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(sup1):51-63. DOI: 10.2147/IJN.S26592.
86. Jain K. *The Handbook of Nanomedicine.* New York: Springer; 2017. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6966-1>. [Último acceso Abril 2024].
87. European Science Foundation. Forward looks. Disponible en: <http://archives.esf.org/publications/forward-looks.html>. [Último acceso Abril 2024].
88. Domingues C, Santos A, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Jarak I, Veiga F, *et al.* Where is nano today and where is it headed? A review of nanomedicine and the dilemma of nanotoxicology. *ACS Nano.* 2022;16(7):9994-10041. DOI: 10.1021/acsnano.2c00128.
89. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomed.* 2019;14(1):93-126. DOI: 10.2217/nnm-2018-0120.
90. Astruc D. Introduction to nanomedicine. *Molecules.* 2015;21(1):4. DOI: 10.3390/molecules21010004.
91. Müller R, Radtke M, Wissing S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54 Suppl 1:S131-S155. DOI:10.1016/s0169-409x(02)00118-7.
92. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(2-3):165-196. DOI:10.1016/s0169-409x(01)00105-3.
93. Müller R, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):161-177. DOI:10.1016/s0939-6411(00)00087-4.
94. Rohan, S. *Lipid nanoparticles: production, characterization and stability.* Ed. Springer. 2015; pp 75–97.
95. Dolai J, Mandal K, Jana NR. Nanoparticle size effects in biomedical applications. *ACS Appl Nano Mater.* 2021;4(7):6471-96. DOI:10.1021/acsnm.1c00987.
96. Bertrand N, Leroux JC. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *J Controlled Release.* 2012;161(2):152-63. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.098.

97. Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2545-2561. DOI:10.1039/c2cs15327k.
98. Dizaj S, Vazifehasl Z, Salatin S, Adibkia K, Javadzadeh Y. Nanosizing of drugs: effect on dissolution rate. *Res Pharm Sci*. 2015;10(2):95-108. PMID: 26487886.
99. Nishino M, Matsuzaki I, Musangile FY, Takahashi Y, Iwahashi Y, Warigaya K, Kinoshita Y, Kojima F, Murata SI. Measurement and visualization of cell membrane surface charge in fixed cultured cells related with cell morphology. *PLoS One*. 2020; 15(7): e0236373. DOI: 10.1371/journal.pone.0236373.
100. Slowing I, Trewyn B, Lin V. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(46):14792-14793. DOI:10.1021/ja0645943.
101. Hühn D, Kantner K, Geidel C, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano*. 2013; 7(4):3253-3263. DOI:10.1021/nm3059295.
102. Albanese A, Tang P, Chan W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14:1-16. DOI:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.
103. Fleischer C, Payne C. Nanoparticle–cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc Chem Res*. 2014; 47(8):2651-9. DOI:
104. Mishra R, Ahmad A, Vyawahare A, Alam P, Khan T, Khan R. Biological effects of formation of protein corona onto nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2021;175:1-18. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.152.
105. Mukherjee S, Ray S, Thakur R. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(4):349-58. DOI: 10.4103/0250-474X.57282.
106. do Prado A, Araújo V, Eloy J. *et al.* Synthesis and characterization of nanostructured lipid nanocarriers for enhanced sun protection factor of octyl p-methoxycinnamate. *AAPS PharmSciTech* 2020;21; 125. DOI: 10.1208/s12249-019-1547-0.
107. Final report on the safety assessment of myristyl myristate and isopropyl myristate. *J Am Coll Toxicol*. 1982;1(4):55-80. DOI:10.3109/10915818209021261.
108. Barbosa R, Silva C, Bella T, Araújo D, Marcato P, Durán N, *et al.* Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. *J Phys Conf Ser*. 2013;429(1):012035. DOI: 10.1088/1742-6596/429/1/012035.
109. Islan G, Tornello P, Abraham G, Duran N, Castro G. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;143:168-76. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.040.
110. Cacicedo M, Ruiz M, Scioli-Montoto S, Ruiz M, Fernández M, Torres-Sanchez R, *et al.* Lipid nanoparticles – Metvan: revealing a novel way to deliver a vanadium compound to bone cancer cells. *New J Chem*. 2019;43(45):17726-34. DOI: 10.1039/C9NJ01634A.

- 111.** Saravanan M, Mostafavi E, Vincent S, Negash H, Andavar R, Perumal V, *et al.* Nanotechnology-based approaches for emerging and re-emerging viruses: Special emphasis on COVID-19. *Microb Pathog.* 2021;156:104908. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104908.
- 112.** Patra C, Priya R, Swain S, Kumar Jena G, Panigrahi KC, Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit®: A review. *Future J Pharm Sci.* 2017;3(1):33-45. DOI: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.
- 113.** Amrutkar P, Chaudhari P, Patil S. Design and *in vitro* evaluation of multiparticulate floating drug delivery system of zolpidem tartarate. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;89:182-7. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.011.
- 114.** Gonzalez-Martin G, Merino I, Rodriguez-Cabezas M, Torres M, Nuñez R, Osuna A. Characterization and trypanocidal activity of nifurtimox-containing and empty nanoparticles of polyethylcyanoacrylates. *J Pharm Pharmacol.* 1998;50(1):29-35. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1998.tb03301.x.
- 115.** González-Martín G, Figueroa C, Merino I, Osuna A. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomatropic carrier: preparation and trypanocidal activity. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2000;49(2):137-42. DOI: 10.1016/s0939-6411(99)00076-4.
- 116.** Tessarolo L, de Menezes R, Mello C, Lima D, Magalhães E, Bezerra E, *et al.* Nanoencapsulation of benznidazole in calcium carbonate increases its selectivity to *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 2018;145(9):1191-8. DOI: 10.1017/S0031182018000197.
- 117.** Raghava Srivalli K, Mishra B. Drug nanocrystals: A way toward scale-up. *Saudi Pharm J SPJ.* 2016;24(4):386-404. DOI: 10.1016/j.jsps.2014.04.007.
- 118.** Scalise M, Arrúa E, Rial M, Esteva M, Salomon C, Fichera L. Promising efficacy of benznidazole nanoparticles in acute *Trypanosoma cruzi* murine model: *in-vitro* and *in-vivo* studies. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(2):388-93. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0889.
- 119.** Rial M, Scalise M, Arrúa E, Esteva M, Salomon C, Fichera L. Elucidating the impact of low doses of nano-formulated benznidazole in acute experimental Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006119. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006119.
- 120.** Morilla M, Montanari J, Prieto M, Lopez M, Petray P, Romero E. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *Int J Pharm.* 2004;278(2):311-8. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.03.025.
- 121.** Vinuesa T, Herráez R, Oliver L, Elizondo E, Acarregui A, Esquisabel A, *et al.* Benznidazole nanoformulates: a chance to improve therapeutics for chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1469-76. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0044.
- 122.** Streck L, Sarmiento V, de Menezes R, Fernandes-Pedrosa M, Martins A, da Silva-Júnior A. Tailoring microstructural, drug release properties, and antichagasic efficacy of biocompatible oil-in-water benznidazol-loaded nanoemulsions. *Int J Pharm.* 2019;555:36-48. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.041.
- 123.** Morilla M, Montanari J, Frank F, Malchiodi E, Corral R, Petray P, *et al.* Etanidazole in pH-sensitive liposomes: Design, characterization and *in vitro/in vivo*

anti-*Trypanosoma cruzi* activity. J Controlled Release. 2005;103(3):599-607. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.12.012.

**124.**Carneiro Z, Maia P, Sesti-Costa R, Lopes C, Pereira T, Milanezi C, da Silva M, Lopez R, Silva J, Defflon V. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of H2bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5):e2847. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002847.

**125.**Spósito P, Mazzeti A, de Oliveira Faria C, Urbina J Pound-Lana G, Bahia M, Mosqueira V. Ravuconazole self-emulsifying delivery system: *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and *in vivo* toxicity. Int J Nanomedicine. 2017;12:3785-3799. DOI: 10.2147/IJN.S133708.

**126.**Parra F, Frank F, Alliani B, Romero E, Petray P. Imiquimod-loaded nanoarchaeosomes as a promising immunotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020;(18)9110850. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110850.

**127.**de Moraes F, Enumo A, Gonçalves R, Cesar G, Miranda N, Vilsinski B, *et al.* Hypericin photodynamic activity. Part III: *in vitro* evaluation in different nanocarriers against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Photochem Photobiol Sci. 2019;18(2):487-94. DOI: 10.1039/c8pp00444g.

**128.**Cruz-Bustos T, González-González G, Morales-Sanfrutos J, Megía-Fernández A, Santoyo-González F, Osuna A. Functionalization of immunostimulating complexes (ISCOMs) with lipid vinyl sulfones and their application in immunological techniques and therapy. Int J Nanomedicine. 2012; 7:5941-56. DOI: 10.2147/IJN.S35556.

# Objetivos

## *Objetivo general*

Desarrollar nanovehículos farmacéuticos como alternativas terapéuticas superadoras para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, optimizando la biodistribución, eficacia y seguridad de uno de los fármacos antichagásicos actualmente disponibles.

## *Objetivos específicos*

Obtención y caracterización fisicoquímica de nanopartículas sólidas lipídicas nanoestructuradas y de nanopartículas poliméricas que sirvan como nanovehículos farmacéuticos de BNZ, fármaco de primera línea en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Estudio de la cinética de liberación de BNZ desde las nanopartículas desarrolladas y estudio de la toxicidad selectiva de los nanosistemas en células de mamífero.

Estudio de la permeabilidad de las nanopartículas a través de una monocapa de células Caco-2.

Evaluación de la eficacia de las nanopartículas en modelos celulares (tripomastigotes y cultivos celulares de amastigotes de *T. cruzi*) y murinos (modelo de infección aguda) de la enfermedad de Chagas.



## CAPÍTULO 2

### ***ESPECIFICACIONES REFERENTES A LOS MATERIALES Y METODOLOGÍAS EMPLEADAS EN LOS EXPERIMENTOS***

## Capítulo 2

### *Especificaciones referentes a los materiales y metodologías empleadas en los experimentos*

#### **Materiales y métodos**

##### 1. Materiales

El BNZ (Lot #MKCD5602, pureza  $\geq 97\%$ ), el Kolliphor®P188 (poloxamer 188 o P188), y el medio de cultivo RPMI-1640 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El miristil miristato (Crodamol™ MM o MM, rango de fusión 36–40 °C), y Crodamol™ GTCC-LQ (mezcla de triglicéridos saturados con punto de fusión -5 °C) fueron donados por Croda, Argentina. El Eudragit NE-30D (EU) (poli(etilacrilato-metilmacrilato)) es un copolímero de ácido metacrílico y metacrilato de metilo disperso en una solución acuosa con 30% de nonoxynol ( $\alpha$ -(4-nonilfenil)  $\omega$ hidroxipoli-(oxi-1, 2-etanedil)). Tiene una temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) de -8°C y fue obtenido de Evonik Industries (Alemania). El FBS fue adquirido a través de Internegocios, SA (Argentina), y el medio de cultivo DMEM fue adquirido a Gibco (EE. UU.). Todos los reactivos utilizados en la preparación y análisis de las formulaciones fueron de grado HPLC/analítico, y fueron obtenidos de fuentes comerciales.

##### 2. Formulación de NLC-BNZ y EU-BNZ

Los nanovehículos lipídicos y poliméricos cargados con BNZ (NLC-BNZ y EU-BNZ) y las nanopartículas vacías (NLC-VEHÍCULO y EU-VEHÍCULO) se obtuvieron por el método de ultrasonicación (1). Para la obtención de NLC-BNZ, 400 mg de MM (2% p/v) se fundieron en un baño termostatzado a 60-70 °C. 40  $\mu$ L de GTCC-LQ se agregaron a la fase lipídica junto a aproximadamente 10 mg exactos de BNZ. Por otra parte, se preparó una fase acuosa disolviendo 600 mg de P188 (3% p/v) en 20 mL de agua ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EE. UU.), precalentada en baño de María a la misma temperatura que la fase lipídica. Luego de 30 minutos de incubación en el baño, la solución acuosa se vertió sobre la fase lipídica, y se la sometió a ultrasonicación en un sonicador equipado con una punta de titanio de 6 mm (sonicador ultrasónico 130

Watts, Cole- Parmer, EE. UU.) por 20 minutos a 80% de amplitud. Una vez concluida la sonicación, la formulación se enfrió a temperatura ambiente y se midió el volumen final. NLC-VEHÍCULO se sintetizó de igual manera sin el agregado de BNZ.

En el caso de EU-BNZ, el procedimiento fue idéntico excepto por la omisión de la termostatación del polímero en el baño de María. Brevemente, se mezclaron 10 mg de BNZ con 400 µL de Eudragit® NE-30D, y se los incorporó a la fase del surfactante (600 mg de P188 (3% p/v)), para luego ser sometidos a sonicación tal como se describe en el proceso de preparación de las NLC.

En todos los casos se evaluó la dosis-dependencia del BNZ libre y el BNZ encapsulado, mientras que se realizaron controles de vehículo libre a las dosis de lípido/polímero equivalentes a las necesarias para vehiculizar las dosis referidas de BNZ.

Por otro lado, se obtuvieron dispersiones de los componentes lipídicos individuales en 20 mL de agua ultrapura a partir de la sonicación de 400 mg de MM (previamente fundido) o 40 µL de GTCC-LQ. Se preparó una solución de P188 disolviendo 600 mg del surfactante. Se realizaron controles de los componentes individuales a las dosis de lípido/surfactante equivalentes a las necesarias para vehiculizar las dosis referidas de BNZ.

### 3. Determinación de la eficiencia de encapsulación

A fin de calcular la eficiencia de encapsulación (EE, %) se determinó la concentración de BNZ libre. Para ello, 500 µL de cada formulación se colocaron en tubos *Eppendorf* conteniendo filtros de centrifugación *Microcon*® (MWCO=10.000, Merck Millipore, EE. UU.). Se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa conteniendo BNZ libre pasó al fondo del *Eppendorf* a través del filtro de la membrana, y la concentración de BNZ fue estimada mediante HPLC, según se describe en un apartado posterior. Teniendo en cuenta la cantidad inicial de BNZ añadida, se calculó la EE, % a partir de la siguiente ecuación:

$$EE, \% = \frac{M_0 - (C_{fr} \times V_f)}{M_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

donde M<sub>0</sub> es la cantidad inicial de BNZ añadida a la formulación, C<sub>fr</sub> es la concentración del fármaco libre, y V<sub>f</sub> es el volumen final luego del proceso de sonicación.

Además, para NLC-BNZ se calculó la carga teórica del fármaco con la siguiente ecuación:

$$DL, \% = \frac{\text{Masa de fármaco incorporada (mg)}}{\text{Masa de lípido (mg)}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.2}$$

#### 4. Determinación de tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión

Se determinó la distribución de tamaños de partículas y el diámetro hidrodinámico promedio mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) a 25 °C utilizando cubetas de poliestireno de 10 mm de ancho en un equipo *Nano ZS Zetasizer* (Malvern Instruments, Inglaterra). El potencial Z ( $\zeta$ ) se determinó mediante anemometría de Doppler. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se reportó como el parámetro Z-average. Se determinó el índice de polidispersión (PdI) como una estimación de la distribución de los tamaños de las partículas. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 5. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizó el análisis térmico del BNZ, MM, EU, P188, EU-BNZ y NLC-BNZ con un equipo DSC (DSC Q2000, *TA Instruments*, EE. UU.) bajo atmósfera de nitrógeno inerte seca (50 mL/min), usando un contenedor de aluminio con aproximadamente 5 mg exactos de la muestra seca. Las corridas fueron en el rango de 0 a 250 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C/min. El índice de cristalinidad (IC, %) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$IC, \% = \frac{\Delta H_{NLC/EU \text{ dispersion acuosa}}}{\Delta H_{\text{bulk material}} \times \text{Concentración}_{\text{fase lipídica/polimérica}}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.3}$$

donde  $\Delta H_{NLC/EU}$  y  $\Delta H_{\text{bulk material}}$  son las entalpías de fusión (J/g) de la dispersión de NLC o EU y el lípido o polímero puro, respectivamente. La concentración de la fase lipídica o polimérica fue del 2%.

#### 6. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de BNZ, MM, EU, P188, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO se realizó con el aparato TGA Q500 (*TA Instruments*, EE. UU.) Se

pesaron aproximadamente 10 mg exactos en un contenedor de platino. Las medidas se realizaron en el rango de temperatura ambiente hasta 600 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C /min bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación térmica.

#### 7. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier/ Reflectancia total atenuada (ATR/FTIR)

Los espectros se obtuvieron utilizando el equipo Nicolet 6700 (*Thermo Scientific, Inc.*, EE. UU.). El modo de reflectancia total atenuada se utilizó en el registro de los espectros en el rango de 400–4.000  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 8. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de transmisión Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, EE. UU.). Para ello, se colocó una gota (10  $\mu\text{L}$ ) de la dispersión de nanopartículas previamente diluida (1:100) en agua sobre una malla de cobre recubierta de colodión (400 mesh). El exceso de líquido se retiró con papel de filtro. Se adicionó una gota de ácido fosfotúngstico para resaltar el contraste.

#### 9. Análisis estructural de rayos X (SAXS/WAXS)

La medición de la dispersión de rayos X de ángulos bajos/ángulos amplios (SAXS/WAXS) se midió con el equipo XEUSS 2.0 (XENOCSS, Francia). Los patrones fueron registrados con dos detectores sincrónicos de conteo de fotones 2D para SAXS, Pilatus 200K y Pilatus 100k (DECTRIS, Suiza) posicionados a 160 mm de la muestra con un ángulo de inclinación de 36° para WAXS. Las medidas de SAXS se realizaron utilizando dos distancias, 1.194 y 337 mm para NLC y 6.300 y 1.200 mm para EU. La intensidad de dispersión,  $I(q)$ , se registró mediante la transferencia de momento de dispersión  $q$ , donde  $q=4\pi\lambda \sin(\theta)$ ,  $2\theta$  es el ángulo de dispersión y  $\lambda = 0,15419$  nm es el promedio ponderado de la longitud de onda de rayos X de las líneas de emisión de  $\text{Cu-K}_{\alpha 1,2}$ . Debido al tamaño pequeño del haz que incide a la muestra ( $< 1$  mm x 1 mm en NLC y  $< 0,5$  mm para 1.200 mm y  $< 0,25$  mm para 6.300 mm en EU), no se consideraron los efectos de manchado. Las muestras liofilizadas se colocaron bajo vacío con cinta *Kapton*®. Para las muestras líquidas de EU se utilizó capilares de 1,5 mm de

diámetro. Las mediciones se realizaron en modo transmisión. Se tomaron patrones SAXS/WAXS durante 4 horas cada uno para NLC y durante 10 minutos cada uno para EU.

#### 10. Ensayo de liberación de BNZ *in vitro*

La liberación de BNZ desde las nanopartículas se realizó en un disolutor de paleta rotatoria (*Vision Classic 6, Hanson Research*, EE. UU.) con una velocidad de agitación de 75 rpm y un medio de liberación de 500 mL de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8). La temperatura se fijó a  $37,0 \pm 0,5$  °C. Un volumen de 5 mL de formulación fue colocado en una bolsa de diálisis (MWCO: 10 kDa) y adosada a la paleta del equipo (**Figura 2.1**). A fines comparativos, se utilizó la misma cantidad de fármaco libre que la cantidad utilizada para la formulación. Esto se realizó como un control de disolución del fármaco libre en el medio. Se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15 y 30 minutos, y luego a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24 horas. Las muestras se analizaron por HPLC centrifugándolas previamente a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se ajustaron a modelos matemáticos de liberación de fármacos utilizando el complemento de *Excel* “*DDSolver*” desarrollado por Zhang y colaboradores (2). El modelo que mejor ajustó a los datos se eligió en base a los valores de los parámetros de bondad de ajuste ( $R^2$ ,  $R^2$ -adj, EMC, AIC).

$R^2/R^2$ -ajustado o coeficiente de determinación (3) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Donde  $SS_{res}$  es la suma de los cuadrados de los errores de la predicción

$(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2, n \in N)$  y  $SS_{tot}$  es la suma de los cuadrados de las diferencias entre los

valores observados y su media  $(\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2, n \in N)$ .

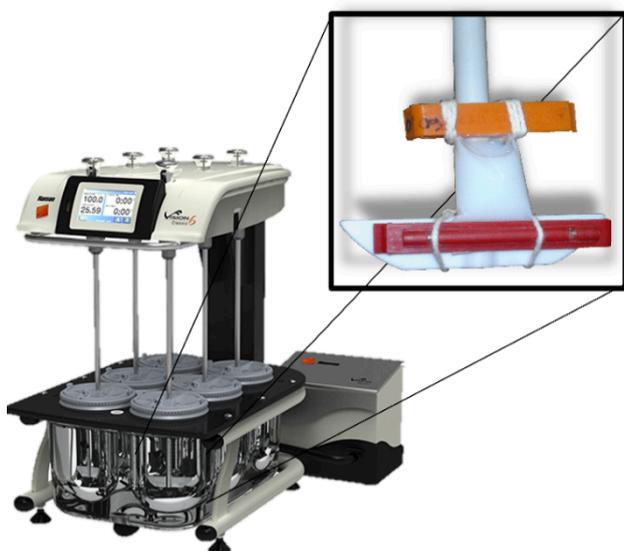
EMC, el error medio cuadrado (3), se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$EMC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Eq. 2.5}$$

Y AIC (4), el criterio de información de Akaike, se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$AIC = 2k - 2\ln(L) \quad \text{Eq. 2.6}$$

Donde k es el número de parámetros del modelo y L es el valor máximo de la función de verosimilitud evaluada en sus parámetros estimados. Finalmente, AIC es un estimador de la calidad relativa de un modelo que se obtiene a partir de la suma de cuadrados de los residuos ( $2\ln(L)$ ) y de un factor que penaliza la inclusión de parámetros ( $2k$ ).



**Figura 2.1.** Imagen de la bolsa de diálisis sujeta a la paleta del disolutor para el ensayo de liberación del fármaco desde las nanopartículas.

## 11. Estudio de estabilidad fisicoquímica

A fin de determinar la estabilidad de cada formulación (almacenada a 4 °C, en viales de vidrio y protegida de la luz), se determinaron el diámetro hidrodinámico promedio, el

PdI, el potencial zeta  $\zeta$  y EE, %. Los parámetros físicos (diámetro de partícula, PdI,  $\zeta$ ) se midieron mediante DLS utilizando el equipo *Nano ZS Zetasizer*, y la EE, % se determinó mediante HPLC. Se realizó una determinación por mes, durante un período de 6 meses para NLC y 4 meses para las nanopartículas de Eudragit®.

## 12. Ensayo de toxicidad celular

Se analizó la citotoxicidad de las formulaciones mediante la determinación de la viabilidad de células de ovario de hámster chino (línea CHO) mediante la reducción de la sal de tetrazolio bromuro (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a un producto de formazán (MTT). Se sembraron  $1 \times 10^5$  células CHO por pocillo en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos con medio RPMI (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, y se dejaron crecer durante la noche en estufa a 37 °C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24 horas, las células se incubaron con concentraciones crecientes de RPMI como control, BNZ, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO (en concentraciones de BNZ de 0, 60, 120, 240 y 480  $\mu$ M, y concentraciones de carriers equivalentes a las necesarias para vehiculizar las dosis referidas de BNZ pero sin el fármaco). Luego, se agregó la sal de tetrazolio (5 mg/mL en PBS) y se incubó durante 3 horas. Por último, se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de DMSO con agitación durante 10 minutos para disolver el MTT. El color se midió en un lector de microplacas (Bio-Rad, modelo 3550, Argentina) a 550 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

Por otro lado, se analizó la viabilidad de las células de adenocarcinoma humano (línea Caco-2) utilizando la metodología mencionada anteriormente (reducción de MTT). Brevemente, 62.500 células se colocaron en pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 2 horas. Luego, se realizó un lavado con PBS del medio de cultivo DMEM y se incubaron con concentraciones crecientes de medio de cultivo como control, BNZ, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO (0, 50 y 100  $\mu$ M para BNZ, y concentraciones de lípidos/polímeros equivalentes para los vehículos sin BNZ) durante 3 horas. Se agregó MTT (5 mg/mL en PBS) durante otras 3 horas, y concluido el tiempo de incubación, se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO por pocillo durante 10 minutos en agitación. El color se midió en un lector de microplacas (Bio-Rad, modelo 3550, Argentina) a 550 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

Por último, se determinó la citotoxicidad en la línea celular Vero. Se obtuvieron suspensiones de células previamente crecidas en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (cantidad inicial =  $5 \times 10^4$  células por pocillo) incubadas durante 72 horas con los controles de medio de cultivo RPMI, RPMI+DMSO (1%), y los tratamientos BNZ, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO (en concentraciones 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de BNZ y concentraciones de lípidos/polímero equivalentes para los vehículos sin BNZ). Se añadió yoduro de propidio (IP) (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma, EE. UU.) a las suspensiones celulares durante 10 minutos antes del análisis para evaluar la falta de viabilidad celular por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCANTO II (EE. UU.). El análisis de datos se realizó utilizando el software *FlowJo*<sup>TM</sup> (LLC, EE. UU.). Se adquirieron un total de 20.000 eventos para cada muestra. El porcentaje de viabilidad celular se calculó en base a la viabilidad del control con medio de cultivo RPMI + DMSO (1%). El ensayo se realizó por duplicado.

### 13. Determinación de efecto hemolítico

La hemólisis se evaluó en un volumen final de 3 mL de mezcla entre una suspensión de sangre humana fresca recién extraída heparinizada, colocada en una placa de cultivo celular de 6 pocillos junto al agregado de diluciones de nanopartículas y/o fármaco libre. Se agregaron alícuotas de diluciones frescas de BNZ, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO (concentraciones finales iguales a 1, 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BNZ y sus respectivos equivalentes para vehículos vacíos) a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Luego, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 2.500 rpm y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Se utilizó Tritón X-100 (10%) y solución salina como controles positivo y negativo, respectivamente. La actividad hemolítica (HA, %) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$HA(\%) = \frac{A_{540\text{ nm}} \text{ muestra} - A_{540\text{ nm}} \text{ ssalina}}{A_{540\text{ nm}} \text{ Tritón X-100} - A_{540\text{ nm}} \text{ ssalina}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.7}$$

Donde  $A_{540\text{ nm}} \text{ muestra}$  representa el valor de absorbancia de la muestra,  $A_{540\text{ nm}} \text{ Tritón X-100}$  el valor de absorbancia del control positivo y  $A_{540\text{ nm}} \text{ solución salina}$  el valor de absorbancia del control negativo. El ensayo se realizó por duplicado.

Se estimó el valor de concentración plasmática a las 3 h luego de administraciones orales múltiples de 2,5mg/kg/12h de BNZ a pacientes parte de un estudio farmacocinético poblacional. Se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos a partir de un estudio de Soy *et al.* en el que se analizaron 358 datos de concentración plasmática en el rango de 0,56 -28,94 mg/L (5).

Este ensayo se realizó en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, UNLP-CONICET La Plata) con la colaboración de la Dra. Rocío Gambaro y la Dra. Gisel Padula. La sangre se obtuvo del Instituto de Hemoterapia de La Plata, como parte de un acuerdo formal entre el IGEVET y esa institución. Además, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la UNLP y se desarrolló de acuerdo con los principios proclamados en la Declaración Universal de Derechos Humanos de 1948, las normas éticas establecidas por el Código de Núremberg de 1947 y la Declaración de Helsinki de 1964 y sus sucesivas enmiendas y aclaraciones. Se prestó especial atención a los Derechos del Paciente en su relación con los profesionales e instituciones de salud y a la Ley Nacional 25.326 sobre Protección de Datos Personales.

#### 14. Obtención de los diferentes estadios de *T. cruzi*

Se utilizó la cepa K98 de *T. cruzi* (Tc I, baja virulencia) para los ensayos *in vitro*. Los tripomastigotes de cultivo celular se obtuvieron a partir del sobrenadante del cultivo de células Vero en botellas de 25 cm<sup>2</sup> luego de una infección con tripomastigotes de 2 a 3 días, mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5%. El cultivo celular fue a 37 °C en un ambiente húmedo con un 5% de CO<sub>2</sub>. Por otra parte, los amastigotes se obtuvieron a partir de la infección de células Vero con tripomastigotes de la cepa K98 incubando el cultivo durante 24 horas con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:2.

#### 15. Efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi*

Se co-cultivó una suspensión de tripomastigotes (1x10<sup>5</sup> tripomastigotes por pocillo) en una microplaca de 96 pocillos junto con alícuotas de concentraciones de BNZ (nanovehiculizado o libre) 1, 2,5, 5 y 10 µM, y concentraciones de lípidos/polímeros equivalentes para los vehículos sin BNZ. Las diluciones se realizaron en medio de cultivo RPMI suplementado con 5% FBS. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera 5%

de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas de incubación estática en estufa, se contaron los parásitos móviles en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico. Los controles negativos consistieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 5% de FBS así como también RPMI con 1% de DMSO.

Los resultados se expresaron como porcentaje promedio de viabilidad de tripomastigotes (%) (con respecto al control RPMI + DMSO 1%) y el error de la medición a través del cálculo del desvío estándar. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado para NLC y triplicado para la formulación de Eudragit<sup>®</sup>. La concentración efectiva 50% (EC<sub>50</sub>) en el ensayo de viabilidad de tripomastigotes *in vitro* se determinó a partir de la curva concentración-respuesta ajustada a través de regresión no lineal en el software *GraphPad Prism* versión 8.0.1 (*GraphPad Software* Inc. EE. UU.).

#### 16. Efecto sobre los amastigotes de *T. cruzi*

Se comenzó infectando un cultivo de células Vero con tripomastigotes de la cepa K98 de *T. cruzi* (parásitos transgénicos con la adición del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP)) utilizando una MOI de 1:2. Después de 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS 1X, se tripsinizaron durante 10 minutos y se sembraron en microplacas de 96 pocillos (5x10<sup>4</sup> células por pocillo). Después de un período de 2-3 horas de incubación estática para que las células se adhirieran a la microplaca, se añadieron alícuotas de BNZ, EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO y NLC-VEHÍCULO (en concentraciones de BNZ de 1, 5, 10, 25 y 50 µM y concentraciones de nanopartículas equivalentes a las necesarias para vehiculizar las dosis referidas de BNZ pero sin el fármaco). Tras 72 horas adicionales de incubación estática a 37°C, las células se recolectaron con una solución de tripsina/EDTA y se procesaron para el análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo BD Biosciences FACSCANTO II (EE. UU.). Se añadió PI (Sigma, EE. UU.) a las suspensiones celulares (50 µg/mL) incubándose durante los 10 minutos previos a la lectura para evaluar la muerte celular, y se comparó con la señal de viabilidad indicada por la fluorescencia aportada por la expresión de GFP (6). Se adquirieron un total de 20.000 eventos para cada muestra. El análisis de datos se realizó utilizando el software *FlowJo*<sup>™</sup> (LLC, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad promedio de amastigotes (%) (con respecto al control RPMI + DMSO 1%) y el error de

la medición a través del cálculo del desvío estándar. Los experimentos se realizaron por triplicado. El valor de  $EC_{50}$  se determinó a partir de la curva concentración-respuesta ajustada a través de regresión no lineal utilizando el software *GraphPad Prism* versión 8.0.1 (*GraphPad Software*, EE. UU.).

#### 17. Ensayo de permeabilidad a través de una monocapa celular

Se utilizó la línea celular Caco-2 para el ensayo de permeabilidad. En primer lugar, las células se obtuvieron del cultivo en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con el medio de cultivo DMEM (*Life Technologies*, Francia) adicionado con 15% FBS, 1% L-glutamina y 1% aminoácidos no esenciales en cultivo estático a 37 °C y una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, durante un máximo de 8 pasajes. Se descartó el sobrenadante de la botella, se lavó tres veces con PBS 1X y se tripsinizó el cultivo durante 10 minutos. La suspensión celular resultante se sembró en placas *Transwell* (Biofil, China) de 12 pocillos con una membrana de poliestireno de 1 µm de tamaño de poro y un área superficial de 1,12 cm<sup>2</sup> a una densidad celular de 60.000 células por pocillo. Se realizó el cambio de medio de cultivo todos los días durante 10 días agregando 0,5 mL de medio de cultivo en la zona apical y 1,5 mL en la zona basolateral. A partir del séptimo día se comenzó a medir la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER, *Trans-epithelial electric resistance* (Ω.cm<sup>2</sup>)) utilizando un voltímetro epitelial (Millicell-ERS, *Millipore Corporation*, EE. UU.) como medida de formación de la monocapa de células confluyente en el *Transwell*.

El día del experimento se cambió el medio de cultivo a los pocillos y se midió nuevamente el TEER obteniendo medidas entre 600 y 1.000 Ω.cm<sup>2</sup>, lo cual fue una señal indicativa del establecimiento de la monocapa de células para proceder con el experimento. Se retiró el medio de cultivo de la zona apical y se colocó una dilución de NLC-BNZ, EU-BNZ y una suspensión de fármaco libre a fin de tener una concentración final de 2 mM en el pocillo. Se retiró un volumen de 400 µL del compartimento basolateral a los tiempos 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos reponiendo el volumen con medio de cultivo DMEM fresco y termostatizado a 37 °C. Las alícuotas obtenidas fueron cuantificadas mediante HPLC y el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{1}{A.Co} \times \left( \frac{dQ}{dt} \right) \quad \text{Eq. 2.8}$$

Donde  $A$  es el área de la membrana del inserto ( $1,12 \text{ cm}^2$ ),  $C_0$  es la concentración inicial en la cámara apical y  $dQ/dt$  es la velocidad inicial de transporte del fármaco, obtenida de la pendiente de la región pseudo-lineal de la curva.

Los resultados se expresaron como el valor promedio del coeficiente de permeabilidad junto a la medida del error expresada a partir del cálculo del desvío estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 18. Evaluación farmacocinética de la formulación

Se utilizaron ratones macho libres de patógenos específicos de la cepa Balb/c de 4-5 semanas con pesos entre 21-29 g provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). El ensayo se adecuó a la guía ARRIVE (7). Para ello, los animales se mantuvieron en condiciones de alimentación y agua *ad libitum*, con no más de 6 ratones por hábitat con un ambiente enriquecido para disminuir el estrés, con regímenes de 12h luz/oscuridad y control de temperatura a 20-22 °C. Fueron adaptados previamente a la administración oral (p.o.) o intraperitoneal (i.p.), según correspondiera, durante cinco días, con solución fisiológica (volumen de 0,1 mL). Tanto la adaptación como el ensayo fue realizada durante la fase de luz por experimentadoras de sexo biológico femenino.

De acuerdo a la vía de administración, se administró p.o. con sonda intragástrica ( $n=2$  para cada tiempo de muestreo) o mediante inyección i.p. con jeringa tuberculina de 1 mL y aguja estéril Terumo® 25G ( $n=1$  para cada tiempo de muestreo). Se administró la formulación NLC-BNZ o una suspensión de fármaco, ambos tratamientos en dosis de 30 mg/kg, preparando el fármaco como una suspensión en solución fisiológica con el agregado de un 20% de DMSO. En el caso de EU-BNZ se realizó una administración p.o. ( $n=2$ ) a una dosis de BNZ de 30 mg/kg. La formulación de nanopartículas se preparó según lo descrito en la sección 2, con modificaciones en la cantidad de lípido o polímero (6% p/v), la cantidad de surfactante (4,5 %p/v), y en el agregado de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para preparar nanopartículas estables cuya carga de BNZ sea compatible con el volumen máximo que es posible administrar a un ratón. Los volúmenes máximos de administración fueron 10 mL/kg. Los tiempos de muestreo fueron 1, 2, 4, 8 y 24 h. La toma de muestra se realizó mediante la extracción de sangre submandibular punzando con una aguja estéril 21Gx1” sobre la vena facial a fin de recolectar entre 100-150  $\mu\text{L}$  de sangre que luego fue centrifugada a 4.000 rpm durante 10 minutos para obtener el

plasma. Se realizó la eutanasia a los ratones una vez finalizado el experimento mediante asfixia con CO<sub>2</sub>.

El cálculo del área bajo la curva (AUC<sub>0-t</sub> y AUC<sub>0-∞</sub>) se realizó a partir del método trapezoidal (8) calculando el área de cada trapezoide a partir de la siguiente ecuación:

$$A = (t_2 - t_1) \left( \frac{Cp_{t1} + Cp_{t2}}{2} \right) \quad \text{Eq. 2.9}$$

Donde A corresponde al área del trapezoide delimitado por los tiempos experimentales t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>, y Cp corresponde al valor de concentración plasmática a un determinado tiempo t. Posteriormente, se realizó la sumatoria de las áreas de los trapezoides (N° de trapezoides = t<sub>experimentales</sub> - 1), y se adicionó el área del triángulo entre t<sub>0</sub> y t<sub>1</sub>, y el área bajo la curva entre el último tiempo experimental y t<sub>∞</sub> (estimado según el modelo farmacocinético monocompartimental como Cp<sub>t</sub>/kel).

El procedimiento se llevó a cabo en el bioterio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB). El protocolo experimental, titulado “Estudio de biodistribución de fármacos” fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata con número de protocolo 004-00-23. El fármaco total en plasma se cuantificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) gracias al servicio de espectroscopía del Centro de Investigaciones de Medio Ambiente (CIM -UNLP-CONICET).

#### 19. Evaluación de la formulación en un modelo agudo *in vivo*

Se utilizaron ratones hembra libres de patógenos específicos de la cepa Balb/c de 3-4 semanas infectadas con 1.000 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa RA (TcVI) a través de una administración i.p. Los ratones fueron provistos por el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM) de la Universidad de Buenos Aires. Se mantuvieron en condiciones *ad libitum* con regímenes de 12 h luz/oscuridad y ambiente climatizado a 20-22 °C habiendo no más de 6 animales por hábitat. Se inició el tratamiento con EU-BNZ, NLC-BNZ, EU-VEHÍCULO, NLC-VEHÍCULO, VEHICULO (del fármaco, solución fisiológica + DMSO 20%) o BNZ a dosis de 10 mg/kg/d y 20 mg/kg/d para BNZ, y 10 mg/kg/d para las

nanopartículas. La suspensión de BNZ 10 mg/kg/d se preparó disolviendo 30 mg de BNZ en 100 µL de DMSO y llevando a un volumen de 30 mL con solución fisiológica en agitación (se procedió de manera proporcional con la suspensión de BNZ 20 mg/kg/d). La formulación de nanopartículas se preparó según lo descrito en la sección 2, con modificaciones a la cantidad de lípido o polímero (6% p/v), a la cantidad de surfactante (4,5 %p/v), y al agregado de 100 µL de DMSO debido al aumento de la cantidad de BNZ para alcanzar en la dosis en ratones.

El tratamiento comenzó a los 5 días post-infección (dpi) (n = 5 para cada grupo de ratones) y tuvo una duración de 5 días, administrando las dosis p.o. mediante cánula intragástrica. Al comienzo y al final de tratamiento se realizó el seguimiento de la infección de manera semi-cuantitativa mediante la obtención de una gota de sangre por punción de la vena caudal lateral y su posterior observación en el microscopio óptico en búsqueda de parásitos, leyendo 20 campos por muestra.

En los días 13, 16, 20, 23, 27, 29, 33 y 37 dpi se realizaron controles de parasitemia y estado general de los ratones. La parasitemia se realizó obteniendo 5 µL de sangre por punción en la vena caudal lateral, tomando la gota de sangre con tips previamente embebidos con heparina y mezclándolos con 45 µL de solución de lisis (Cloruro de Amonio 0,83%). Se incubó la muestra a 37 °C durante 5-10 minutos y se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para el recuento de tripomastigotes bajo el microscopio óptico. Se confeccionaron curvas de Kaplan-Meier para la evaluación de la supervivencia. Se realizó la eutanasia por asfixia con CO<sub>2</sub> una vez finalizado el ensayo. El procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Patogénesis Parasitarias (LIPAP) perteneciente al IMPaM bajo el protocolo titulado "Obtención y evaluación preclínica de nanovehículos farmacéuticos para aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Chagas" aprobado mediante resolución 4081/04.

## 20. Determinación de BNZ por HPLC-UV

La cuantificación de BNZ para la determinación del EE, %, y los estudios de liberación y de permeabilidad a través de monocapa celular se realizó utilizando un equipo de HPLC (*Gilson SAS*, Francia) con detección UV. Se utilizó una columna *Platinum EPS C<sub>8</sub>* (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, *Grace™*, EE. UU.). Para la cuantificación de BNZ en los ensayos de determinación de EE, % y el porcentaje de liberación de fármaco se utilizó una fase móvil metanol: agua ultrapura (60:40) con el agregado de una alícuota de

solución de ácido fosfórico (0,02%) para obtener un pH final de 2,5. Se realizó una modificación a la proporción de solventes para la cuantificación del fármaco en el ensayo de permeabilidad, resultando en metanol: agua ultrapura (30:70) a pH 2,5 para lograr la separación entre las impurezas de la muestra y el fármaco arrastradas por el medio de cultivo. La curva de calibración se realizó con 6 puntos en el intervalo de concentraciones (2,5-50 µg/mL). El sistema se operó isocráticamente a un flujo de 1,0 mL/min, y la detección del fármaco se realizó a 324 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL.

#### 21. Determinación de BNZ por LC-MS/MS

La cuantificación de BNZ desde las muestras de plasma se realizó mediante LC-MS/MS. Las muestras de plasma se mantuvieron en un baño de agua y hielo, y se les agregó un mismo volumen de acetonitrilo frío para que precipiten las proteínas del plasma. Se mezcló durante 10 segundos en vórtex y se dejó reposar durante 15 minutos en el baño frío. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se realizó una dilución con agua/acetonitrilo (1/1), a fin de luego pasar a inserto para la inyección en el equipo de LC-MS/MS.

El equipo utilizado fue un HPLC *Waters Alliance 2695* (EE.UU.) acoplado un espectrómetro de masas de doble cuadrupolo en tándem *Premier XE* (Waters Corp.) con fuente de ionización de electrospray, operado en modo positivo (ESI+). La separación cromatográfica fue realizada empleando una columna *C<sub>18</sub> X-SELECT™* (75 mm × 4,6 mm, 3 mm tamaño del poro. Waters Corp.) empleando un gradiente de metanol y agua ultrapura con ácido fórmico y acetato de amonio como aditivos para la ionización. El espectrómetro de masas fue configurado para operar en modo monitoreo de reacción múltiple (MRM) empleando dos transiciones de masas del compuesto, una de cuantificación y la otra de confirmación. La curva de calibración externa fue realizada con 4 puntos en el intervalo de concentraciones (0,5-50 ng/mL).

#### 22. Validación del método de cuantificación de BNZ

La validación del método analítico de HPLC-UV se realizó a partir de la preparación de 3 soluciones independientes stock de BNZ. Se pesaron exactamente alrededor de 5 mg de BNZ (pureza: >97%) por triplicado. Se colocó la masa de fármaco en un matraz

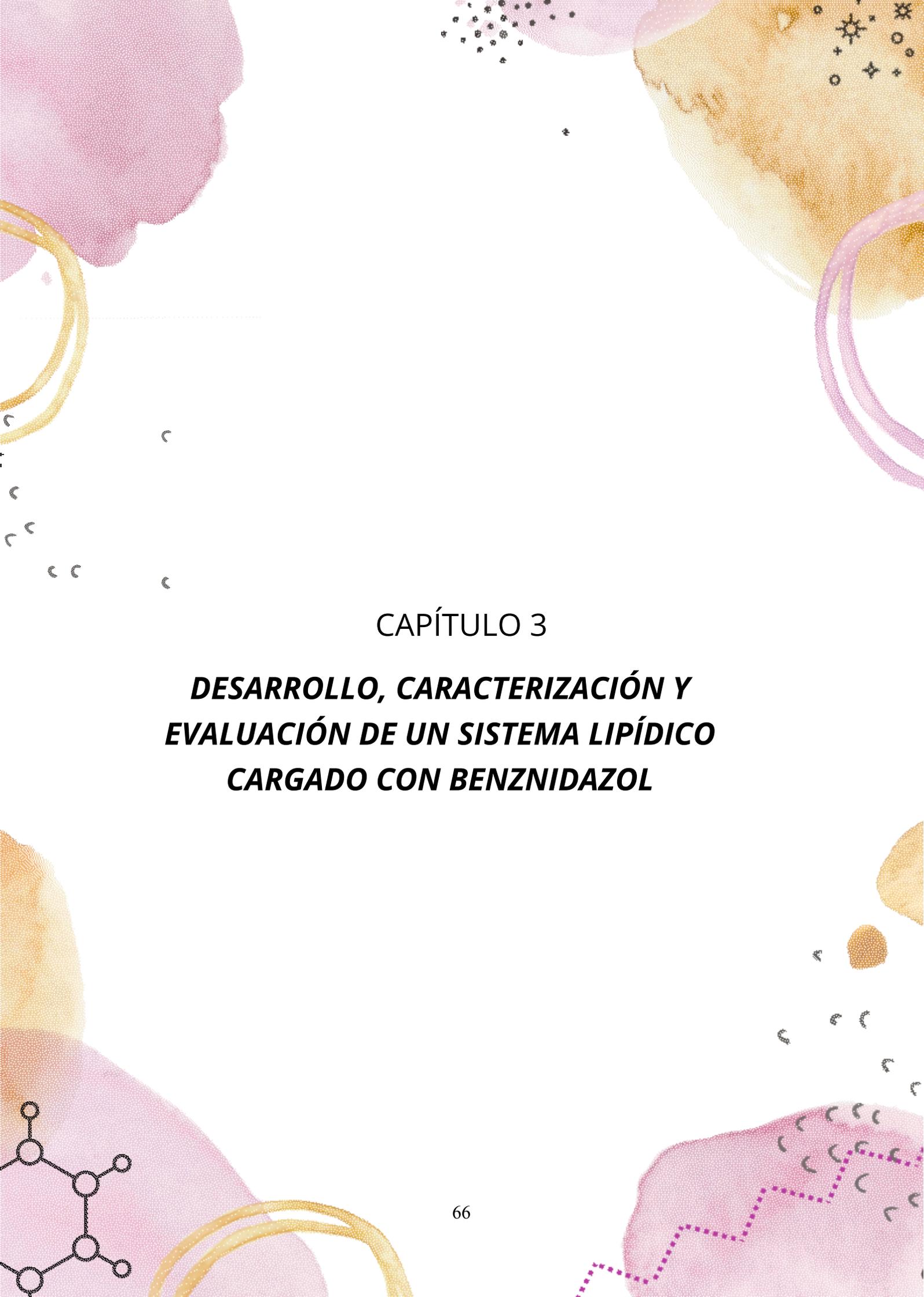
aforado de 50 mL, se agregaron 25 mL de la mezcla metanol:agua (60:40) y se sonicó hasta obtener una solución límpida. Luego, se completó el volumen. A partir de cada una de esas soluciones stock se realizaron diluciones para obtener alícuotas con las siguientes concentraciones: 2,5, 5, 10, 15, 20 y 50 µg/mL. En cuanto al método analítico de LC-MS/MS se realizó 1 solución stock de concentración 10 mM pesando exactamente alrededor de 10 mg de BNZ y disolviéndolo en DMSO. Se realizaron diluciones por duplicado hasta alcanzar concentraciones de 0,5, 1, 10 y 50 ng/mL. Se evaluó la linealidad, el rango y la especificidad de los métodos analíticos empleados.

### 23. Análisis estadístico

La normalidad de la distribución de las variables se evaluó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las comparaciones de las medias se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de comparación múltiple de Tukey o de Dunnet para la comparación contra el control del experimento. Se consideró significancia estadística a  $p < 0,05$ .

## Referencias

1. Islan G, Tornello P, Abraham G, Duran N, Castro G. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016; 143:168-76. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.040.
2. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, *et al.* DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J*. 2010;12(3):263-71. DOI: 10.1208/s12248-010-9185-1.
3. Barrett J. The coefficient of determination-some limitations. *TAS*. 1974;28(1):19-20. DOI:10.1080/00031305.1974.10479056.
4. Akaike H. Selected papers of Hirotugu Akaike. Ed. Springer, 1998; pp 199–213.
5. Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, Posada E, Serret N, Mejía T, Urbina J, Gascón J. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59. DOI: 10.1128/aac.05018-14.
6. Miranda C, Solana M, Curto M, Lammel E, Schijman A, Alba Soto C. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2015; 152:8-16. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.08.004.
7. Animal Research: reporting of *in vivo* experiments (Arrive Guidelines). Disponible en: <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>. [Último acceso Junio 2024].
8. Purves R. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J. Pharmacokinet. Biopharm*. 1992;(20): 211–226. DOI: 10.1007/BF01062525.



CAPÍTULO 3

***DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y  
EVALUACIÓN DE UN SISTEMA LIPÍDICO  
CARGADO CON BENZNIDAZOL***

## Capítulo 3

### *Desarrollo, caracterización y evaluación de un sistema lipídico cargado con benznidazol*

#### Resultados y discusión

##### 1. Validación de los métodos de cuantificación del BNZ

El método de cuantificación por HPLC-UV obtuvo una relación lineal entre la concentración del fármaco y la respuesta obtenida en el rango de concentraciones ensayadas (2,5 – 50 µg/mL), con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9985$ . El análisis de la varianza mostró una relación lineal significativa, con ajuste al modelo lineal ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos se sintetizan en la **Tabla 3.1**.

Por otro lado, la especificidad del método se evaluó mediante la medición del tiempo de retención del BNZ, observando que ningún componente de los medios de cultivo o impureza tuvieron un tiempo similar al del fármaco.

**Tabla 3.1.** Ensayo de linealidad para BNZ por HPLC-UV. Se ensayaron 3 réplicas independientes a 6 concentraciones (n=18). F.V: fuente de variación; SC; suma de cuadrados; gl; grados de libertad; CM: cuadrados medios.

F. V	SC	Gl	CM	F	p-valor
<b>Concentración</b>	<b>2,67E+12</b>	<b>1</b>	<b>2,6E+12</b>	<b>5450,41</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Error	7,86E+09	16	4,91E+08		
<b>Falta de ajuste</b>	<b>4,09E+10</b>	<b>4</b>	<b>1,02E+09</b>	<b>3,25</b>	<b>0,0504</b>
Error puro	3,77E+09	12	3,14E+08		
<b>Total</b>	<b>2,68E+12</b>	<b>17</b>			

Para el método de cuantificación por LC-MS/MS, la relación entre la concentración y la respuesta fue lineal en el rango de concentraciones ensayadas (0,5–50 ng/mL), con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9988$ . El análisis de la varianza mostró una relación lineal significativa, con ajuste al modelo lineal ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2.** Ensayo de linealidad para BNZ por LC-MS/MS. Se ensayaron 2 réplicas a 4 concentraciones (n=8). F.V: fuente de variación; SC; suma de cuadrados; gl; grados de libertad; CM: cuadrados medios.

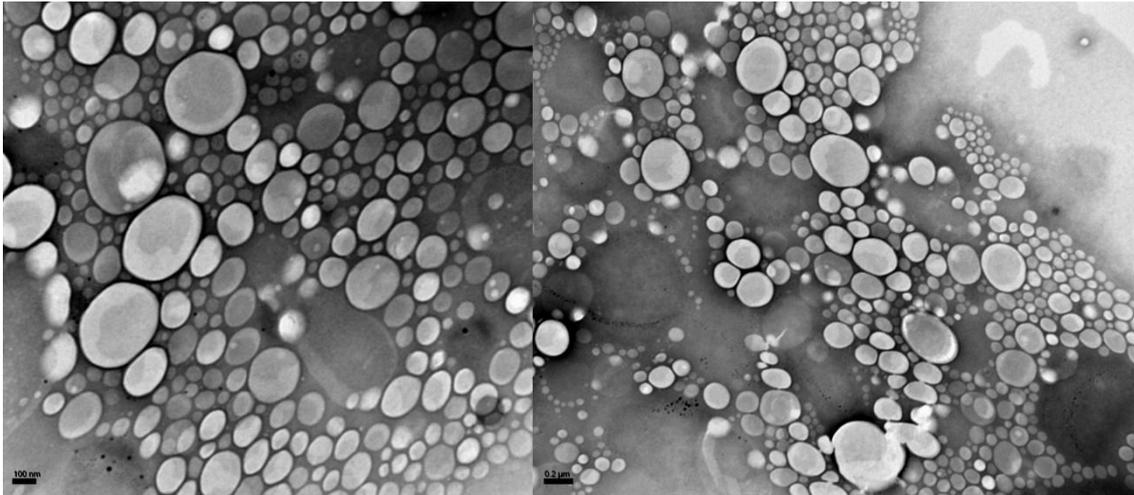
F. V	SC	Gl	CM	F	p-valor
<b>Concentración</b>	<b>1,13E+13</b>	<b>1</b>	<b>1,13E+13</b>	<b>4055,10</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Error	1,68E+10	6	2,79E+09		
<b>Falta de ajuste</b>	<b>1,21E+10</b>	<b>2</b>	<b>6,06E+09</b>	<b>5,21</b>	<b>0,0770</b>
Error puro	4,66E+09	4	1,16E+09		
<b>Total</b>	<b>1,14E+13</b>	<b>7</b>			

## 2. Formulación y caracterización fisicoquímica de NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO

La formulación de nanopartículas fue preparada por el método de ultrasonicación, resultando en una dispersión coloidal de aspecto blanquecino, homogénea y estable, sin evidencia de precipitado. La etapa de fundido del lípido y agregado del fármaco resultó en una suspensión de fármaco en la fase oleosa. El agregado del lípido líquido GTCC-LQ se realizó para generar un rearrreglo de la estructura cristalina de la arquitectura lipídica, lo cual por un lado, comparando con un sistema de SLN, aumenta la eficiencia de carga y la estabilidad en estantería, resultando en un nanosistema del tipo de NLC (1).

La EE, % de NLC-BNZ fue del  $81,1 \pm 2,1$  % y la carga teórica de fármaco en el lípido fue de 2,5% p/p. Nuestros resultados estuvieron en concordancia con los valores de EE, % previamente reportados en un estudio realizado por Vinuesa y colaboradores (2), que involucró diferentes tipos de nanopartículas y BNZ, incluyendo NLC y SLN, con un método de obtención similar al que se realizó en este trabajo.

Seguidamente, la formulación NLC-BNZ se observó al TEM para confirmar la presencia de nanopartículas, su morfología esférica y una distribución homogénea de tamaños (**Figura 3.1**). Se observó un tapiz de nanopartículas con una distribución de tamaños hasta los 200 nm.



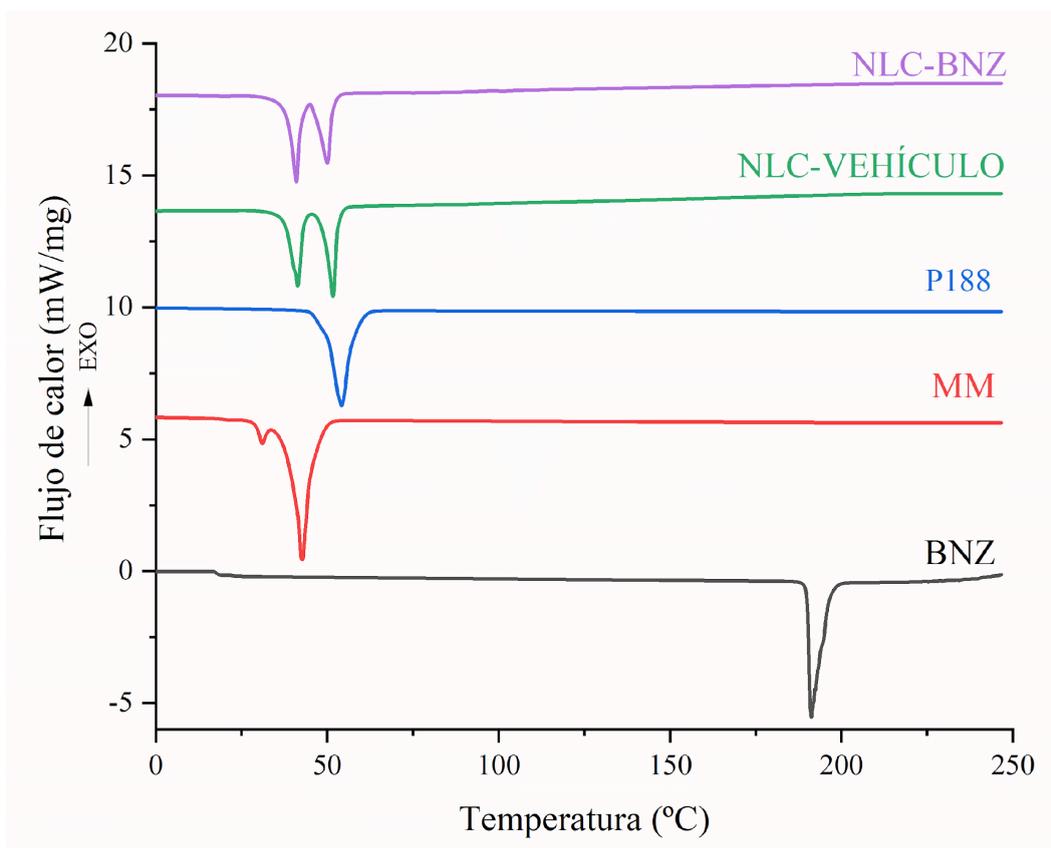
**Figura 3.1.** Imágenes de NLC-BNZ obtenidas por TEM.

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, estimado mediante DLS, también estuvo en el rango de 100-200 nm (con un valor promedio de  $150,65 \pm 4,74$  nm), sin observarse diferencias de tamaño significativas entre las nanopartículas con o sin carga de fármaco), y con una distribución de tamaños moderada, como lo indicó un PDI de  $0,202 \pm 0,009$ . Respecto al PDI, para formulaciones lipídicas se consideran que valores  $\leq 0,3$  denotan formulaciones con una distribución homogénea para aplicaciones biológicas (3-6). A la par, se realizó un análisis de las imágenes mediante el software *ImageJ* (7) estimando un tamaño de partícula de  $150 \pm 13$  nm, resultado notablemente similar al obtenido mediante DLS.

El  $\zeta$  se midió mediante anemometría de Doppler obteniendo valores de  $-14,08 \pm 2,25$  mV. En las formulaciones lipídicas, el valor ligeramente negativo de  $\zeta$  generalmente suele estar dado por el surfactante utilizado, aunque también puede ser resultado de otro componente de la formulación como el lípido o solventes remanentes del proceso de elaboración (8). En este caso, la mayoría de los componentes son neutros a pH fisiológico ya que son compuestos químicos con enlaces del tipo éster (lípido) y/o éter (poloxámero), y la formulación presentó un valor levemente negativo como otras obtenidas a partir de materias primas similares (9,10).

Pasando a los ensayos de degradación térmica, en primer lugar, se realizaron análisis de DSC y TGA para determinar la estabilidad térmica y los procesos de fusión/recristalización de los componentes luego de la encapsulación del fármaco. En la **Figura 3.2** se muestran termogramas de DSC, mientras que la temperatura de fusión, la entalpía de fusión y el índice de cristalinidad se presentan en la **Tabla 3.3**.

El termograma de BNZ mostró un pico endotérmico en su punto de fusión (191,2 °C) (11). La formulación mostró dos picos endotérmicos en el rango de 40–50 °C, que coinciden con los puntos de fusión del lípido y del tensioactivo, como se constató en bibliografía (12, 13). Esto sugiere que no ocurren otros cambios endotérmicos en los componentes de la formulación o durante el proceso de sonicación (que aporta al sistema una cantidad considerable de energía). El pico de transición de fase de BNZ no apareció en el termograma de la formulación, lo que sugiere que el BNZ está disperso dentro de la matriz lipídica (14). En correlación con el menor valor de entalpía de fusión, el valor de IC, % de las nanopartículas fue menor que el del MM puro. Las moléculas de lípido podrían encontrarse menos ordenadas en las nanopartículas en comparación con el material puro, debido a la incorporación del fármaco y el tensioactivo. Por esa razón, podrían requerir una menor cantidad de energía para fundirse en comparación con la sustancia cristalina pura (15).

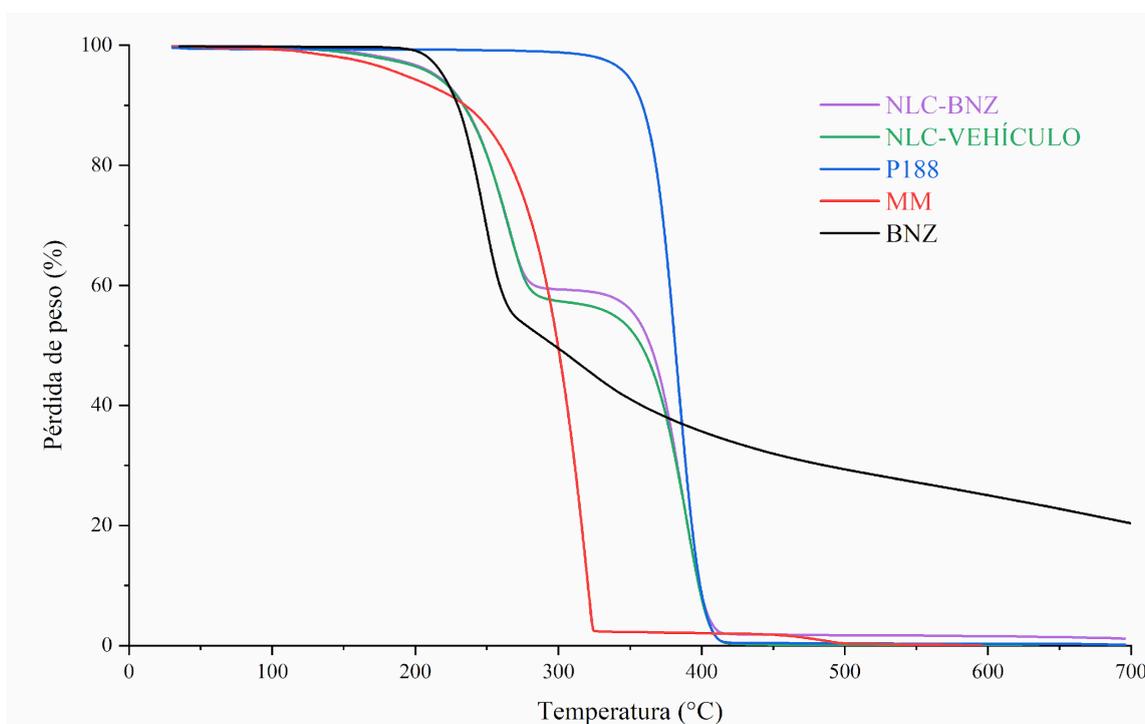


**Figura 3.2.** Termogramas de BNZ, MM, P188, NLC- VEHÍCULO y NLC-BNZ.

**Tabla 3.3.** Propiedades térmicas de BNZ, MM, P188 y las formulaciones (NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ). Tf: temperatura de fusión.  $\Delta H_f$ : entalpía de fusión. IC %: índice de cristalinidad.

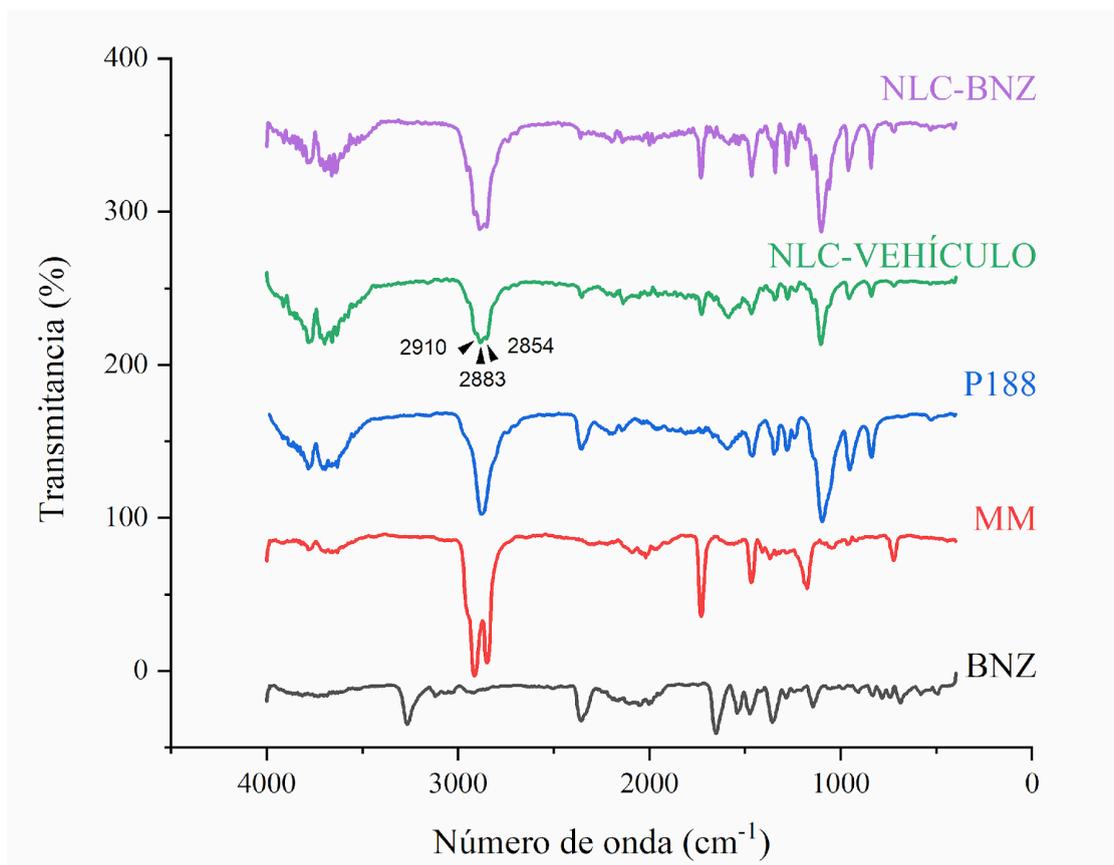
MUESTRA	Tf (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	IC %
<b>BNZ</b>	191,2	142,3	100
<b>MM</b>	42,9	239,4	100
<b>P188</b>	54,2	148,8	100
<b>NLC-VEHÍCULO</b>	41,4 – 51,7	61,1	12,7
<b>NLC-BNZ</b>	40,9 – 50,01	59,4	12,4

Las curvas termogravimétricas de MM, P188 y BNZ mostraron un proceso de degradación térmica, mientras que NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO presentaron dos eventos (**Figura 3.3**). El proceso de pérdida de peso del lípido comenzó a 180 °C y finalizó a 320 °C. El termograma del P188 mostró un proceso de descomposición que comenzó a 300 °C y culminó a 410 °C, y la mayor proporción de degradación de BNZ ocurrió en el rango de 190–300 °C. Considerando estos procesos, el comportamiento térmico de las nanopartículas podría atribuirse, en primer lugar, a la degradación del lípido y luego a la pérdida de peso del surfactante.



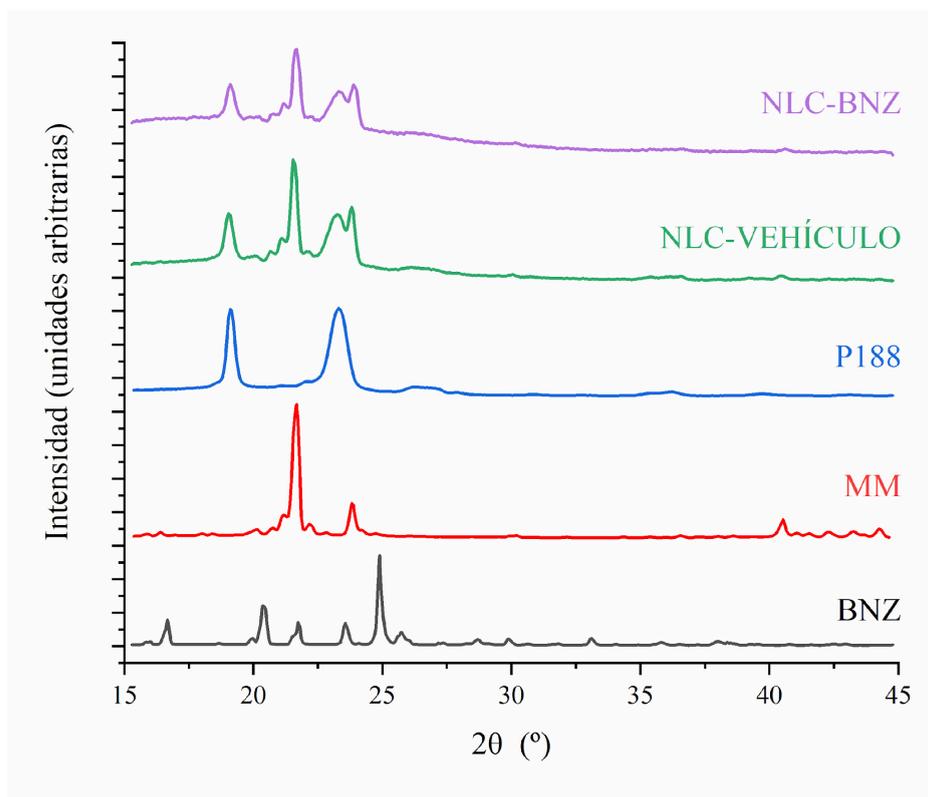
**Figura 3.3.** Termogramas de BNZ, MM, P188, NLC-VEHÍCULO Y NLC-BNZ.

A modo complementario, se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja por ATR-FTIR para analizar la composición superficial de las nanopartículas y determinar las posibles interacciones entre los componentes de la formulación (**Figura 3.4**). El espectro de BNZ presentó sus picos característicos a  $3.264\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente al N-H en el enlace amida secundaria),  $1.652\text{ cm}^{-1}$  (C=O en la amida),  $1.523\text{--}1.400\text{ cm}^{-1}$  (rango de flexión del N-H en la amida;  $1.500\text{--}1.400\text{ cm}^{-1}$  es también el rango de absorción del C=C en el grupo bencilo),  $1.357\text{ cm}^{-1}$  (vibración simétrica de R-NO<sub>2</sub>), y  $1.141\text{ cm}^{-1}$  (C-N en el anillo imidazol) (16). El MM mostró picos a  $2.913$  y  $2.848\text{ cm}^{-1}$  (correspondientes al C-H de alcano),  $1.731\text{--}1.184\text{ cm}^{-1}$  (rango de estiramiento del C=O y C-O de los grupos éster). El pico a  $1.467\text{ cm}^{-1}$  se asoció con las vibraciones deformantes del C-H de alcanos (17). Los picos característicos del P188 se observaron a  $3.600\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del O-H), un pico intenso en  $2.873\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente al estiramiento del C-H de alcanos), otro pico intenso en  $1.105\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico del C-O-C), y un rango característico en  $964\text{--}833\text{ cm}^{-1}$  (estiramientos asimétricos y simétricos del C-C-O) (18). El espectro de NLC-BNZ mostró picos característicos del MM y P188 (superposición de los picos más intensos en la región de  $3.000\text{ cm}^{-1} - 2.910\text{ cm}^{-1}$ ,  $2.883\text{ cm}^{-1}$  y  $2.854\text{ cm}^{-1}$ — debido a la presencia del lípido y el tensioactivo). En contraste, el espectro no mostró picos que pudieran estar relacionados con BNZ, lo que sugiere que las moléculas del fármaco se hallan dispersas en la matriz lipídica y no en la superficie de las nanopartículas.



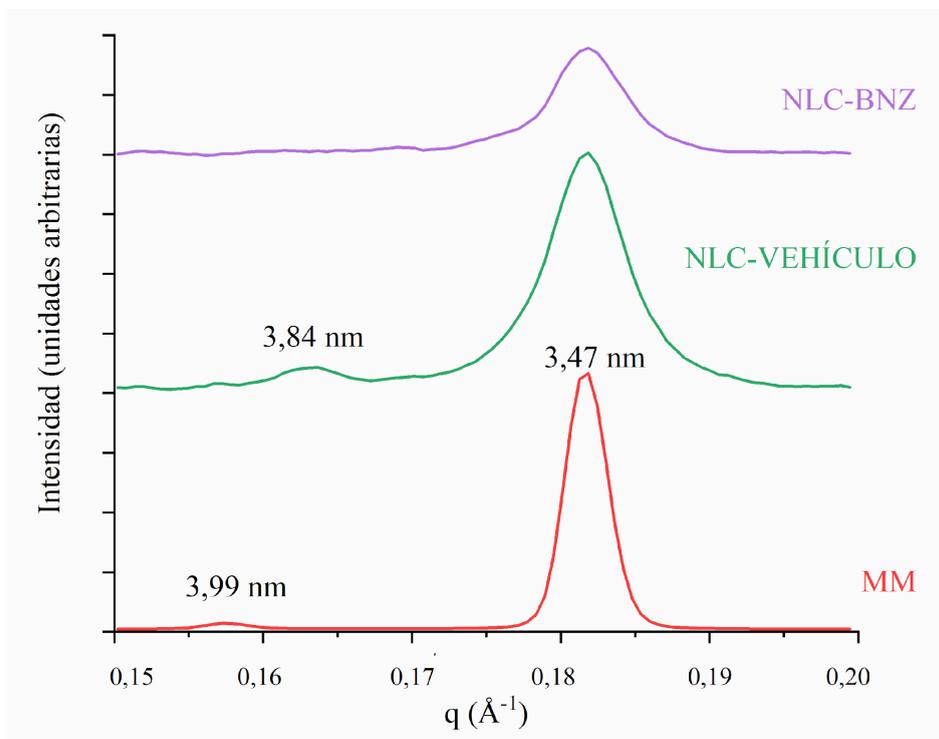
**Figura 3.4.** Espectros infrarrojos de BNZ, MM, P188, NLC-VEHÍCULO Y NLC-BNZ.

Adicionalmente, se realizó un análisis estructural seleccionando diferentes regiones angulares de los patrones SAXS y WAXS. Los patrones de WAXS (**Figura 3.5**) mostraron contribuciones en los picos de difracción de BNZ, MM y NLC. La formulación mostró contribuciones tanto del MM aislado como de picos adicionales de Bragg a  $19,1^\circ$  y  $23,3^\circ$  correspondientes al copolímero. Esto indica que hubo segregación de fases, formando muy probablemente una estructura de núcleo-cáscara con la fase lipídica en el interior y la parte hidrofílica del copolímero en la parte exterior de las NLC. Las posiciones principales de los picos de MM expresadas en términos de espaciamiento  $d$  fueron 4,1 y 3,8 Å, correspondientes a una familia del polimorfo  $\beta'$  (19) y no se modificaron después de la síntesis de las NLC o la adición de BNZ. Además, no hubo contribuciones de la fase cristalina de BNZ dentro de las NLC, probablemente debido a su pequeña cantidad relativa o a su disolución dentro de las NLC.



**Figura 3.5.** Espectros WAXS para BNZ, MM, P188, NLC-VEHÍCULO Y NLC-BNZ.

Los picos de difracción de Bragg de largo período para el MM se pudieron observar en los patrones de SAXS en el rango  $q$  entre 0,15 y 0,2  $\text{\AA}^{-1}$  (**Figura 3.6**).



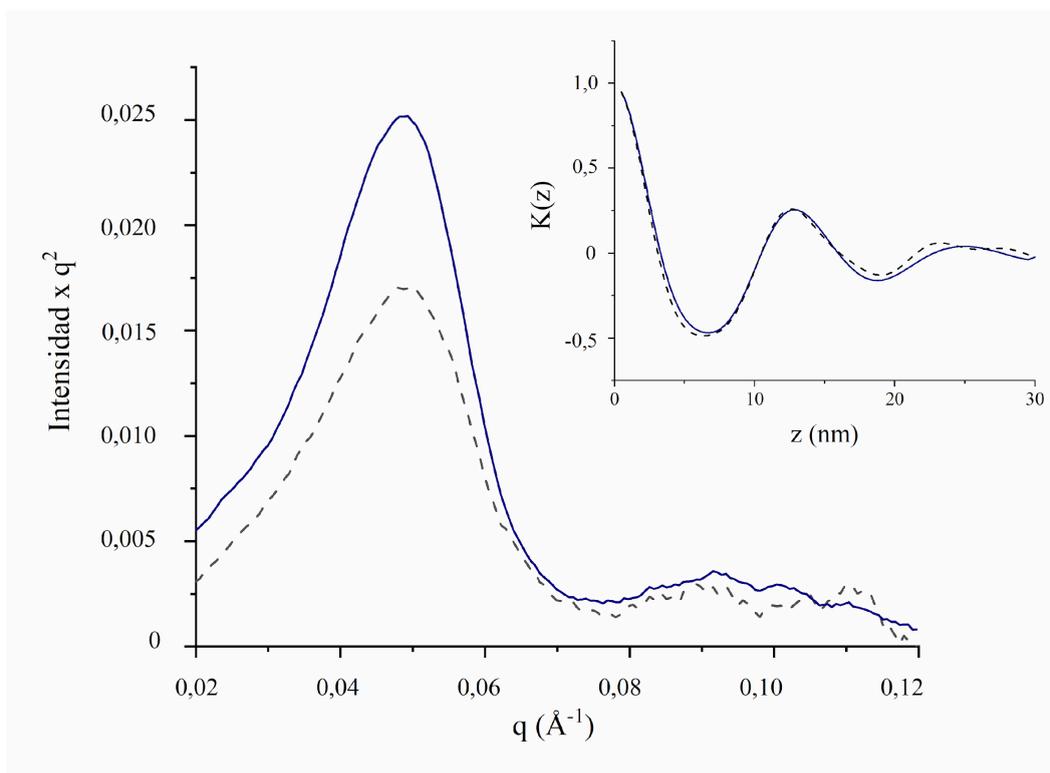
**Figura 3.6.** Patrones SAXS para muestras con MM en su composición.

El MM puro confirmó la presencia de un polimorfo  $\beta'$  con un período de espaciamiento  $d$  de 3,99 (001) y 3,47 nm (002), mientras que en las NLC solo permaneció el pico de espaciamiento  $d$  de 3,47 nm. Además, en los sistemas NLC, el pico de Bragg principal fue más ancho, lo que atribuimos a un efecto de cristalización de tamaño nanométrico donde los tamaños medios de cristalito estimados fueron de  $94 \pm 5$  nm y  $101 \pm 5$  nm para NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ, respectivamente, utilizando la aproximación de Scherrer. Sin embargo, un ensanchamiento de la parte inferior del pico principal en las muestras de NLC-BNZ sugiere defectos en la estructura, probablemente debido a la inclusión de BNZ en la formulación. A ángulos más pequeños, el copolímero en la superficie exhibió una estructura tipo lamelar (20).

En la **Figura 3.7** se presenta el gráfico de Lorentz/Kratky ( $q^2I$  vs  $q$ ), donde los picos de NLC y NLC-BNZ permanecieron en la misma posición, independientemente de la presencia de la carga de BNZ. La función de correlación lineal se obtuvo utilizando la siguiente transformación (21, 22):

$$K(z) = \frac{\int_0^{\infty} I_{norm}(q)q^2 \cos(qz) dq}{\int_0^{\infty} I_{norm}(q)q^2 dq} \quad \text{Eq. 3.1}$$

donde  $I_{norm}$  es la intensidad normalizada después de eliminar la contribución del MM:  $I_{norm} = INLC(q) - I_{background} - c(IMM(q) - I_{background})$ , siendo  $INLC$  la contribución a la intensidad por parte de la formulación,  $I_{background}$  la señal ruido del sistema y  $c$  una constante o proporcionalidad ponderada entre las fases. A partir de esta transformación, el período lamelar obtenido del primer máximo de la oscilación fue de 12,6 nm para ambos sistemas (**Figura 3.7**). Se desprende que BNZ es una molécula lipofílica que no modificó la estructura del surfactante. Por lo tanto, es probable que el fármaco se disuelva en el núcleo de la nanopartícula lipídica.



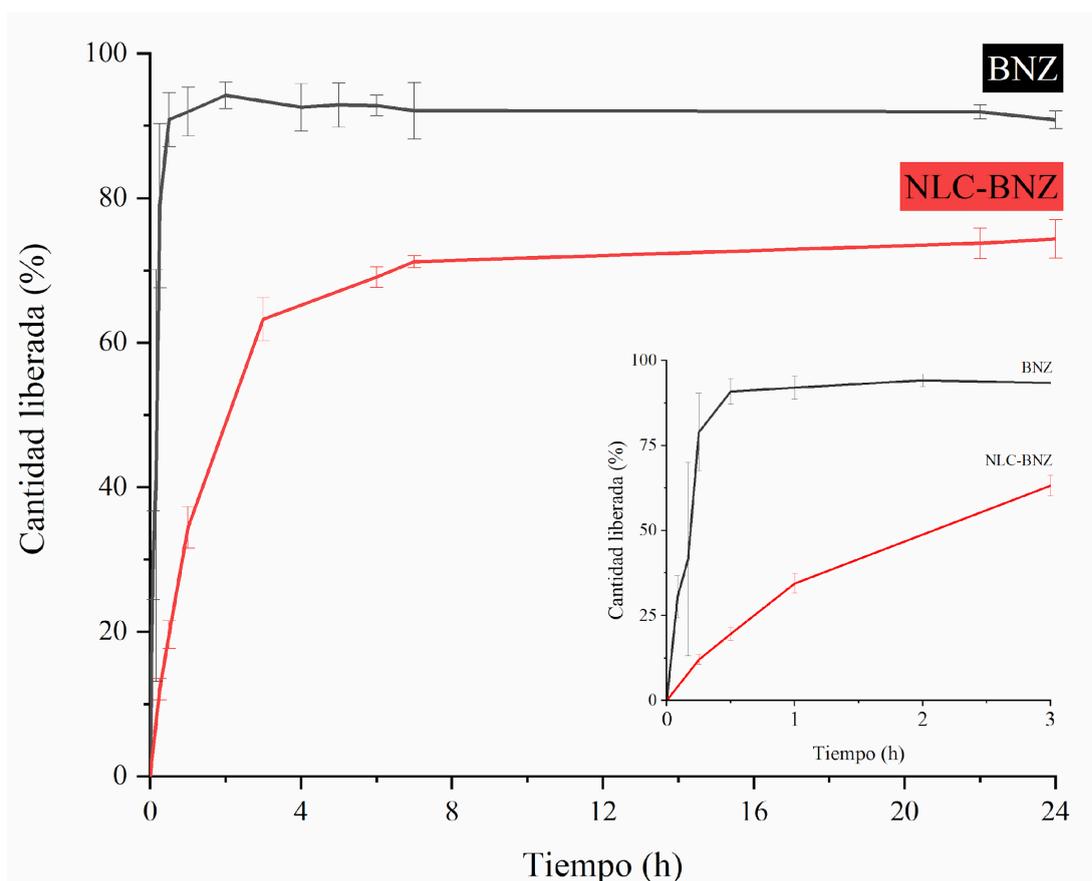
**Figura 3.7.** Gráfico de Lorentz/Kratky para los patrones de SAXS de NLC-VEHÍCULO (línea continua) y NLC-BNZ (línea discontinua). El recuadro corresponde a la transformación de correlación lineal para sistemas lamelares.

### 3. Ensayos de liberación y estabilidad fisicoquímica

El resultado de los experimentos de liberación de BNZ desde las nanopartículas, en primer lugar, mostró un 78% del fármaco libre disuelto en los primeros 15 minutos del experimento (**Figura 3.8**). En contraste, durante los primeros 15 minutos solamente alrededor del 12% del fármaco fue liberado de la formulación.

Respecto del BNZ en la formulación, se observó una liberación inicial rápida, seguida de una liberación lenta. Esta observación podría explicarse, en parte, considerando la presencia de moléculas de fármaco libre en la formulación (20% de la carga inicial de fármaco) y, por otra lado, por la presencia de moléculas de fármaco ubicadas cerca de la superficie de las nanopartículas, siendo moléculas que difunden rápidamente fuera del vehículo. La síntesis de nanopartículas haría que el BNZ, de naturaleza lipofílica, se reparta preferentemente hacia la fase lipídica; sin embargo, durante la sonicación, el aumento de la temperatura también aumentaría la disolución en la fase acuosa. Las moléculas repartidas en el lípido pasan a formar parte del núcleo sólido (o se ubican en las imperfecciones que en la matriz sólida produce el lípido líquido) a medida que la

formulación se enfría a temperatura ambiente, y las moléculas que quedaron en la fase acuosa intentarán repartirse hacia el lípido para establecer el reparto asociado a una menor temperatura. En el intento de repartirse nuevamente en el lípido, permanecerían concentradas en los bordes de las nanopartículas, lo que explicaría la liberación inicial más rápida.



**Figura 3.8.** Perfil de liberación *in vitro* de BNZ y NLC-BNZ.

Por otra parte, el aumento paulatino de la concentración de fármaco en el medio de liberación observado después de la etapa inicial podría atribuirse a la liberación gradual de moléculas de fármaco desde el interior de las nanopartículas, donde se encuentra principalmente el fármaco según los resultados de las técnicas de caracterización fisicoquímica. Si bien la temperatura de fusión del lípido se encuentra en el rango 36-40 °C, no se observó una completa disolución del mismo dentro de la bolsa de diálisis manteniéndose el color blanquecino de la formulación durante todo el experimento. Tal vez por este motivo no se alcanzó un 100% en la liberación del fármaco, ya que al ser el BNZ un fármaco liposoluble se mantendría en contacto con la fase lipídica. Aun así, y

aunque esta formulación posee una carga de fármaco relativamente baja, es notable que la liberación acumulada máxima de fármaco es mayor que la observada para sistemas similares previamente reportados (2). Podría ser de interés alcanzar una liberación gradual del BNZ desde las nanopartículas, ya que de este modo se podrían evitar concentraciones plasmáticas por encima del rango terapéutico inmediatamente luego de la administración de una dosis alta, lo cual conllevaría a posibles efectos adversos dependientes de la concentración. Así mismo, tal vez sería posible mantener los niveles de fármaco dentro del rango terapéutico durante un mayor intervalo de tiempo entre dosis sucesivas.

Los datos de liberación *in vitro* se ajustaron a diferentes modelos matemáticos (**Tabla 3.4**). El modelo que mejor ajustó los datos fue el modelo de Korsmeyer-Peppas seguido de un modelo de liberación de primer orden. La elección del mejor ajuste se basó en maximizar el coeficiente de determinación ( $R^2/R^2$ -ajustado) y en minimizar el error medio cuadrado (EMC) y el criterio de información de Akaike (AIC). Se busca minimizar este parámetro a fin de poder elegir un modelo que prediga de la manera más exacta las mediciones obtenidas con un balance entre el error en el ajuste y la cantidad de factores que se pueden incluir.

El modelo de Korsmeyer-Peppas, también llamado ley de potencia, se utilizó inicialmente para describir la liberación de fármacos en sistemas poliméricos donde los dos mecanismos de liberación predominantes son la relajación de las cadenas poliméricas y la difusión. En este modelo (Eq. 3.2),  $Mt/M_\infty$  es la fracción disuelta,  $K$  es una constante que incorpora información estructural y geométrica, y el exponente  $n$  es el exponente de difusión o transporte, que proporciona información sobre el mecanismo de liberación.

**Tabla 3.4.** Medidas de bondad de ajuste de los modelos matemáticos de liberación de fármaco desde NLC-BNZ.

Modelo	$R^2$	$R^2$ -ajustado	EMC	AIC
<b>Primer orden</b>	<b>0,97</b>	<b>0,97</b>	<b>14</b>	<b>22</b>
<b>Hopfenberg</b>	0,95	0,94	37	27
<b>Baker-Lonsdale</b>	0,90	0,90	57	29
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>5</b>	<b>18</b>
<b>Hixon-Crowell</b>	0,95	0,95	27	25

$$\frac{M_{(t-lag)}}{M_{\infty}} = K t^n \quad \text{Eq 3.2}$$

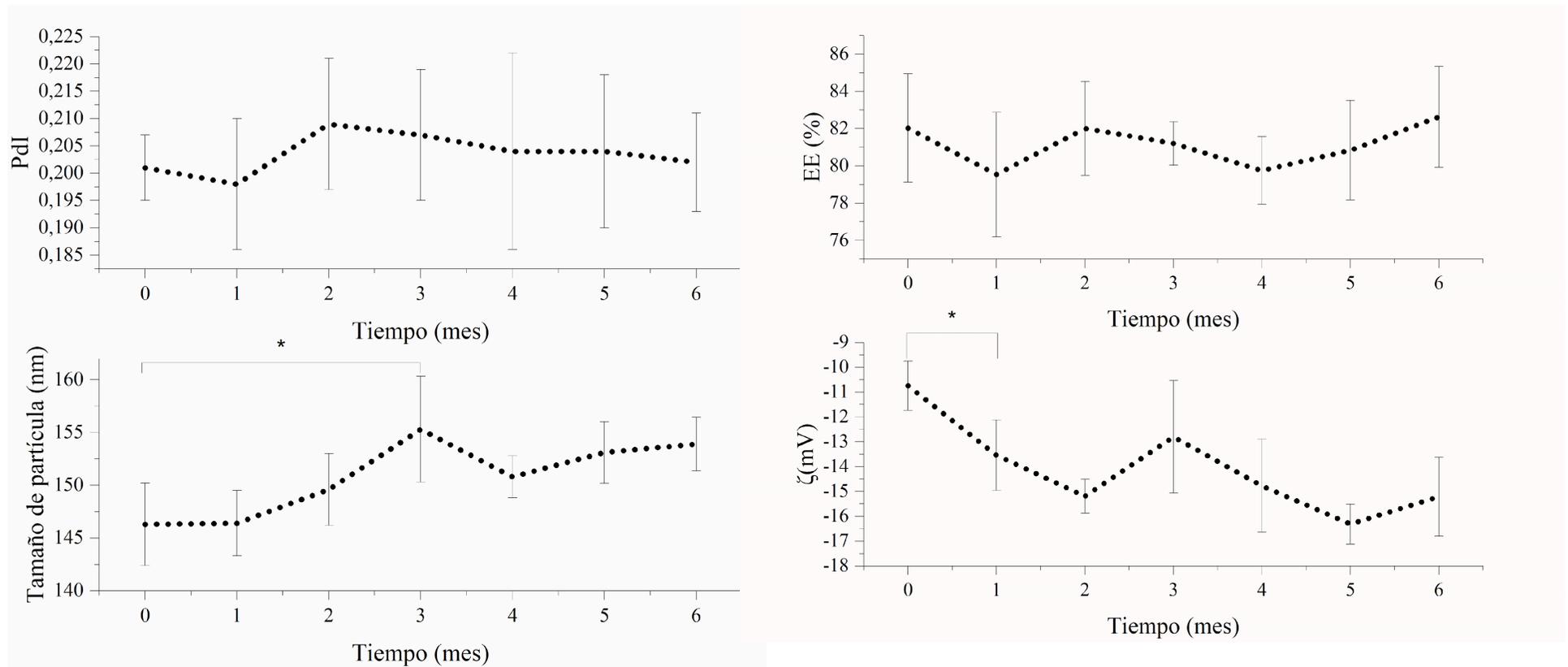
Sin embargo, este modelo también puede ser entendido como una generalización para describir dos mecanismos simultáneos de liberación de fármacos desde un vehículo farmacéutico (23). El mecanismo que predomina en la liberación puede inferirse a través del valor del exponente de liberación  $n$ . Para sistemas esféricos,  $n$  tomará un valor de 0,43 para la liberación de fármacos gobernada por procesos difusionales; un valor de 1 para la liberación de orden cero y valores intermedios para un comportamiento intermedio, a menudo considerado como transporte anómalo. En nuestro caso, el valor estimado de  $n$  fue de 0,56, lo que sugiere mecanismos mixtos de liberación con una fuerte contribución de la difusión desde la matriz lipídica. Dado que en nuestro caso no hay relajación de polímero involucrada, se puede hipotetizar que el ya descrito efecto de liberación rápida podría estar afectando ligeramente la cinética global del proceso (24), o debido a la fusión parcial del componente lipídico mayoritario del nanovehículo a la temperatura a la que se realiza el estudio de disolución. Esta misma descripción ha sido utilizada anteriormente para describir la liberación de fármacos desde formulaciones lipídicas similares (25-27).

En lo que respecta a la determinación de la estabilidad fisicoquímica, el diámetro hidrodinámico medio de partícula, PDI,  $\zeta$  y EE, % fueron seleccionados como parámetros para el seguimiento de la estabilidad física de la dispersión de nanopartículas durante seis meses bajo las condiciones de almacenamiento seleccionadas (almacenamiento en viales de vidrio, refrigeración a 4 °C y protección de la luz) (**Figura 3.9**). Siguiendo los antecedentes para formulaciones de SLN, podría ser posible que este tipo de dispersiones permanezcan estables bajo las condiciones de almacenamiento anteriormente mencionadas durante al menos tres años (28).

En particular, nuestra formulación podría almacenarse a 4 °C durante al menos seis meses. Los valores medios de PDI y EE, % permanecieron inalterados durante todo el período de almacenamiento ensayado. En relación al  $\zeta$ , su disminución parece no haber afectado la estabilidad de las nanopartículas. Esto se refleja en el tamaño de las mismas, que si bien mostró una tendencia a aumentar ligeramente, no evidenció diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores iniciales a los cuatro, cinco y seis meses de almacenamiento.

Las cargas superficiales necesarias para lograr una buena dispersión de nanopartículas estabilizadas por repulsión electrostática están alrededor de  $\pm 30$  mV (29). El valor

promedio de  $\zeta$  de nuestra formulación fue  $-14,08 \pm 2,25$  mV. Aunque este valor no es óptimo para la estabilización por repulsión electrostática, de todas maneras cuenta con un aspecto positivo, ya que valores de  $\zeta$  altamente negativos pueden impedir la captación celular (30, 31). Por otro lado, se observó que las formulaciones permanecieron estables sin precipitación después de 6 meses. Esto sugiere que, en este caso, la estabilización no se logra únicamente mediante la carga superficial, sino también por la repulsión estérica después de agregar un tensioactivo no iónico (32).



**Figura 3.9.** Seguimiento de parámetros relevantes de la formulación durante 6 meses a fin de testear su estabilidad en determinadas condiciones de almacenamiento (refrigeración a 4 °C, viales de vidrio y resguardo de la luz \*= p<0,05). Los puntos corresponden al promedio y desvío estándar (n=3).

#### 4. Citotoxicidad y actividad hemolítica

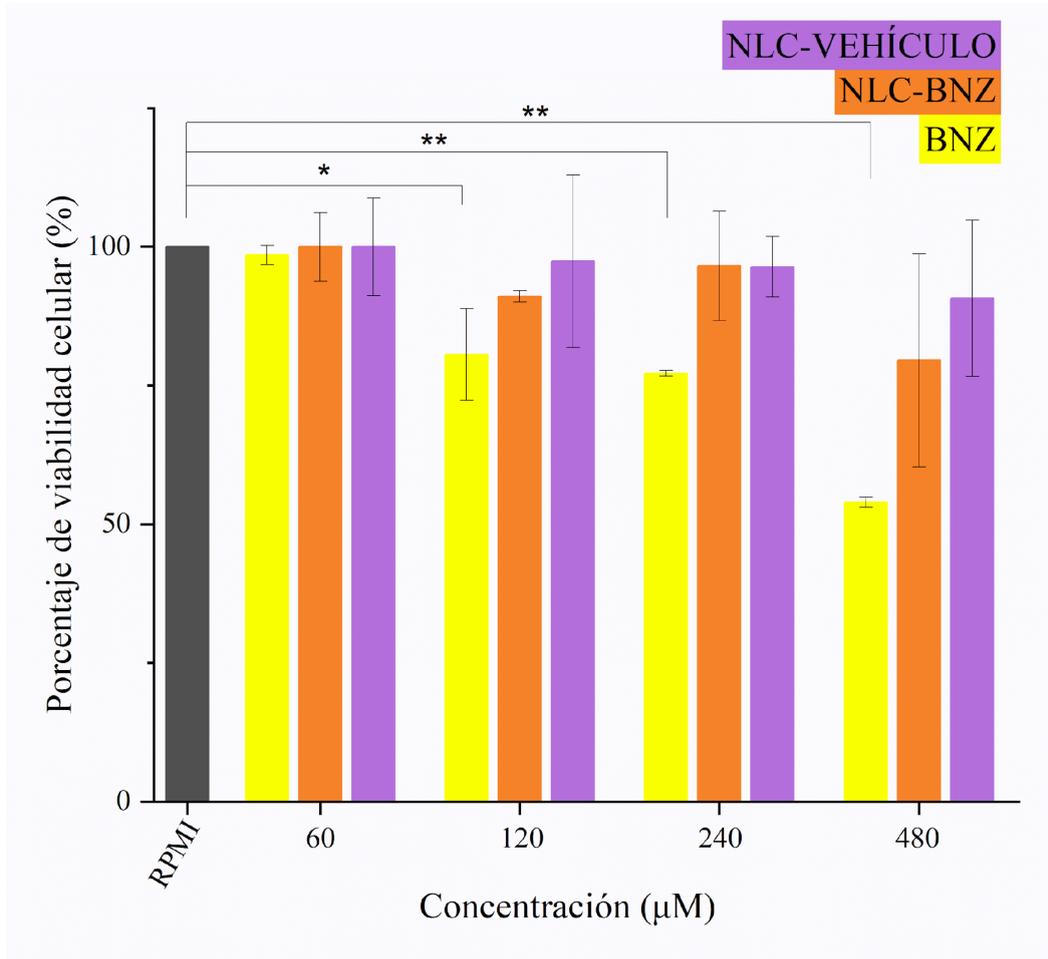
Se realizó el ensayo de citotoxicidad utilizando los métodos de sal de MTT y marcación celular con IP. Se utilizaron las líneas celulares CHO, Caco-2 y Vero.

Primeramente, se ensayó el BNZ en las células CHO en un rango de concentraciones hasta cuarenta y ocho veces superior a la  $EC_{50}$  del fármaco (alrededor de 10  $\mu\text{M}$ ) en ensayos *in vitro* frente a tripomastigotes K98 y casi veintiún veces superior a la concentración mínima tóxica (23  $\mu\text{M}$ ) del intervalo terapéutico del fármaco en pacientes (33), para asegurar una falta de toxicidad dependiente de la concentración.

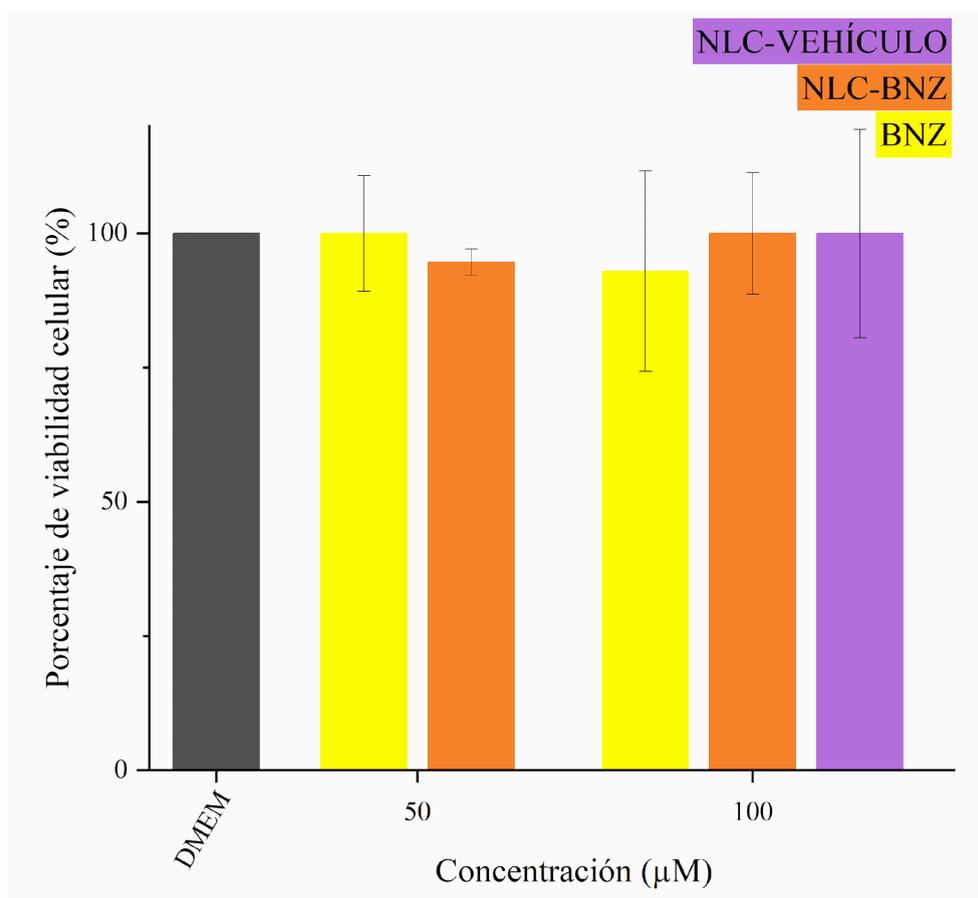
El resultado de este ensayo mostró que la viabilidad de las células CHO se vio afectada por la concentración de BNZ de una manera dependiente de la dosis (**Figura 3.10**), observándose diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos con BNZ a partir de la concentración de 120  $\mu\text{M}$ . Para esa concentración, la viabilidad celular fue del 80,6% mientras que para las concentraciones 240 y 480  $\mu\text{M}$  fueron 77,2 y 53,9%, respectivamente. La guía para la evaluación de dispositivos médicos de la Organización Internacional de Estandarización (ISO) establece que la disminución en un 30% de la viabilidad celular frente al control negativo se considera como un efecto citotóxico (34). Por lo tanto, según la guía, la concentración de BNZ 480  $\mu\text{M}$  es tóxica para las células. En contraste, el porcentaje de viabilidad celular para NLC-VEHÍCULO o NLC-BNZ en todas las concentraciones ensayadas resultó en valores que no difirieron significativamente del control negativo, lo que sugeriría la falta de efecto citotóxico. La ausencia de toxicidad en comparación con el fármaco libre podría atribuirse al perfil de liberación de BNZ desde las NLC, exponiendo a las células a concentraciones libres de BNZ menores durante las primeras etapas de la división celular. Este es un resultado interesante, ya que los efectos tóxicos del BNZ son una de las principales causas de interrupción del tratamiento en la clínica (35).

Se utilizó el mismo procedimiento de reducción de MTT para evaluar la toxicidad de las formulaciones y el fármaco libre en la línea celular Caco-2 (**Figura 3.11**). El porcentaje de viabilidad celular de nanopartículas y fármaco libre no se vio afectado significativamente respecto al control a las concentraciones ensayadas, remarcando la falta de un efecto citotóxico. Es importante destacar, en general con el procedimiento del ensayo con MTT, que el producto del metabolismo de las células con la sal es insoluble en agua y se necesita la adición de un solvente orgánico (en nuestro caso DMSO) para solubilizarlo y poder medir la absorbancia de las muestras. Los

componentes de las nanopartículas no absorben en el espectro visible, el BNZ absorbe a una longitud de onda de 314 nm y la absorbancia del método es a 550 nm, por lo que no habría interferencia del fármaco ni de las nanopartículas en el ensayo.



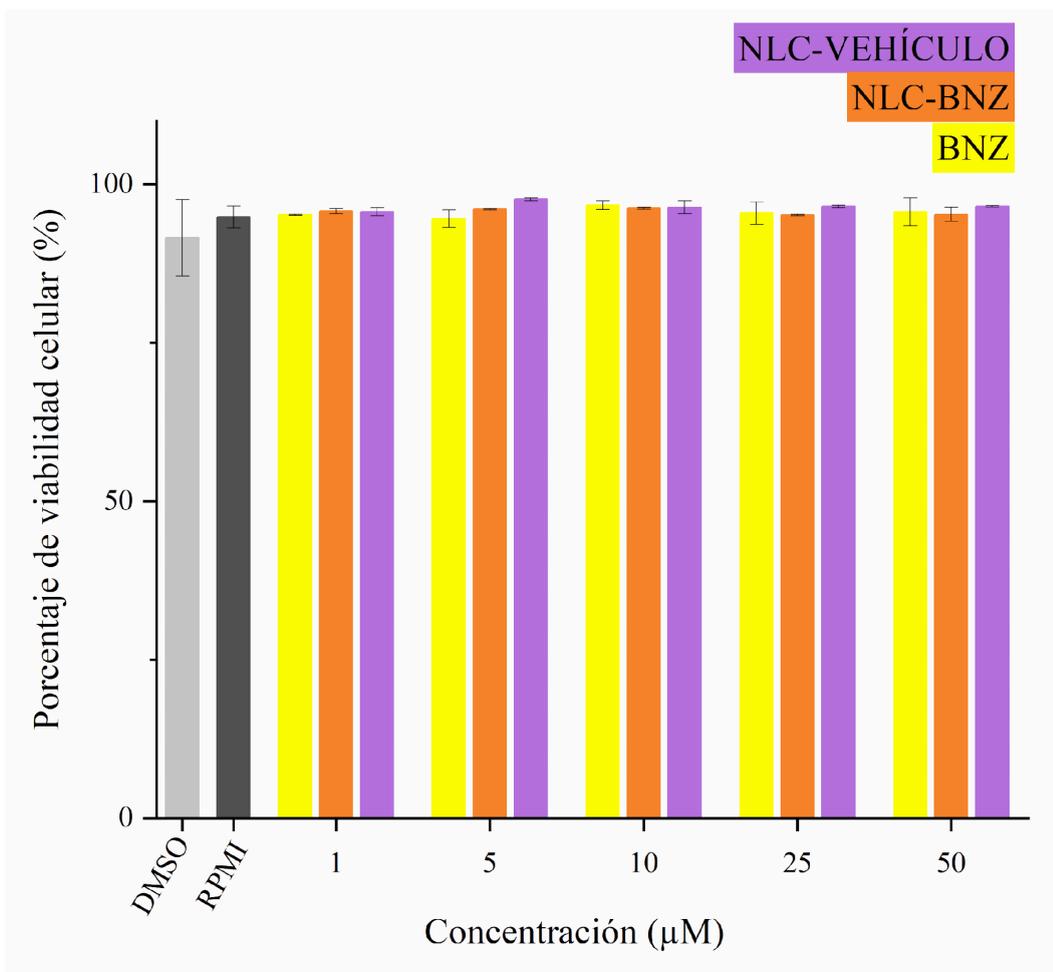
**Figura 3.10.** Ensayo de citotoxicidad en la línea celular CHO luego de ser tratadas con BNZ, NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO. Se realizó la prueba de Dunnet para determinar diferencias significativas respecto al grupo control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Se informa el promedio y el desvío estándar ( $n=3$ ).



**Figura 3.11.** Ensayo de citotoxicidad en la línea celular Caco-2 luego del tratamiento con NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO. Se informa el promedio y el desvío estándar (n=3).

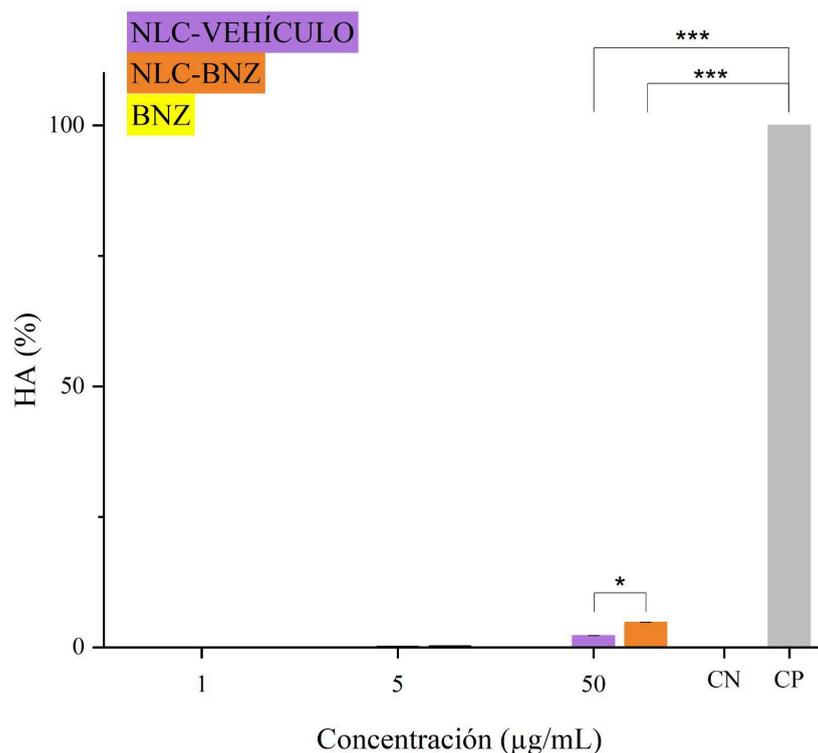
Por otro lado, la citotoxicidad se evaluó en la línea celular Vero mediante citometría de flujo, donde se midió el porcentaje de células muertas permeables al IP, una agente de tinción que interacciona con ácidos nucleicos (**Figura 3.12**). El resultado observado fue que ninguno de los tratamientos disminuyó significativamente la viabilidad en las células Vero respecto al control negativo.

Si bien sería interesante ensayar concentraciones más altas de los tratamientos en las líneas celulares Caco-2 y Vero (para realizar una comparación con lo observado en CHO), el indicio de la falta de toxicidad por parte de NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO aporta un dato valioso, teniendo en cuenta las concentraciones efectivas totales del fármaco observadas en pacientes bajo tratamiento (11-23 μM), y que la fracción unida a proteínas plasmáticas para BNZ ronda el 50%, debido a lo cual las concentraciones plasmáticas libres y las concentraciones tisulares libres serán incluso menores.



**Figura 3.12.** Ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero luego del tratamiento con BNZ, NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO. Se informa el promedio y el desvío estándar (n=2).

Dado que es común administrar formulaciones de nanopartículas por vía parenteral, es de interés estudiar la toxicidad potencial de las nanopartículas en las células sanguíneas. Se encontró que la mayoría de los artículos publicados evaluaron la hemólisis de las nanopartículas después de 2, 3 o 5 h de incubación (36-38). Los métodos estándar para probar la actividad hemolítica de las nanopartículas (ISO/TR 7406 o ASTM E2524-08) establecen que los biomateriales que inducen una relación hemolítica crítica de < 5% pueden considerarse seguros para aplicaciones biológicas (39). En nuestro caso, no se observaron efectos hemolíticos para BNZ, NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ a diferentes concentraciones después de 3 y 24 horas de incubación (no mostrado). Sin embargo, se observó cierta actividad hemolítica para NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ después de 48 horas de incubación (**Figura 3.13**).



**Figura 3.13.** Actividad hemolítica luego de 48 horas de incubación con los tratamientos. Se realizó la comparación de las medias mediante el test de Tukey (\*  $p < 0,05$ ) y la comparación con el control positivo o negativo mediante el test de Dunnett (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). No se marcan en el gráfico las diferencias con el control negativo. CP (+): Tritón X-100 (10%). CN (-): solución salina. Se informa el promedio y el desvío estándar ( $n=2$ ).

Todos los promedios de los tratamientos fueron estadísticamente diferentes respecto al control positivo. La comparación con el control negativo estableció diferencias significativas con NLC-BNZ (5 y 50 µg/mL) y NLC-VEHÍCULO (en una concentración lipídica equivalente a la usada para vehiculizar 5 y 50 µg/mL de BNZ) (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Promedios de los tratamientos que presentaron diferencias significativas con el control negativo (CN: solución fisiológica).

Tratamiento (concentración en $\mu\text{g/mL}$ o equivalente en NLC-VEHÍCULO)	HA, % promedio (desvío estándar)
<b>NLC-BNZ (5)</b>	<b>0,22 (0,030)</b>
NLC-BNZ (50)	4,80 (0,020)
<b>NLC-VEHÍCULO (5)</b>	<b>0,19 (0,034)</b>
NLC-VEHÍCULO (50)	2,25 (0,033)
<b>CN</b>	<b>0,0024 (0,003)</b>

Si bien estos tratamientos presentaron diferencias significativas frente al control negativo, aún el tratamiento con mayor porcentaje de hemólisis (NLC-BNZ con un 4,8% de HA, %), es aceptable según lo establecido por la normativa. La actividad hemolítica podría ser causada por varias razones, incluidos el envejecimiento de la muestra de sangre después de 48 horas de incubación con la liberación concomitante de hemoglobina o el efecto desestabilizante del surfactante sobre la membrana de los eritrocitos (40). Por otro lado, las diferencias entre NLC-BNZ a una concentración 50  $\mu\text{g/mL}$  y el equivalente de dosis lipídica de NLC-VEHÍCULO (4,80% frente a 2,25%), podrían explicarse por efecto supra-aditivo sobre los eritrocitos del fármaco libre y el vehículo. Este efecto no se observó para una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ , sin diferencias significativas entre los tratamientos, es decir, a menor concentración del fármaco no se logró evidenciar el efecto aditivo entre el vehículo y BNZ.

Un régimen de dosificación de BNZ que mostró disminución de efectos adversos en pacientes fue de 2,5 mg/kg/d (41). Para una persona de 70 kg se administraría una dosis de 175 mg. A partir de datos farmacocinéticos poblacionales se obtuvo que la constante de absorción, el aclaramiento y el volumen de distribución del fármaco tienen valores de 1,15  $\text{h}^{-1}$ , 1,73 L/h y 89,6 L, respectivamente. Dado que los datos experimentales de BNZ se ajustan a un modelo monocompartimental y que el aclaramiento, en las dosis estudiadas en literatura, es constante (41), a partir de la dosis y los parámetros farmacocinéticos se calculó la concentración plasmática media y máxima en estado estacionario siendo 4,21 y 5,06  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En nuestro experimento, con una concentración similar a la concentración máxima en estado estacionario estimada para un paciente (5  $\mu\text{g/mL}$ ) se observó, luego de tres horas de incubación, un porcentaje muy bajo de hemólisis de la formulación, lo que sumaría evidencia a la

hemocompatibilidad de las formulaciones. Por último, considerando que la posología recomendada actualmente es de 5-8 mg/kg repartido en dos dosis diarias (42), para el mismo paciente de 70 kg, administrando la dosis máxima (4 mg/kg/12h), los valores de concentración plasmática media y máxima en estado estacionario serían 13,49 y 14,69 µg/mL. Estos valores están por debajo del valor de concentración de BNZ en el que la formulación mostró el porcentaje más alto de hemólisis (50 µg/mL). Por lo tanto, aún a la máxima dosis recomendada de BNZ, la administración en NLC sería hemocompatible.

Serían necesarios más estudios para investigar el efecto de la composición o tamaño de estas nanopartículas después de una exposición a largo plazo a muestras de sangre como se describió para otros tipos de nanopartículas (38), así como, por ejemplo, otros efectos como la repercusión sobre el proceso de coagulación. Finalmente, nuestros resultados sugieren que las formulaciones de NLC-BNZ son hemocompatibles (36).

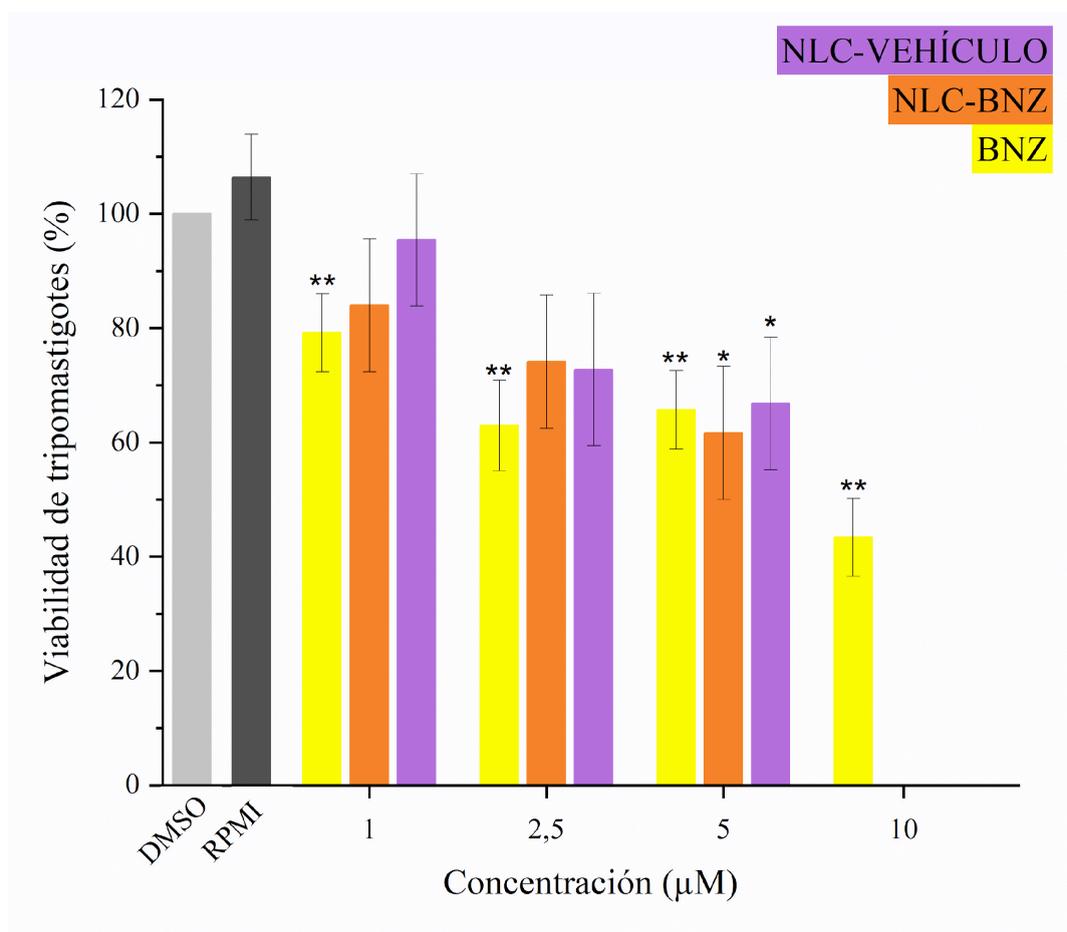
#### 5. Actividad tripanocida *in vitro*

Se realizó la incubación de las formulaciones y el fármaco libre junto a suspensiones de tripomastigotes K98 de *T. cruzi*. Como se muestra en la **Figura 3.14**, el BNZ libre mostró un efecto dependiente de la dosis frente a los tripomastigotes, mientras que las NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO también exhibieron un comportamiento dosis-respuesta a pesar de la variabilidad comparativamente grande entre las réplicas.

La EC<sub>50</sub> estimada para BNZ fue de 6,072 µM (IC 95%: 3,391-11,490) (**Figura 3.15**) con valores similares a los valores medios reportados en literatura contra distintas cepas de la misma DTU (43-46). El valor de EC<sub>50</sub> de NLC-BNZ fue 5,726 µM (IC95%: 4,178-11,190) sin diferencia significativa con respecto a BNZ.

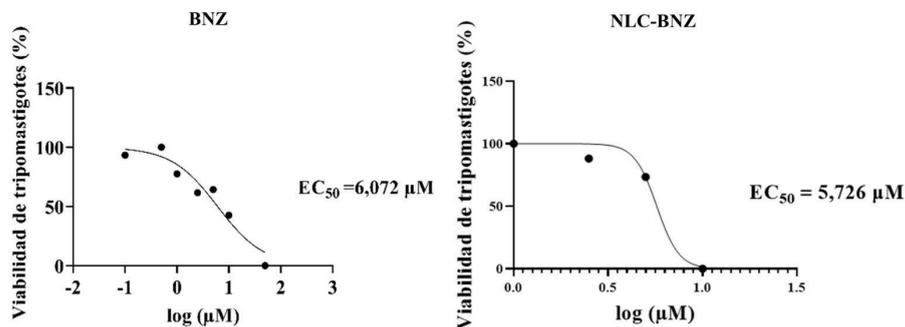
Se observó que a la concentración 10 µM de NLC-BNZ el porcentaje de viabilidad de tripomastigotes fue 0%. Una observación similar pudo hacerse para las nanopartículas vacías equivalentes a las que suministrarían esa concentración de BNZ en el volumen ensayado, lo que sugiere que la formulación en sí misma posee toxicidad intrínseca sobre los tripomastigotes de *T. cruzi*. La identificación del componente con posible actividad tripanocida se realizó ensayando individualmente a los constituyentes de la formulación frente a una suspensión de tripomastigotes, demostrando que la suspensión de MM tiene un efecto negativo sobre la viabilidad del parásito mientras que la suspensión de GTCC-LQ y la solución de P188 no tuvieron actividad tripanocida

intrínseca (**Figura 3.16, Ver Material Suplementario. Figuras S1 y S2**). Esto podría implicar que el MM no puede considerarse, en nuestro caso, como un componente farmacológicamente inerte en la formulación (excipiente). En cambio, debería considerarse como un ingrediente farmacéutico activo en base a sus efectos intrínsecos contra *T. cruzi*.

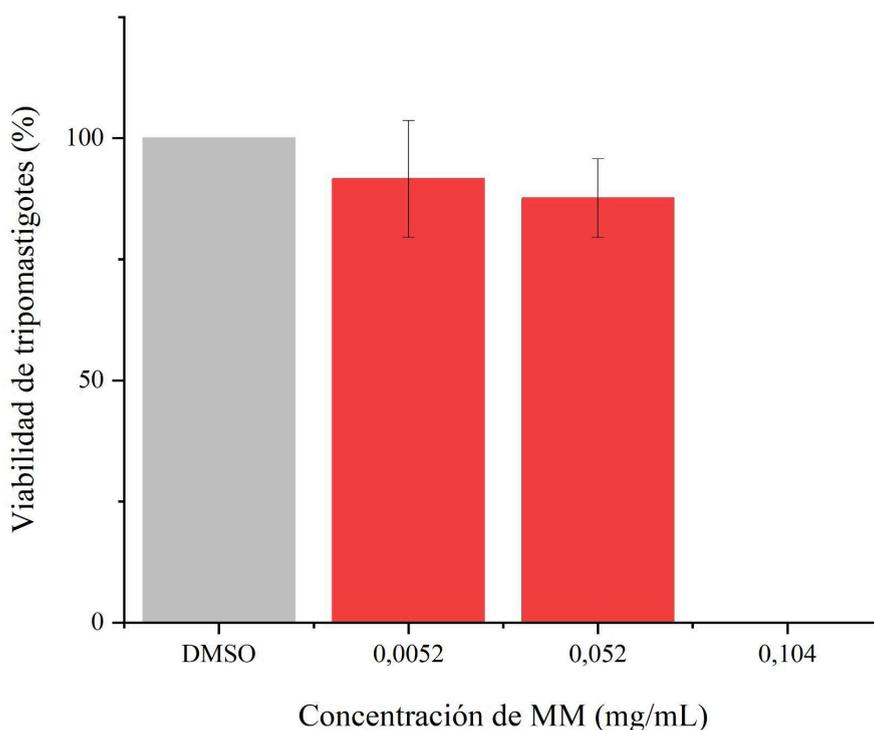


**Figura 3.14.** Efecto dosis-respuesta de BNZ, NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO sobre los tripomastigotes de *T. cruzi*. Se realizó la prueba de Dunnet para identificar diferencias significativas respecto al grupo de control. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. Se informa el promedio de los datos y el desvío estándar (n=4)

A primera vista, no parece observarse efecto aditivo o supra-aditivo entre el MM y el BNZ. Sin embargo, debe tenerse en cuenta lo que previamente se observó en el ensayo de liberación *in vitro*. El porcentaje acumulado de BNZ a las 24 horas fue menor al 100%, es decir, ni siquiera a las 24 horas la formulación habría liberado la totalidad de las moléculas de fármaco que contiene, en tanto para el tratamiento con fármaco libre la



**Figura 3.15.** EC<sub>50</sub> para BNZ y NLC-BNZ. La viabilidad de tripomastigotes (%) se expresa en relación al control con DMSO (1%). Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=4).

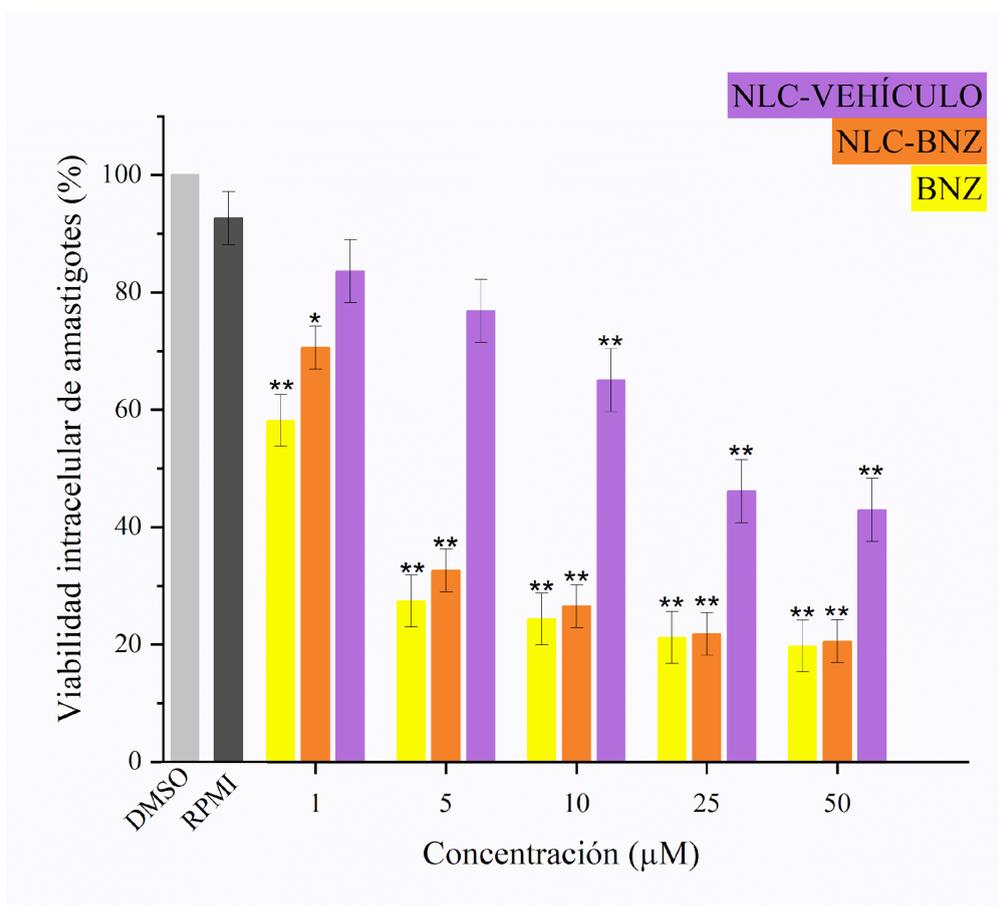


**Figura 3.16.** Porcentaje de viabilidad de tripomastigotes frente a concentraciones de la suspensión de MM. La concentración se expresó como masa de MM por volumen de suspensión.

totalidad de las moléculas se encuentran en solución, libres, desde el momento 0 de la incubación. Por lo tanto, la similitud de efecto entre BNZ y NLC-BNZ, reflejada en la

falta de diferencia estadística en las EC<sub>50</sub>s correspondientes, estaría indicando que en realidad si existe efecto aditivo a sinérgico, compensando la menor cantidad de moléculas de fármaco libre con la actividad intrínseca del vehículo.

Las curvas dosis-respuesta de BNZ, NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ sobre los amastigotes de *T. cruzi* también fueron evaluadas (**Figura 3.17**), y se calcularon las correspondientes EC<sub>50</sub> (**Figura 3.18**). El BNZ y NLC-BNZ presentaron inhibición del crecimiento intracelular de los parásitos incluso a la concentración más baja ensayada, sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos de fármaco libre y nanopartículas cargadas. Los valores de EC<sub>50</sub> del BNZ y las NLC-BNZ fueron de 3,151 (IC95%: 2,004-5,056) y 3,330 μM (IC 95%: 2,322-6,612), respectivamente, estando en concordancia con valores reportados para parásitos de la misma DTU (42, 46).

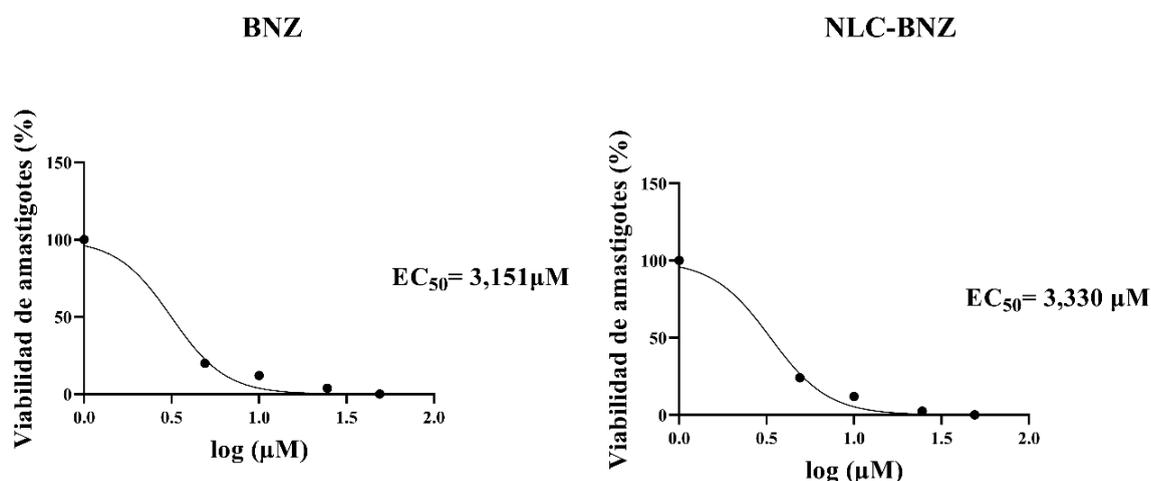


**Figura 3.17.** Efecto dosis-respuesta de BNZ, NLC-BNZ y NLC-VEHÍCULO sobre los amastigotes de *T. cruzi*. Se realizó la prueba de Dunnet para identificar diferencias significativas respecto al grupo de control (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

En comparación con los valores de EC<sub>50</sub> para tripomastigotes *in vitro* (6,072 μM versus 3,151 μM), si bien no hay diferencias significativas entre los valores, en amastigotes se

postula una tendencia hacia un menor valor de  $EC_{50}$  por una expresión diferencial o mayor actividad, en comparación a tripomastigotes, de la nitroreductasa que metaboliza al BNZ generando un metabolito tóxico para el parásito (46).

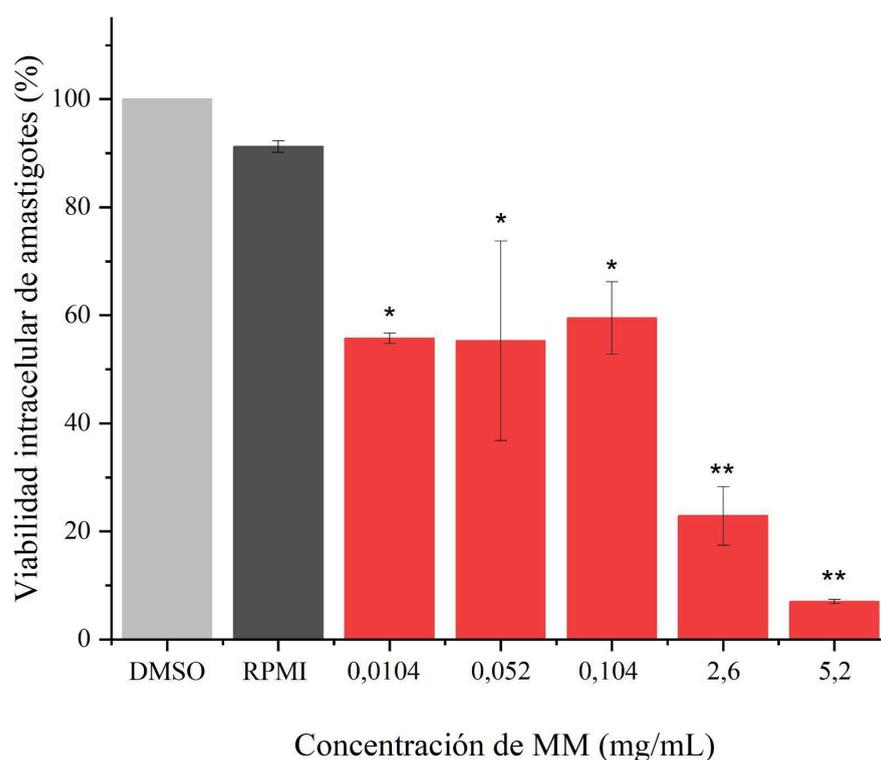
Además, y en concordancia con el ensayo tripanocida *in vitro* para tripomastigotes, NLC-VEHÍCULO mostró actividad tripanocida intrínseca en amastigotes a concentraciones de nanopartículas vacías equivalentes a las que suministrarían la misma concentración de BNZ (**Figura 3.17**). Mientras el equivalente a 10  $\mu\text{M}$  de NLC-BNZ de las nanopartículas vacías resultó en una viabilidad del 0% de tripomastigotes, no se observó el mismo fenómeno en amastigotes (viabilidad de amastigotes a 10  $\mu\text{M}$  de NLC-VEHÍCULO = 65%). Tal vez halla relación entre este resultado y el hecho que en tripomastigotes la formulación está en contacto directo con las células parasitarias mientras que en el ensayo con amastigotes las nanopartículas tendrían que internalizarse en la célula hospedadora primeramente, un proceso que supone más tiempo y superar más obstáculos para acceder al interior celular. Otra hipótesis es que la expresión del blanco o el mecanismo que se verían afectados por la adición de MM tengan una expresión diferencial en amastigotes, o que el efecto sobre tripomastigotes tenga una componente netamente osmótica.



**Figura 3.18.**  $EC_{50}$  para BNZ y NLC-BNZ. La viabilidad de amastigotes (%) se expresa en relación al control con DMSO (1%). Se informa como el promedio de los datos y el desvío estándar ( $n=3$ ).

Seguidamente, la suspensión individual de MM fue probada contra los amastigotes, mostrando una viabilidad reducida dependiente de la concentración (**Figura 3.19**). El

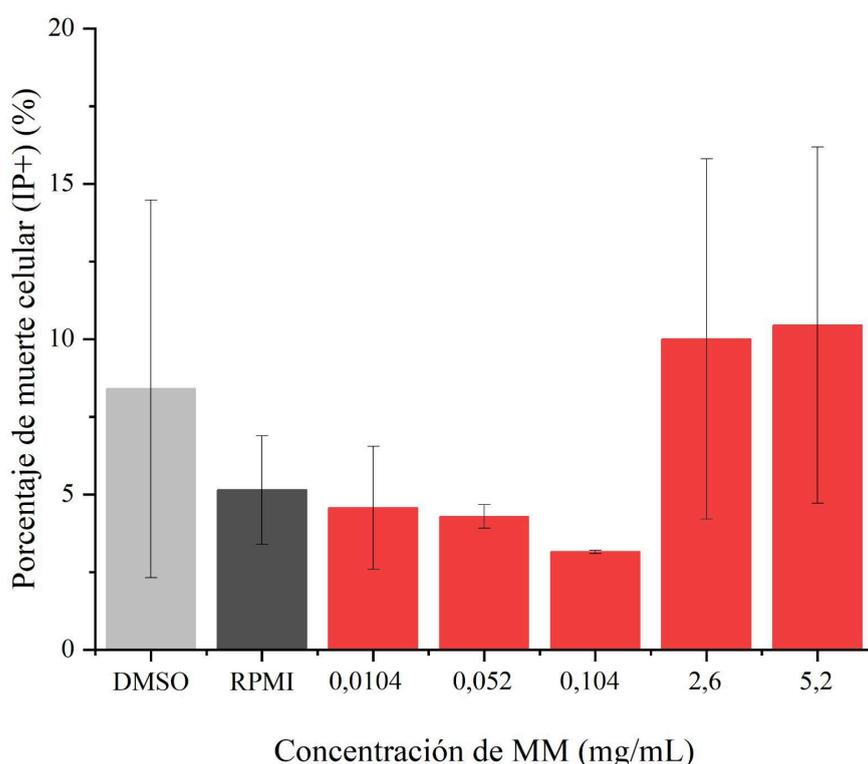
porcentaje de células Vero muertas marcadas con IP+ en este ensayo no fue mayor al 10%, por lo que se adjudicaría la disminución en el porcentaje de viabilidad de los amastigotes al efecto del lípido sobre el parásito, no sobre las células huésped (**Figura 3.20**). Curiosamente, y contrariamente a lo observado en tripomastigotes, el porcentaje de viabilidad de amastigotes frente a la suspensión de MM es menor en comparación con NLC-VEHÍCULO a un mismo nivel de exposición. Esto tal vez suceda debido a que las células de mamífero tienen diferentes y más variadas vías para captar lípidos, por lo que estaría optimizada la entrada del MM a la célula en lugar de las nanopartículas. Por otro lado, si MM y NLC-VEHÍCULOS estuvieran semifundidos a 37 °C, en principio, la suspensión de MM se disolvería más rápidamente que las nanopartículas (47), por lo que igualmente estaría favorecida la entrada a la célula del lípido.



**Figura 3.19.** Porcentaje de viabilidad de amastigotes frente a concentraciones crecientes de la suspensión de MM. Se realizó la prueba de Dunnet para identificar diferencias significativas respecto al grupo de control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Es importante destacar que las NLC-BNZ reportadas previamente en la literatura (2) tuvieron una  $EC_{50}$  contra amastigotes de 17,6  $\mu$ M. La mayor eficacia de nuestro sistema

podría tener múltiples explicaciones no excluyentes: una mayor velocidad de liberación de fármaco y/o la actividad intrínseca del MM, que se suma a la del BNZ. En el artículo mencionado (2) se trabajó con una cepa diferente de *T. cruzi*, la cepa CL-Brener perteneciente a una DTU distinta en comparación con la cepa empleada en esta tesis (CL-Brener pertenece a la DTU VI y la cepa que utilizamos aquí es la K98, DTU I). Las cepas pertenecientes a una DTU VI son más sensibles al BNZ (48) por lo que podríamos adjudicar la eficacia de nuestro sistemas a las hipótesis antes mencionadas.



**Figura 3.20.** Porcentaje de muerte celular mediante la marcación con IP de células Vero incubadas con concentraciones creciente de una emulsión de MM.

Un estudio previo (49) realizado sobre *Leishmania major*, un parásito del género protozoo, familia *Trypanosomatidae* y orden *Kinetoplastida* (al igual que *T. cruzi*) reveló una reducción en la viabilidad de amastigotes luego de la incubación con nanopartículas compuestas de cetil palmitato, un éster de ácidos grasos similar al MM (con residuos alquílicos de 15 y 16 carbonos en su estructura, en lugar de 14). Los autores hallaron una reducción en la viabilidad de amastigotes luego de la incubación con los nanovehículos vacíos, sintetizados con un método idéntico al empleado por nosotros pero con distinto porcentaje de lípido y surfactante (ambos en 11% p/v frente a

nuestro 3% p/v de P188 y 2% p/p de MM). Los autores adjudicaron el resultado en la viabilidad de amastigotes a la presencia de una alta concentración de surfactante. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados sería interesante una revisión de esa conclusión, ya que en las concentraciones de trabajo no observamos efecto intrínseco del surfactante aislado (**Ver Material Suplementario FS2**). Desafortunadamente, aunque los autores también sintetizaron nanopartículas a partir de MM no las evaluaron *in vitro* frente a amastigotes por declarar una falta de estabilidad de estantería de la formulación.

Varios autores han propuesto que los lípidos pueden tener efectos antiprotozoarios. Se ha evidenciado la toxicidad de los lípidos de la leche humana en *Giardia lamblia* (50) por acción de la liberación de ácidos grasos que perturban la estructura de la membrana del parásito incrementando la fluidez de la esta o interaccionando con proteínas del citoesqueleto. En *Toxoplasma gondii* (51) la exposición a altas concentraciones (0,4 mM) de ácido oleico ocasiona la acumulación tóxica en cúmulos lipídicos que irrumpen con la viabilidad del parásito. En parásitos los ácidos grasos pueden afectar las membranas por diferentes mecanismos, por ejemplo, la incorporación a la bicapa lipídica o la integración a fosfolípidos, como sucede en *Plasmodium falciparum* y *Leishmania* (52-57). Un estudio muy interesante reportado en *Nature* en 2023 (58) expuso los efectos de la lipólisis sobre *T. brucei* y la toxicidad de los ácidos grasos liberados por los adipocitos sobre el parásito. *T. brucei* infecta tejido adiposo y encuentra allí un nicho para su replicación (58). Los autores describen el proceso de lipólisis en ratones C57BL/6J inducido por la misma infección con el parásito, y comprobaron que ratones genéticamente deficientes en una lipasa específica expresada en adipocitos tuvieron una menor pérdida de tejido adiposo, una carga parasitaria mayor y una menor tasa de supervivencia en comparación con ratones que sí expresaban el gen de la lipasa. Se probó que una concentración de 1,18 mM de ácido linoleico disminuyó la viabilidad de los parásitos un 80%, por lo que se propuso que el proceso de lipólisis protegió a ratones de la infección por el parásito. Si bien no se ha encontrado en bibliografía el estudio de la lipólisis de adipocitos sobre *T. cruzi*, y aunque la concentración mínima de MM que tiene efecto en nuestra formulación es 0,23 mM, sería interesante estudiar la sensibilidad de cepas de distintas DTU a una batería de ácidos grasos.

Acercándonos a nuestro trabajo, se reportó sensibilidad en *T. cruzi* a ácidos grasos saturados de 19, 20, 21 y 22 carbonos aislados de una bacteria marina brasileña (59). Los autores observaron morfologías aberrantes en los tripomastigotes expuestos a tales

ácidos grasos ( $EC_{50} = 65 \mu M$ ) y lo adjudicaron a un aumento de la permeabilidad de la membrana. Otros autores reportaron que ácidos grasos acetilénicos aislados de la planta *Porcelia macrocarpa* también perturban la membrana de *T. cruzi* (las  $EC_{50}$ s estuvieron en el rango 27-60  $\mu M$ ) (60). Como no se ha encontrado en bibliografía evidencia del efecto de los ésteres de ácidos grasos ni del ácido mirístico en *T. cruzi* sería muy interesante evaluar los efectos sobre la membrana mediante técnicas microscópicas. Recientemente se publicó un trabajo (61) en el cual prepararon NLC a partir de behenato de glicerol, un compuesto químico proveniente del enlace éster entre el ácido behenato (21 carbonos) y el glicerol. La proporción de fase lipídica y fármaco fue similar a la nuestra y la evaluación de la formulación en epimastigotes de la cepa Colombiana (DTU I) no mostró actividad de las nanopartículas vacías. Esto sugeriría que el efecto tripanocida sería específico de determinados lípidos o ácidos grasos o que distintos estadios del parásito y/o distintas cepas podrían tener sensibilidad diferencial a compuestos lipídicos.

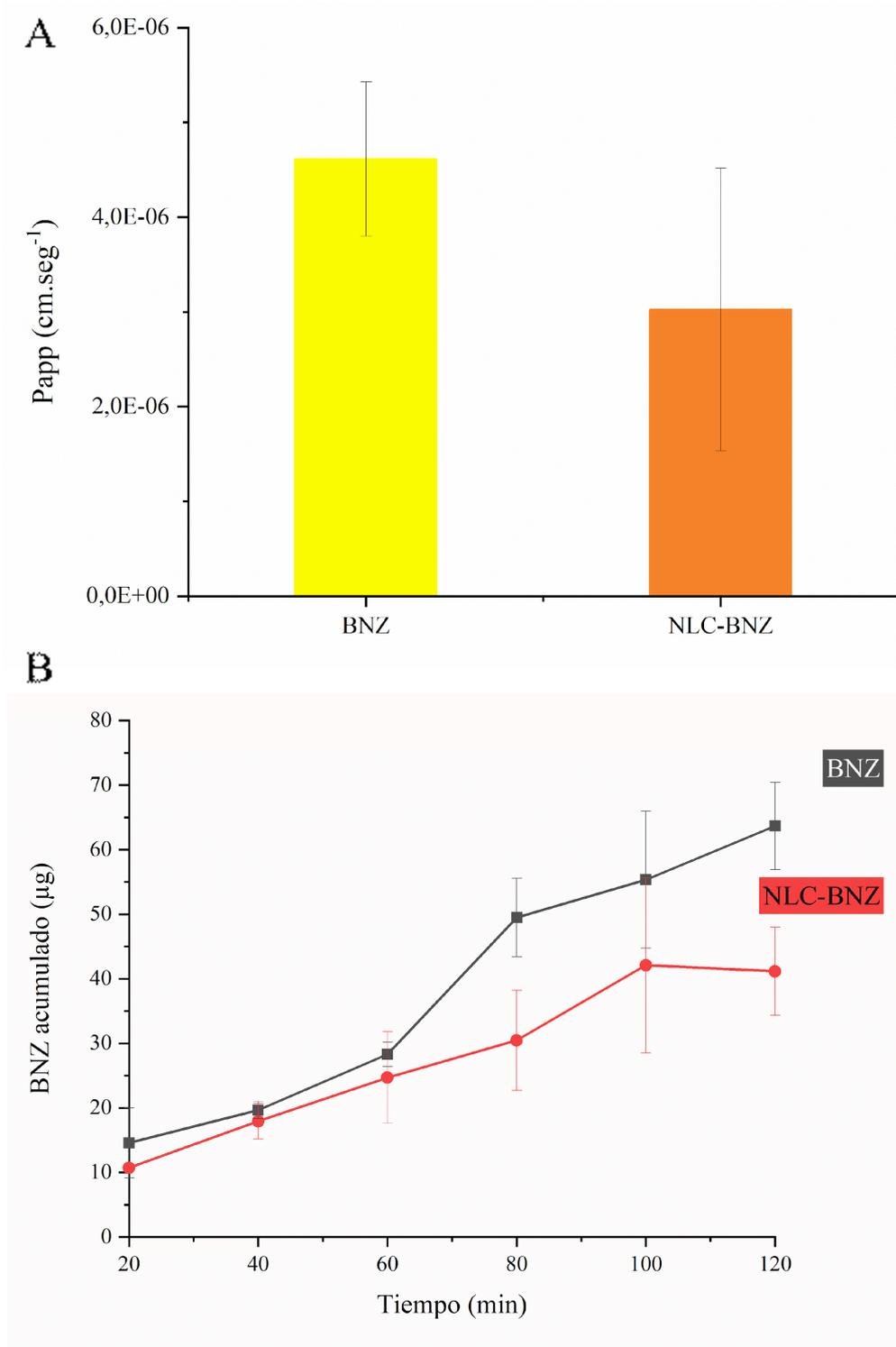
## 6. Ensayo de permeabilidad

El resultado del ensayo de permeabilidad *in vitro* sobre una monocapa de la línea celular Caco-2 se presenta en la **Figura 3.21**, reportando el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ,  $cm \cdot seg^{-1}$ ) calculado a partir de la Eq. 2.8. También se muestra un gráfico de cantidad acumulada de BNZ (en la cámara basolateral) versus tiempo.

Como se mencionó en el capítulo 1, el BNZ está clasificado, por algunos autores, como un fármaco de baja solubilidad en agua y baja permeabilidad. La permeabilidad podría estar comprometida por ser este fármaco sustrato del transportador de eflujo P-gp e inductor de su expresión (62, 63). Nuestra hipótesis acerca de la incorporación del BNZ en nanovehículos farmacéuticos para lograr un aumento en la biodisponibilidad del fármaco tuvo como una arista fundamental la posibilidad del incremento en la permeabilidad a través de membranas biológicas. Esta hipótesis se sustentó en trabajos previos de nuestro grupo con nanosistemas similares y otros sustratos de P-gp (64, 65), y por estudios de otros grupos que reportaron una mayor permeabilidad del BNZ nanoencapsulado (66). Sin embargo, en nuestro sistema, los  $P_{app}$  del fármaco y NLC-BNZ no difirieron estadísticamente, y se encontró que la cantidad de fármaco cuantificada en el punto final del experimento correspondió al 20% de la cantidad inicial colocada en la cámara dadora. Teniendo en cuenta que el EE, % de la

formulación fue del 80% podría considerarse que, durante el tiempo del experimento, solo permeó el fármaco no encapsulado, con la salvedad necesaria de que al no medir la presencia de nanopartículas en la cámara basolateral no podríamos descartar fehacientemente que hayan cruzado la monocapa celular. Por otra parte, nuestro experimento se realizó en condición de incubación estática, lo que pudo haber disminuido el transporte de las nanopartículas respecto a un sistema con agitación, como los empleados en los estudios previos de nuestro equipo de trabajo. El aporte de la agitación en el sistema *Transwell* a la permeabilidad se evidenció en un estudio de Kono y colaboradores (67) en el que incubaron, en monocapa de células Caco-2, liposomas catiónicos cargados con un plásmido albergando la secuencia de un gen reportero. La agitación del sistema favoreció la disminución del espesor de la capa de líquido estanca sobre las células favoreciendo la captación de los liposomas (frente a un control sin agitación). En cambio, los trabajos previos de nuestro grupo se desarrollaron en cámara Ussing<sup>®</sup>, en la que el burbujeo de aire produce un aporte convectivo a la permeabilidad (68). Otra cuestión por mencionar es que en los trabajos previos se utilizaron células MDCK-*mdr1*, células de riñón canino (*Madin-Darby canine kidney*) transfectadas con el gen *mdr-1* que codifica para una isoforma de la P-gp (69). La sobreexpresión de la P-gp en ese sistema provee mayor sensibilidad para detectar la influencia de ese transportador sobre el transporte de sus sustratos; en cambio, la línea Caco-2 que nosotros utilizamos posee una expresión basal del transportador de eflujo.

Por otro lado, estudios previos de permeabilidad de nanocápsulas lipídicas conteniendo BNZa través de una monocapa de Caco-2, evidenciaron el aporte del tamaño en la diferencia de permeabilidad, teniendo una mayor permeabilidad formulaciones neutras con partículas de 30 nm de tamaño (66), es decir, unas 5 veces menores a los tamaños obtenidos para nuestras formulaciones. Es probable que el tamaño de las nanopartículas haya influido en el resultado de la permeabilidad como también ha sido demostrado en otro modelo que incluyó la movilidad a través de la capa de mucus intestinal de conejo (70). En ese caso, nanopartículas con diferente tamaño permearon en mayor o menor medida encontrando que vehículos con un tamaño de 50 nm permearon unas 60 veces más que aquellos de 100 nm.



**Figura 3.21.** (A) Coeficiente de permeabilidad aparente y (B) cantidad de BNZ acumulado en la cámara basolateral de NLC-BNZ y el fármaco libre. Se informa el promedio y el desvío estándar (n=2).

## 7. Evaluación farmacocinética de la formulación

Se obtuvieron los perfiles de concentración plasmática versus tiempo a partir de los datos de concentración plasmática de BNZ, luego de una administración p.o. o i.p. del fármaco administrado como una suspensión o como NLC-BNZ (**Figura 3.22**). El cambio de composición en la formulación modificó el tamaño de las nanopartículas de  $150,65 \pm 4,74$  nm a  $184,4 \pm 1,5$  nm, el valor de PDI de  $0,202 \pm 0,009$  a  $0,215 \pm 0,011$  y el valor de  $\zeta$  disminuyó de  $-14,08 \pm 2,25$  mV a  $-22,70 \pm 1,41$  mV.

Se calculó el valor de las  $AUC_{0-\infty}$  y  $AUC_{0-t}$ . En el caso de la administración p.o. se utilizaron 2 ratones por tiempo por lo que, pese al número acotado de animales, se realizó la comparación estadística entre el tratamiento de BNZ y NLC-BNZ. Para ello, los datos de cada ratón a cada tiempo se asignaron aleatoriamente a uno de dos grupos, y con cada grupo se trazó un perfil plasmático para la comparación, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (**Tabla 3.6**).

Se ha reportado una absorción escasa/casi nula de SLN intactas en plasma luego de una administración oral de nanopartículas marcadas (71), consistente con nuestros estudios de permeabilidad. Si bien procesos de degradación química frente a las condiciones de pH en el tracto gastrointestinal o la presencia de esterasas estomacales o intestinales pudieron haber favorecido la liberación del principio activo desde las nanopartículas, reportes previos de ensayos de liberación de NLC de MM a pH 1,2 no mostraron diferencias en la liberación respecto a una condición de pH 6,8 (72). En caso de permanecer intactas, al no evidenciarse previamente un aumento en la permeabilidad, podría esperarse el resultado obtenido observando una velocidad de absorción aparentemente menor, dependiente de la liberación progresiva de BNZ desde el vehículo.

**Tabla 3.6.** Valores de AUC expresado como promedio (desvío estándar).

Tratamiento	$AUC_{0-t}$ ( $\mu$ M.h)	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu$ M.h)
<b>BNZ p.o.</b>	39,38 (1,43)	39,54 (1,33)
<b>NLC-BNZ p.o.</b>	42,37 (4,20)	42,39 (4,20)
<b>BNZ i.p.</b>	18,17	18,21
<b>NLC-BNZ i.p.</b>	27,49	27,51

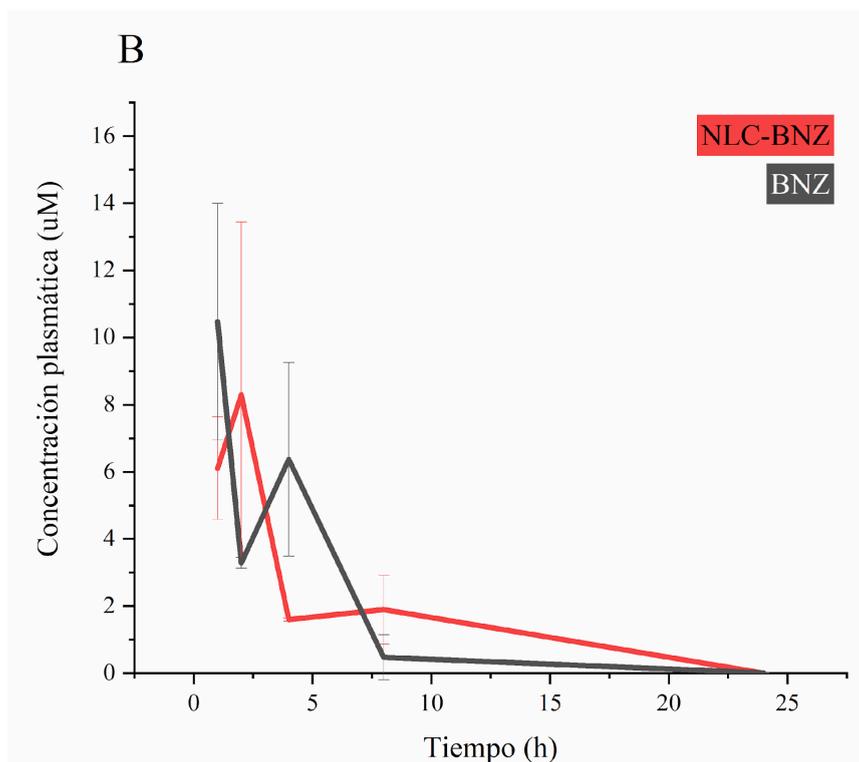
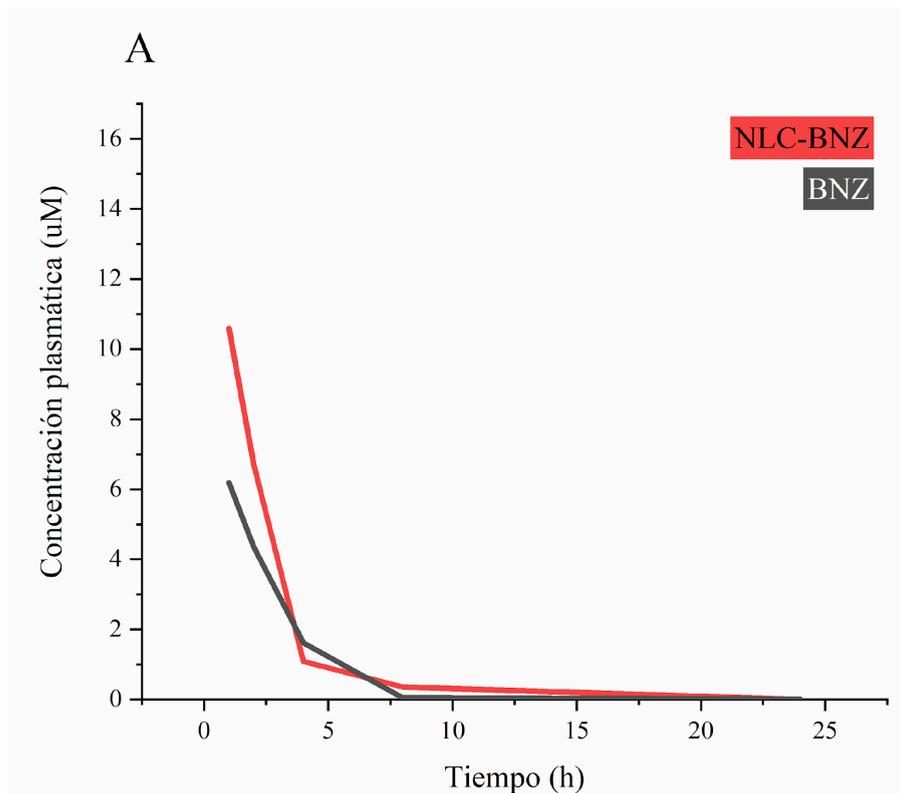
Se observó que el valor de AUC luego de la administración i.p. de BNZ fue menos de la mitad comparada con la media del AUC calculada luego de una administración p.o. Esto podría deberse a una disminución en la velocidad de disolución del BNZ debido al menor volumen de líquido existente en la cavidad intraperitoneal en relación con el duodeno; al presentarse una menor cantidad de moléculas de fármacos solubles en el medio de la cavidad es menor el pasaje a través de la membrana biológica, y por ende es menor la exposición al fármaco.

La diferencia entre el valor de AUC se mitigó en cierta medida si comparamos el BNZ nano encapsulado por ambas vías. Sin embargo, también se observó una disminución en el valor de AUC para NLC-BNZ administradas por vía i.p. La hipótesis aparejada en esta observación es el depósito de nanopartículas en la cavidad que no permitió el paso del BNZ a la circulación sistémica. Cabe resaltar la comparación entre los valores de AUC para los tratamientos en la vía de administración i.p. ya que se observó un valor mayor de AUC para NLC-BNZ en comparación con el fármaco libre (el AUC para BNZ es un 66% del área calculada para NLC-BNZ). Aunque la determinación por vía i.p. se realizó con un único animal por tiempo y se desconoce la variabilidad entre animales, los resultados sugieren que, por esta vía, la nanoencapsulación favorece la biodisponibilidad sistémica.

Por otra parte, el tiempo máximo de BNZ p.o. (1 hora) coincidió con el reportado en bibliografía para BNZ administrado p.o. a ratones hembra de la cepa Swiss ( $0,83 \pm 0,29$  hora) (73).

Otro aspecto para destacar es la presencia de dos picos en cada una de las curvas del fármaco administrado por vía oral. Se conoce que el BNZ es ampliamente metabolizado en el hígado formando el glucurónido de BNZ como uno de los productos principales. Este metabolito puede ser sometido a recirculación enterohepática en el organismo (74) aumentando la biodisponibilidad del fármaco, pudiendo este fenómeno ser evidenciado como el pico más pequeño en comparación a la concentración máxima observada a tiempos cortos. El segundo pico de NLC-BNZ también podría estar asociado con un mayor tiempo de residencia en el estómago para un porcentaje de nanopartículas atrapadas en la mucosa gástrica (71), y/o con la cinética de liberación del fármaco desde las nanopartículas. El estudio de permeabilidad sugeriría que las nanopartículas no son permeables por lo que el fármaco se absorbería a medida que se liberase de la matriz lipídica (la cinética de liberación del fármaco desde las nanopartículas observa una primera etapa de mayor cantidad de moléculas libres del fármaco seguido por una

aparición más lenta, por lo que podría primero absorberse una mayor cantidad de BNZ). El resultado del ensayo de permeabilidad también está relacionado con la arista que queda por mencionar, el aparente corrimiento hacia la derecha en el tratamiento con NLC-BNZ. Este comportamiento podría deberse, si se piensa en nanopartículas intactas, a una mayor lentitud en la absorción debida a la cinética de liberación desde el vehículo.

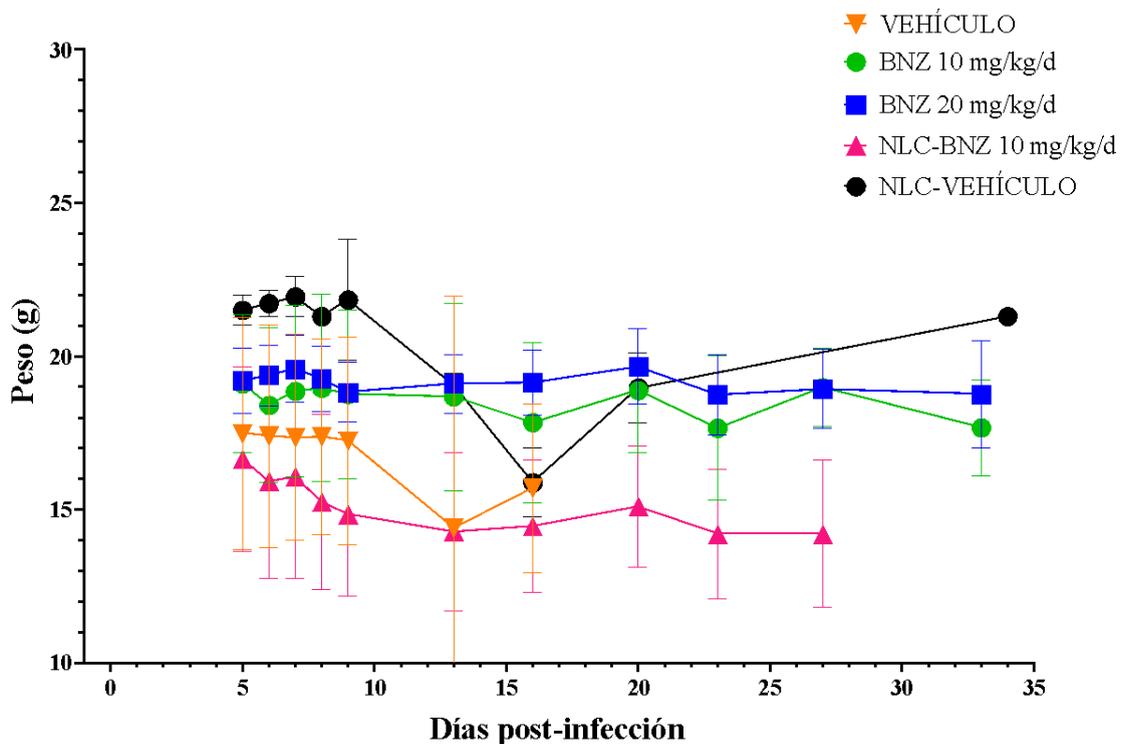


**Figura 3.22.** Perfiles plasmáticos de BNZ y NLC-BNZ luego de una administración i.p. (A) o p.o. (B). Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=2).

## 8. Evaluación en un modelo murino de infección aguda

La evaluación del desempeño de los tratamientos en el modelo de infección agudo se realizó mediante el seguimiento del peso, la parasitemia y la supervivencia de los ratones (**Figuras 3.23-3.25**).

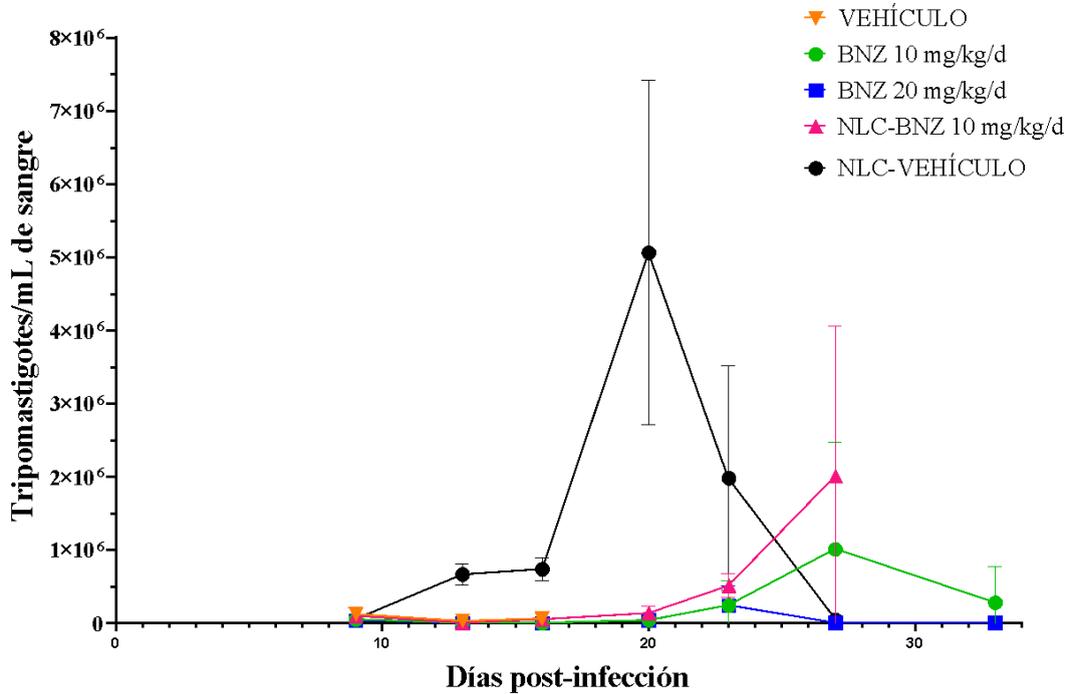
En primer lugar, se observó que la supervivencia y la parasitemia para los tratamientos 10 mg/kg/d y 20 mg/kg/d de BNZ fueron dosis-dependiente, siendo la supervivencia en este último tratamiento similar a la obtenida para la dosis estándar, cinco veces mayor, de BNZ en los ensayos agudos en ratones (100 mg/kg/d). Aquí, se utilizaron dosis sub-óptimas con el objetivo de poder evidenciar, de ser el caso, una posible mejoría aportada por los nanovehículos ya que con el régimen habitual los valores de parasitemia alcanzados se mantienen nulos hasta el final del experimento y el porcentaje de supervivencia es máximo (100%).



**Figura 3.23.** Evolución de pesos promedio por grupo durante el ensayo *in vivo*

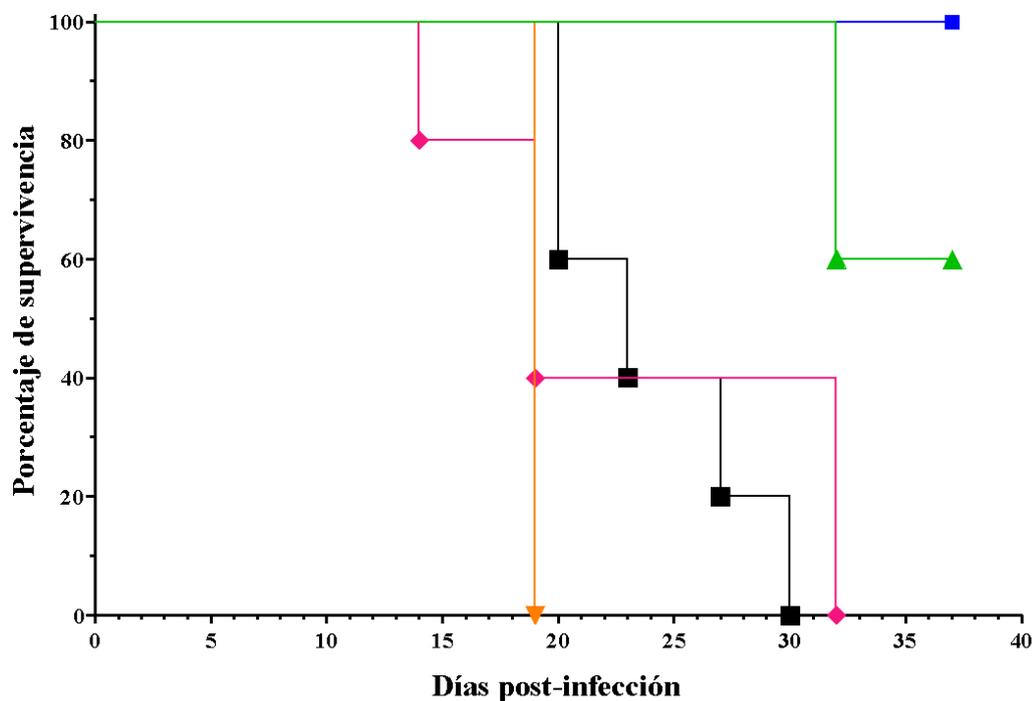
En el caso de los demás tratamientos, se observó que el control de la parasitemia del fármaco nanoencapsulado no se tradujo en menores niveles de tripomastigotes por mililitro de sangre periférica en comparación al tratamiento con el fármaco libre en suspensión (**Figura 3.24**), pero sí se encontró una mejoría respecto a las nanopartículas vacías. Por otra parte, la supervivencia de los ratones se vio disminuida (**Figura 3.25**) para el tratamiento con la formulación versus el fármaco libre, pero fue mayor en comparación a las nanopartículas vacías.

Por su parte, la curva de supervivencia presentó otro resultado interesante: los ratones tratados con NLC-VEHÍCULO tuvieron una mayor supervivencia en comparación al control del vehículo del fármaco libre (solución fisiológica + DMSO 20%). Se observó también que el promedio de pesos de los ratones tuvo una tendencia positiva en el primer grupo en comparación al grupo VEHÍCULO, lo que indica un mejor estado general del grupo NLC-VEHÍCULO. Es importante recalcar que podría adjudicarse el mayor tiempo de sobrevida al efecto intrínseco tripanocida del vehículo observado anteriormente en los ensayos *in vitro* (tripomastigotes y amastigotes).



**Figura 3.24.** Evolución de la parasitemia promedio por grupo durante el ensayo *in vivo*.

▼ VEHÍCULO ▲ BNZ 10 mg/kg/d ■ BNZ 20 mg/kg/d ◆ NLC-BNZ 10 mg/kg/d ■ NLC-VEHÍCULO



**Figura 3.25.** Curva de supervivencia durante la fase aguda de ratones Balb/c infectados con *T. cruzi* cepa RA, tratados con BNZ libre o nanoformulado en formulación lipídica (y sus respectivos controles). Se realizó la prueba log-rank para ver diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,001$ ).

El resultado del ensayo farmacocinético presentó valores de AUC sin diferencias entre BNZ y NLC-BNZ. El efecto farmacológico, por su parte, depende de la concentración del fármaco libre en el sitio de acción, que a su vez se vincula de manera directa con la concentración libre en plasma. A su vez, la concentración total y la concentración libre en plasma guardan asimismo una correlación directa, aunque no necesariamente proporcional (75). Se esperaría que la parasitemia y el porcentaje de supervivencia entre BNZ 10 mg/kg/d y NLC-BNZ 10 mg/kg/d fueran similares en caso de que la concentración plasmática correspondiera únicamente a fármaco liberado por el vehículo. No obstante, en caso de que parte de la droga entregada en NLC-BNZ accediera encapsulada a circulación sistémica, la relación entre fármaco total y fármaco libre en plasma podría variar con respecto a la que observaríamos en el caso de BNZ, impactando tal vez negativamente en los niveles de fármaco libre en el sitio de acción.

Por otro lado, hay que tener en consideración que el estudio farmacocinético se realizó en ratones sanos y es posible hallar diferencias en ratones infectados. Se ha reportado la comparación entre los valores de AUC, el aclaramiento, la constante de absorción, entre otros parámetros farmacocinéticos del BNZ, en un modelo murino de infección con *T. cruzi* frente a ratones sanos (76), identificando ciertas diferencias. En primer lugar, el AUC en ratones infectados fue menor, y la constante cinética de absorción mayor. Los autores remarcan los cambios fisiopatológicos asociados con la infección, tales como la expresión diferencial de transportadores de eflujo, dando lugar a los cambios en los valores de los parámetros. La expresión de P-gp disminuiría durante la infección (76), aumentando la constante cinética de absorción. No pueden descartarse otro tipo de interacciones entre la enfermedad y el vehículo nanoestructurado.

## Conclusiones parciales

Teniendo en cuenta el abanico de nano-formulaciones encapsulando BNZ que existen hasta la fecha, las formulaciones lipídicas aquí presentadas podrían considerarse novedosas en cuanto a los componentes lipídicos elegidos y la técnica de obtención implementada. En primer lugar, se obtuvieron formulaciones de nanopartículas encapsulando BNZ. Las imágenes de TEM mostraron una morfología de nanopartículas esféricas, y los experimentos térmicos, espectroscópico y de rayos X indicaron que el BNZ se encontró disperso en la matriz lipídica.

Las formulaciones mostraron un perfil de liberación del fármaco durante 24 horas, alcanzando una liberación acumulada máxima superior al 74%. El perfil de liberación se ajustó adecuadamente al modelo de Korsmeyer-Peppas con un exponente de liberación estimado de 0,56, lo que sugiere un mecanismo mixto de liberación con un componente dominante asociado a la liberación difusional desde la matriz lipídica. En cuanto a la estabilidad, los parámetros iniciales se mantuvieron estables durante los seis meses en los que se midieron.

Los experimentos *in vitro* en tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* mostraron un efecto similar contra ambos estadios del parásito al comparar el NLC-BNZ y el fármaco libre. Interesantemente, las nanopartículas vacías exhibieron actividad intrínseca contra el parásito. Mediante experimentos posteriores se atribuyó a uno de los constituyentes de la formulación, el MM, resultado relevante considerando el uso habitual de este excipiente en sistemas nanoparticulados, y en formulaciones líquidas y semisólidas. Si bien la formulación se constituyó además con un lípido líquido a temperatura ambiente, no se encontró efecto de este frente a tripomastigotes, tal vez debido a su baja concentración en el vehículo. Sería interesante estudiar el efecto de otros lípidos en el parásito para optimizar la eficacia de las formulaciones basadas en un posible efecto aditivo o sinérgico del BNZ y la formulación.

Los efectos citotóxicos en células de mamífero fueron menores para NLC-BNZ en comparación con el fármaco libre, lo que muestra un posible beneficio para el uso de nuestra formulación teniendo en cuenta que los pacientes discontinúan el tratamiento por el peso de los efectos adversos del mismo. No se determinó un efecto hemolítico perjudicial de las formulaciones, indicando un posible uso seguro de la vía parenteral como vía de administración.

Por otro lado, el resultado del ensayo farmacocinético no mostró diferencias significativas entre la exposición total del BNZ y el NLC-BNZ. Esto, sin embargo, no se trasladó al resultado del modelo murino de infección aguda, ya que en términos de supervivencia nuestra formulación tuvo un peor desempeño en comparación al fármaco libre. Sin embargo, el tratamiento con el fármaco encapsulado presentó una mejoría frente al control de vehículo y a las nanopartículas vacías. Más aún, los ratones tratados con estas últimas tuvieron un mayor porcentaje de supervivencia respecto al tratamiento con el vehículo, observación consistente con los resultados de la actividad tripanocida *in vitro* de la formulación vacía y del lípido constituyente de la formulación. Por otro lado, cabe destacar que luego de la administración i.p. se evidenció una tendencia a obtener un AUC mayor en el caso del BNZ encapsulado en comparación al libre, aunque por el momento no se realizaron réplicas para hacer una comparación estadística ni se evaluó la formulación versus el fármaco libre por esa vía en un modelo de infección aguda.

## Referencias

1. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: structure, preparation and application. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(3):305-13. DOI: 10.15171/apb.2015.043.
2. Vinuesa T, Herráez R, Oliver L, Elizondo E, Acarregui A, Esquisabel A, Pedraz J, Ventosa N, Veciana J, Benznidazole nanoformulates: a chance to improve therapeutics for Chagas disease. *J Trop Med Hyg.* 2017; (97):1469–1476. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0044.
3. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davaran F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018; (10):57. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.
4. Badran M. Formulation and *in vitro* evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. *Digest J Nanomater Biostruct.* 2014; (9) 83–91.
5. Chen M, Liu X, Fahr A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: *In vitro* study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm.* 2011; (408) 223–234. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.006.
6. Putri D, Dwiastuti R, Marchaban M, Nugroho A. Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation. *J Pharm Sci Commun.* 2017; (14) 79–85. DOI: 10.24071/jpsc.142728.
7. ImageJ, ImageJ, Inc Bethesda, MD. 2018.
8. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Lipid nanoparticles: production, characterization and stability. Ed. Springer Cham. 2014; p 59.
9. Mura P, Maestrelli F, D'Ambrosio M, Luceri C, Cirri M. 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.* 2021; 13(4):437. DOI:10.3390/pharmaceutics13040437.
10. Scioli-Montoto S, Sbaraglini M, Cisneros J, *et al.* Novel phenobarbital-loaded nanostructured lipid carriers for epilepsy treatment: from QbD to *in vivo* evaluation. *Front Chem.* 2022; (10): 908386. DOI:10.3389/fchem.2022.908386.
11. Maximian F, Monteiro K, Bahia M, de Sá-Barreto L, Soares da Cunha-Filho. Polymorphic screen and drug–excipient compatibility studies of the antichagasic benznidazole. *J Therm Anal Calorim.* 2011;(106):819-824. DOI: doi.org/10.1007/s10973-011-1371-6.
12. Castro S, Ribeiro L, Breitzkreitz M. *et al.* A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. *Sci Rep.* 2021; (11):21463. DOI:10.1038/s41598-021-99743-6.

- 13.**Ahsan A, Asadullah M, Hassan S, *et al.* DSC analysis of 5-FU (A), Precirol® ATO5 (B), Poloxamer 188 (C), Physical mixture (D), and optimized formulation (E). PLOS ONE. 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0281004.g004.
- 14.**Islan G, Tornello P, Abraha, G, Duran N, Castro G. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. Colloids Surf B Biointerfaces 2016; (143):168–176. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.040.
- 15.**Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). Biomaterials. 2003; (24):1781–1785. DOI: 10.1016/s0142-9612(02)00578-1.
- 16.**Espinosa Silva Y, Galvis F, Maldonado Rozo A. Purification of the antichagasic benzimidazole from the commercial preparation Rochegan®: characterization of inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin. Ciencia e Ing. 2018;(10):32-38. ISSN: 2145-2628.
- 17.**Nosal H, Moser K, Warzała M, Holzer A, Stańczyk D, Sabura E. Selected fatty acids esters as potential phb-v bioplasticizers: effect on mechanical properties of the polymer. J Polym Environ. 2021; (29):38–53. DOI: doi.org/10.1007/s10924-020-01841-5.
- 18.**Liu Y, Xu Y, Wu M, Fan L, He C, Wan J, Li P, Chen M, Li H. Vitamin E succinate-conjugated F68 micelles for mitoxantrone delivery in enhancing anticancer activity. Int J Nanomedicine. 2016; (11):3167–3178. DOI: 10.2147/IJN.S103556.
- 19.**Jenning V, Thünemann A, Gohla S. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids Int. J. Pharm. 2000; (199): 167–177. DOI:10.1016/s0378-5173(00)00378-1.
- 20.**Ambrosi M, Raudino M, Díazñez I, Martínez I. Non-isothermal crystallization kinetics and morphology of poly(3-hydroxybutyrate)/pluronic blends. Eur. Polym. J. 2019; (120): 109189. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2019.08.016.
- 21.**Rivas-Rojas P, Ollier R, Alvarez V, Huck-Iriart. Enhancing the integration of bentonite clay with polycaprolactone by intercalation with a cationic surfactant: effects on clay orientation and composite tensile properties. C.J. Mater. Sci. 2021; (56): 5595–5608. DOI:10.1007/s10853-020-05603-5.7.
- 22.**Nojima S, Terashima Y, Ashida T. Small-angle X-ray scattering study of the morphology of blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and polystyrene oligomer. 1986; (27): 1007–1013. DOI: 10.1016/0032-3861(86)90064-9.
- 23.**Bruschi ML. Mathematical models of drug release. In strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. Ed. Woodhead Publishing. 2015; p. 63–86.
- 24.**Bruschi, ML . Mathematical models of drug release. In strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. Ed. Woodhead Publishing. 2015; p. 87–194.
- 25.**Öztürk A, Aygül A, Şenel B. 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.* 2019; (54): 101240. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101240.

**26.**Gundogdu E, Demir E, Ekinci M, Ozgenc E, Ilem-Ozdemir D, Senyigit Z, Gonzalez-Alvarez I, Bermejo, M. An innovative formulation based on nanostructured lipid carriers for imatinib delivery: pre-formulation, cellular uptake and cytotoxicity studies. *Nanomaterials* 2022; (12): 250. DOI: 10.3390/nano12020250.

**27.**Wu K, Sweeney C, Dudhipala N, Lakhani P, Chaurasiya N, Tekwani B, Majumdar S. Primaquine loaded solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and nanoemulsion (NE): effect of lipid matrix and surfactant on drug entrapment, *in vitro* release, and ex vivo hemolysis. *AAPS PharmSciTech* 2021; (22): 240. DOI: 10.1208/s12249-021-02108-5.

**28.**Mühlen A zur. Feste Lipid Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilität, Charakterisierung, Freisetzungverhalten und -Mechanismen. 1996; p.432.

**29.**Rehman M, Madni A, Ihsan A, Khan W, Khan M, Mahmood M, Ashfaq M, Bajwa SZ, Shakir I. Solid and liquid lipid-based binary solid lipid nanoparticles of diacerein: *in vitro* evaluation of sustained release, simultaneous loading of gold nanoparticles, and potential thermoresponsive behavior. *Int J Nanomedicine.* 2015; (10): 2805–2814. DOI: 10.2147/IJN.S67147.

**30.**Kovačević A, Müller R, Savić S, Vuleta G, Keck C. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.* 2014; 444, 15–25. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.023.

**31.**Bhattacharya S, Ahir M, Patra P, Mukherjee S, Ghosh S, Mazumdar M, Chattopadhyay S, Das T, Chattopadhyay D, Adhikary A. PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a. *Biomaterials.* 2015; (51): 91–107. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.007.

**32.**Scioli-Montoto S, Muraca G, Ruiz M. Solid lipid nanoparticles for drug delivery: Pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Front Mol Biosc.* 2020; (7):587997. DOI: 10.3389/fmolb.2020.587997.

**33.**Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Artaza M, Moreno R, Perin L, Esquisabel A, Pinto L, Pedraz J. Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; (61). DOI:10.1128/aac.01912-16.

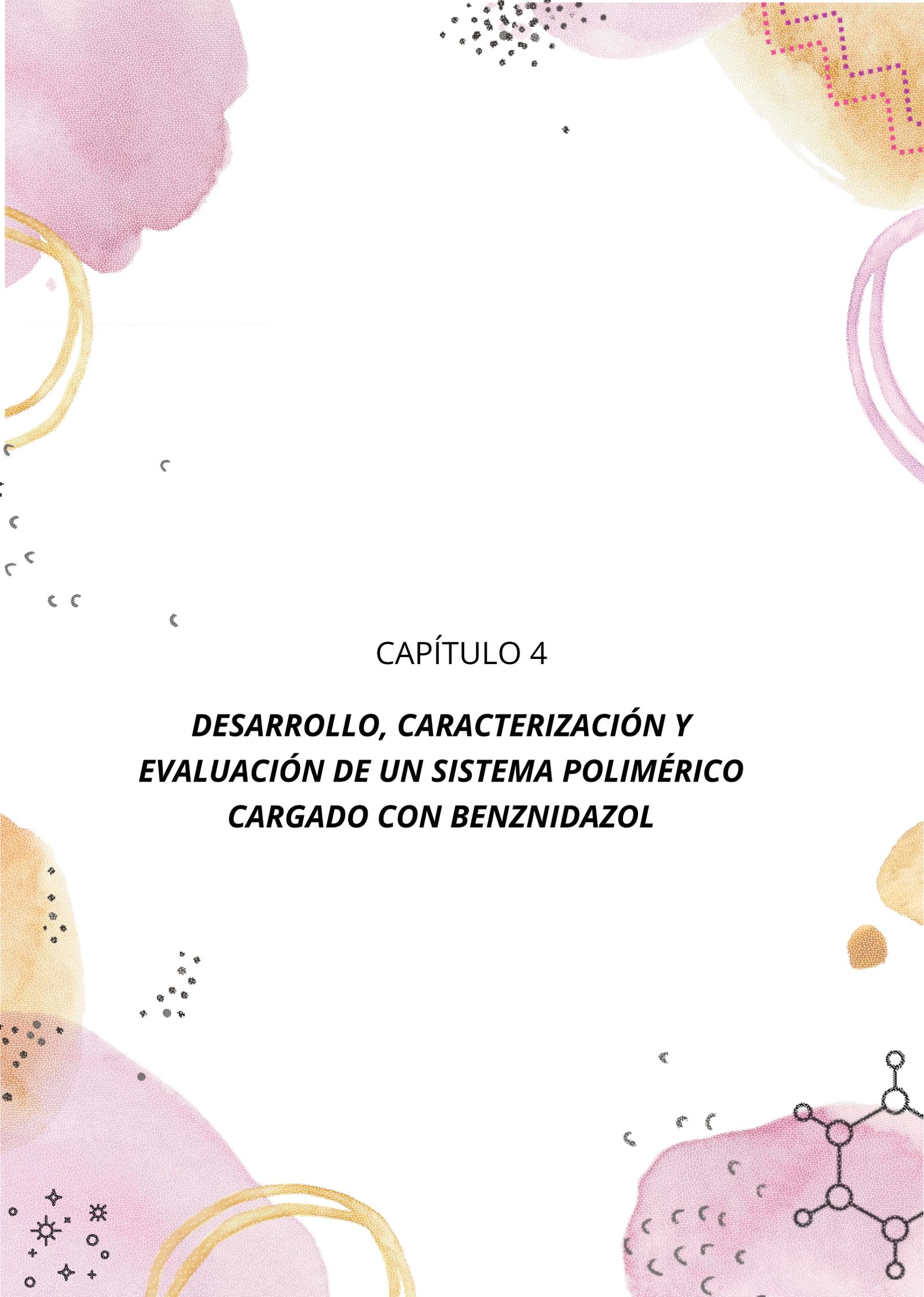
**34.**International Organization for Standardization, ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. 2009. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>. [Último acceso Junio 2024].

- 35.** Olivera M, Cucunubá Z, Valencia-Hernández C, Herazo R, Agreda-Rudenko D, Flórez C, Duque S, Nicholls R. Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. *PLOS ONE*. 2017; (12): e0185033. DOI:
- 36.** Snima K, Jayakumar R, Unnikrishnan A, Nair S, Lakshmanan V. O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells. *Carbohydr Polym*. 2012; (89): 1003–1007. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.04.050.
- 37.** Chen L, Fang L, Ling J, Ding C, Kang B, Huang C. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem Res Toxicol*. 2015; (28): 501–509. DOI:10.1021/tx500479m.
- 38.** Lin Y, Haynes C. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J Am Chem Soc*. 2010; (132): 4834–4842. DOI:10.1021/ja910846q.
- 39.** Chinnaiyan S, Karthikeyan D, Gadela V. Development and characterization of metformin loaded pectin nanoparticles for t2 diabetes mellitus. *Pharm Nanotechnol*. 2018; (6): 253–263. DOI: 10.2174/2211738507666181221142406.
- 40.** Dobrovolskaia M, Clogston J, Neun B, Hall , Patri A, McNeil S. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties *in vitro*. *Nano Lett*. 2008; (8): 2180–2187. DOI:10.1021/nl0805615.
- 41.** Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, *et al*. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3342-3349. DOI:10.1128/AAC.05018-14.
- 42.** Laboratorios Liconsa. Package insert: benznidazole tablets, for oral use. 2017. Disponible en: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209570lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf) [Último acceso Julio 2024].
- 43.** Miranda C, Solana M, Curto M, Lammel E, Schijman A, Soto C. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2015; (152):8-16. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.08.004.
- 44.** Herrera-Mayorga V, Lara-Ramírez E, Chacón-Vargas K, *et al*. Structure-based virtual screening and *in vitro* evaluation of new *Trypanosoma cruzi* cruzain inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(7):1742. DOI:10.3390/ijms20071742.
- 45.** Moraes C, Giardini M, Kim H, *et al*. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*. 2014; 4:4703. DOI:10.1038/srep04703.
- 46.** Revollo S, Oury B, Vela A, Tibayrenc M, Sereno D. *In vitro* benznidazole and nifurtimox susceptibility profile of *Trypanosoma cruzi* strains belonging to discrete typing units TcI, TcII, and TcV. *Pathogens*. 2019; (8): 197. DOI:10.3390/pathogens8040197.

47. Rashidi S, Karimi N, Li G, Sunden B. Progress in phase change nano-emulsions for energy applications-A concise review. *J Mol Liq.* 2023;387:122547. DOI: 10.1016/j.molliq.2023.122547.
48. Vela A, Coral-Almeida M, Sereno D, Costales J, Barnabé C, Brenière S. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(3):e0009269. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009269.
49. Ferreira M, de Almeida Júnior R, Onofre T, Casadei B, Farias K, Severino P, de Oliveira Franco, Raffin F, de Lima E Moura T, de Melo Barbosa R. Annatto oil loaded nanostructured lipid carriers: a potential new treatment for cutaneous leishmaniasis. *Pharmaceutics.* 2021; 13(11):1912. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111912.
50. Reiner D, Wang C, Gillin F. Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J Infect Dis.* 1986;154(5):825-832. DOI: 10.1093/infdis/154.5.825.
51. Nolan S, Romano J, Kline J, Coppens I. Novel approaches to kill *Toxoplasma gondii* by exploiting the uncontrolled uptake of unsaturated fatty acids and vulnerability to lipid storage inhibition of the parasite. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e00347-18. DOI:10.1128/AAC.00347-18.
52. Santos Ferreira D, de Castro Levatti E, Santa Cruz L, Costa A, Migotto Á, Yamada A, Camargo C, Christodoulides M, Lago J, Tempone A. Saturated iso-type fatty acids from the marine bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* with anti-trypanosomal potential. *Pharmaceutics.* 2024; 17(4):499. DOI: 10.3390/ph17040499.
53. Londero V, da Costa-Silva T, Gomes K, *et al.* Acetylenic fatty acids from *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: Effect of octadec-9-ynoic acid in plasma membrane electric potential. *Bioorg Chem.* 2018; 78:307-311. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.03.025.
54. Avis T, & Bélanger R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *AEM.* 2001: 67(2), 956–960. DOI: 10.1128/AEM.67.2.956-960.2001.
55. Hernández-Villegas M, Borges-Argáez R, Rodríguez-Vivas R., Torres-Acosta J, Méndez-González M, Cáceres-Farfán M. *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Vet Parasitol.* 2012; 189(2–4), 284–290. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.04.017.
56. Smith V, Desbois A, Dyrynda E. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar Drugs.* 2010; 8(4), 1213–1262. DOI: 10.3390/md8041213.
57. Gibson G, Ramirez D, Gibson G, Ramirez D, Maier J, Castillo C, Das S. *Giardia lamblia*: Incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids. *Exp. Parasitol.* 1999; 92(1), 1–11. DOI: 10.1006/expr.1999.4389.

58. Kumaratilake L, Robinson S, Ferrante A, Poulos A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: *In vitro* effects on *Plasmodium falciparum* and *in vivo* effects on *P. berghei*. JCI. 1993; 89(3), 961–967. DOI: 10.1172/jci115678.
59. Leroux M, Luquain-Costaz C, Lawton P, Azzouz-Maache S, Delton, I. Fatty acid composition and metabolism in leishmania parasite species: Potential biomarkers or drug targets for leishmaniasis? Int J Mol. Sci. 2023; 24(5), 4702. DOI: 10.3390/ijms24054702.
60. Machado H, Hofer P, Zechner R. *et al.* Adipocyte lipolysis protects mice against *Trypanosoma brucei* infection. Nat Microbiol. 2023; (8) 2020–2032. DOI: 10.1038/s41564-023-01496-7.
61. Silva F, Marques M, Yoshida M, Mussel W, Silveira J, Barroso P, *et al.* Encapsulation of benznidazole in nanostructured lipid carriers and increased trypanocidal activity in a resistant *Trypanosoma cruzi* strain. Braz J Pharm Sci Online. 2023; e22111-e22111.
62. Campos M, Castro-Pinto D, Ribeiro G, Berredo-Pinho M, Gomes L, da Silva Bellieny M, *et al.* P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. Parasitol Res. 2013;112(6):2341-51. DOI: 10.1007/s00436-013-3398-z.
63. Perdomo V, Rigalli J, Villanueva S, Ruiz M, Luquita M, Echenique C, Catania V. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(10):4894-902. DOI: 10.1128/AAC.02531-12.
64. Scioli-Montoto S, Sbaraglini M, Talevi A, *et al.* Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and *in vitro/in vivo* evaluation. Colloids Surf B Biointerfaces. 2018;167:73-81. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.03.052.
65. Scioli-Montoto S, Muraca G, Di Ianni M, Couyoupetrou M, Pesce G, Islan G, *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. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102470.
66. Arrua E, Hartwig O, Loretz B, Murgia X, Ho D, Bastiat G, *et al.* Formulation of benznidazole-lipid nanocapsules: Drug release, permeability, biocompatibility, and stability studies. Int J Pharm. 2023;642:123120. DOI:10.1016/j.ijpharm.2023.123120.
67. Kono Y, Iwasaki A, Matsuoka K, Fujita T. Effect of mechanical agitation on cationic liposome transport across an unstirred water layer in Caco-2 cells. Biol Pharm Bull. 2016;39(8):1293-9. DOI: 10.1248/bpb.b16-00050.
68. Thomson A, Smart K, Somerville M. *et al.* The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. BMC Gastroenterol. 2019; 19, 98. DOI: 10.1186/s12876-019-1002-4.
69. Volpe DA. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. Future Med Chem. 2011;3(16):2063-2077. DOI:10.4155/fmc.11.149.

70. Bandi S, Kumbhar Y, Venuganti V. Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier. *J Nanoparticle Res.* 2020;22(3):62. DOI: 10.1007/s11051-020-04785-y.
71. Yu Z, Fan W, Wang L, Qi J, Lu Y, Wu W. Effect of surface charges on oral absorption of intact solid lipid nanoparticles. *Mol Pharm.* 2019;16(12):5013-5024. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00861.
72. Scioli-Montoto. Desarrollo racional de sistemas terapéuticos nanométricos para el tratamiento de la epilepsia refractaria. UNLP. 2021; p. 148. DOI: 10.35537/10915/121877.
73. Perin L, Moreira da Silva R, Fonseca K, Cardoso J, Mathias F, Reis L, Molina I, Correa-Oliveira R, Vieira P, Carneiro C. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61. DOI:10.1128/aac.02410-16.
74. Altcheh, J., Freilij, Chagas Disease. Springer. 2020; p.299-312.
75. Talevi A. The ADME Encyclopedia. Springer US; 2022. p. 492-498.
76. de Jesus S, Pinto L, Moreira F, Nardotto G, Cristofolletti R, Perin L, Fonseca K, Barbêdo P, Bandeira L, Vieira P, Carneiro C. Pharmacokinetics of benznidazole in experimental chronic chagas disease using the Swiss mouse–berenice-78 *Trypanosoma cruzi* strain model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65. DOI:10.1128/aac.01383-20.



## CAPÍTULO 4

# ***DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA POLIMÉRICO CARGADO CON BENZNIDAZOL***

# Capítulo 4

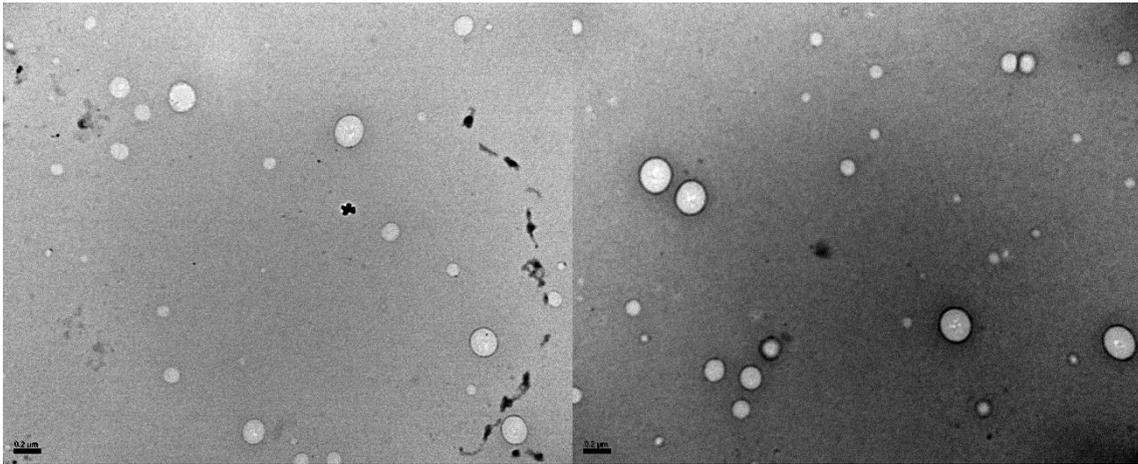
*Desarrollo, caracterización y evaluación de un sistema polimérico cargado con benznidazol.*

## Resultados y discusión

### 1. Formulación y caracterización fisicoquímica de EU-BNZ y EU-VEHÍCULO

Las nanopartículas fueron preparadas utilizando el método de ultrasonicación y se denominaron EU-BNZ o EU-VEHÍCULO según contuvieran o no BNZ, respectivamente. Como resultado, se obtuvieron formulaciones de nanopartículas con morfología esférica, homogéneas y estables en el tiempo. La eficiencia de encapsulación (EE, %) de BNZ tuvo un valor alrededor del  $75,21 \pm 8,59\%$ , indicando una buena incorporación del fármaco en la matriz polimérica. Se comparó este resultado con el obtenido según reportes en literatura de nanopartículas poliméricas encapsulando BNZ encontrando un valor de EE, % para nuestro sistema algo menor al informado para otras nano y micropartículas (86%, >78%) (1, 2). La carga teórica de BNZ en el polímero fue de 2,5 %p/p.

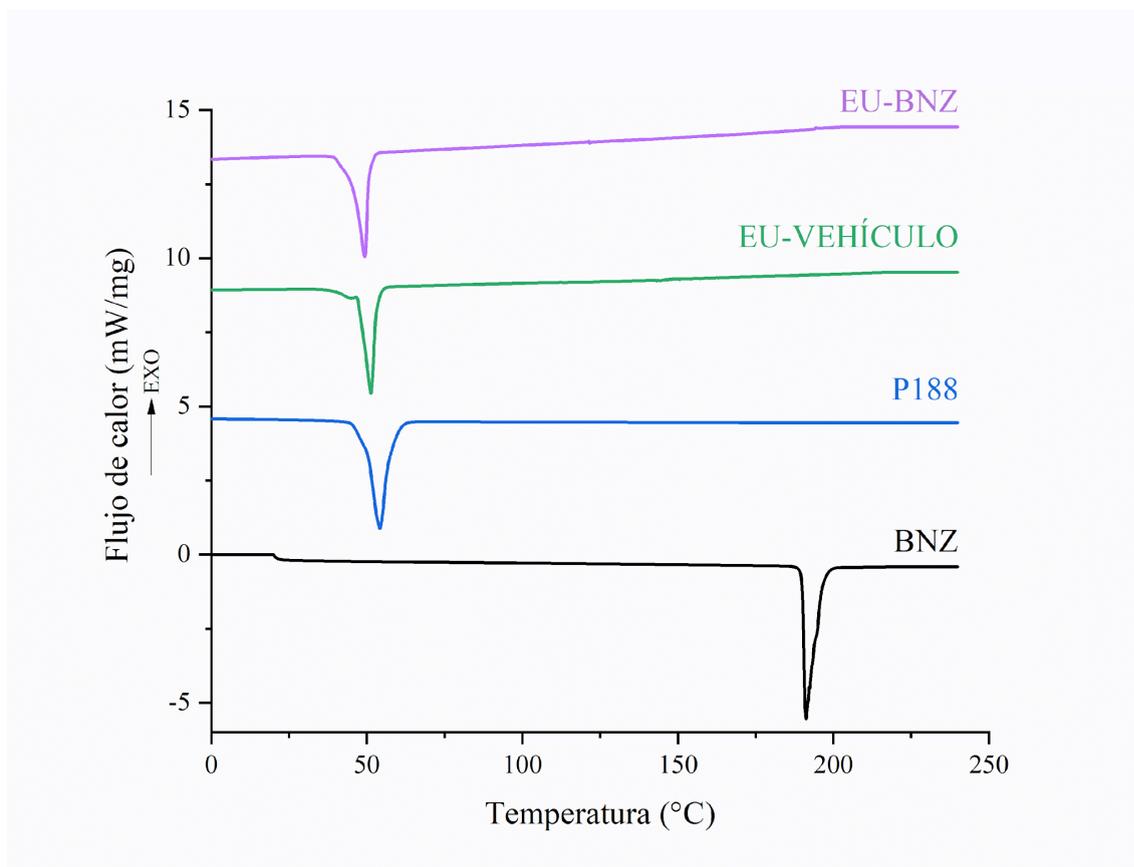
Se observó la formulación EU-BNZ mediante TEM (**Figura 4.1**) y se confirmó la presencia de nanopartículas con morfología esférica y una distribución de tamaños reducida. Se utilizó el software *ImageJ* (3) para analizar las imágenes y determinar el diámetro de las poblaciones de nanopartículas. Se observaron principalmente dos poblaciones de tamaños, la mayor con un valor medio de  $157 \pm 5$  nm, y la menor con un diámetro promedio alrededor de 50 nm, siendo esta última posiblemente atribuida a micelas que se generan por la presencia del surfactante libre (4).



**Figura 4.1.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de EU-BNZ.

El diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas medido por DLS fue de  $157,12 \pm 1,97$  nm, con una distribución de tamaños correspondiente a un PDI de  $0,026 \pm 0,018$ , diez veces menor que el valor de PDI en las formulaciones lipídicas. Un valor de PDI de 0,2 o menor sugiere valores de homogeneidad aceptables para nanopartículas obtenidas a partir de materiales poliméricas (5). Esto habla de una dispersión de tamaños menor, lo que también se evidenció mediante TEM. Además, el tamaño de las nanopartículas coincide con el valor obtenido por difracción de rayos X (ver **Figura 4.8**). El  $\zeta$  se midió por anemometría de Doppler y se encontró en un valor promedio de  $-34,32 \pm 5,44$  mV. Valores negativos de  $\zeta$  contribuyen a la estabilidad de la formulación evitando la aglomeración de las nanopartículas por repulsión electrostática (6).

A continuación, se realizaron análisis por DSC y TGA, a fin de determinar la estabilidad térmica y los procesos de fusión/recristalización de los componentes luego de la encapsulación del fármaco. Se presentan los termogramas de DSC para el fármaco libre, y las formulaciones con y sin fármaco en la **Figura 4.2**, y los datos de  $T_m$  y  $\Delta H_f$  para el cálculo del índice de cristalinidad (IC, %) en la **Tabla 4.1**.



**Figura 4.2.** Termogramas de BNZ, P188, EU-VEHÍCULO Y EU-BNZ.

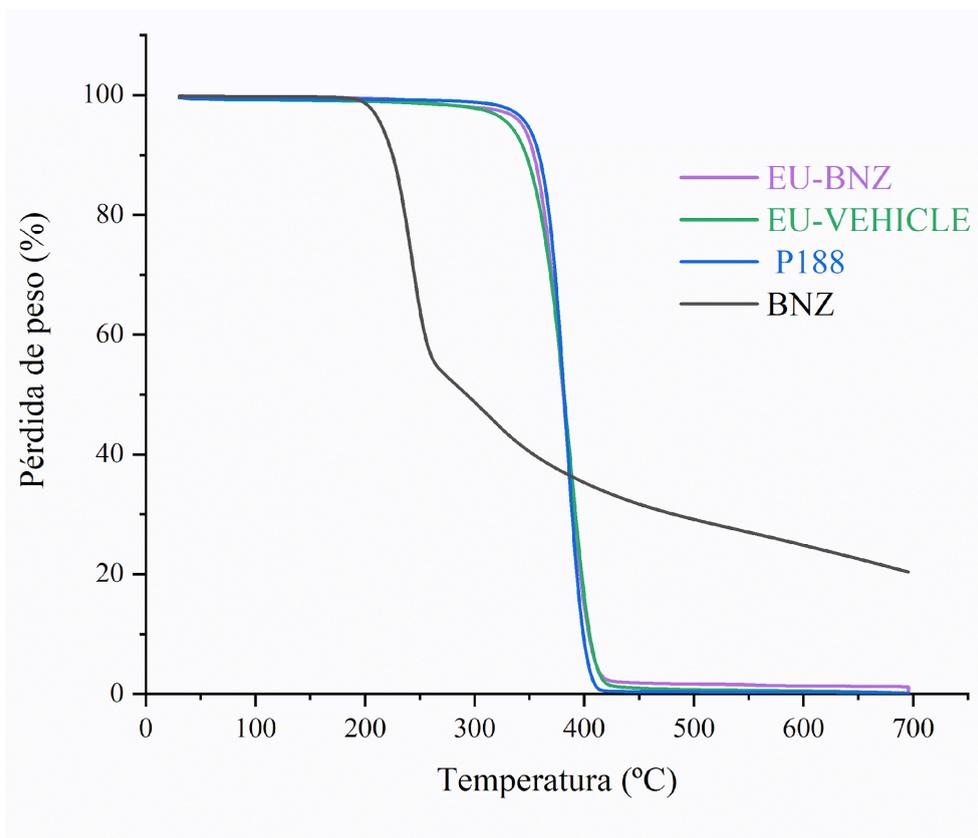
El BNZ mostró un solo pico endotérmico del BNZ correspondiente a su punto de fusión (191,2 °C) (7) al igual que el termograma para el polímero P188, utilizado como surfactante de la formulación, con un solo pico en su temperatura de fusión (52 °C) (8). Similarmente, tanto para EU-VEHÍCULO como para EU- BNZ, se observó un solo pico endotérmico que se atribuye al P188. A partir de bibliografía se incorporó al análisis el termograma de Eudragit NE-30D para el polímero sólido, y se encontró que posee una temperatura de fusión a 60 °C, por lo que se descarta que el pico de los termogramas de las formulaciones se corresponda con la temperatura de fusión del Eudragit (9), ponderando, además, las cantidades que cada polímero aporta a la formulación. Por otro lado, no se observó un pico en el termograma de EU-BNZ que coincidiera con de fusión del fármaco, lo que sugiere que el BNZ estaría disperso en la matriz polimérica de manera amorfa así como se observó previamente para el fármaco en la matriz lipídica (ver **Figura 2.3**).

**Tabla 4.1.** Propiedades térmicas de BNZ, P188, EU-VEHÍCULO y EU-BNZ.

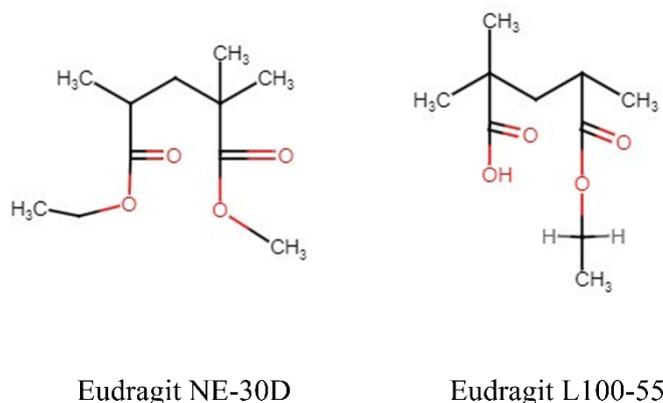
MUESTRA	Tf (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	IC%
<b>BNZ</b>	<b>191,2</b>	<b>142,3</b>	<b>100</b>
P188	54,2	148,8	100
<b>EU-VEHICULO</b>	<b>51,3</b>	<b>95,2</b>	<b>31,9</b>
EU-BNZ	49,6	96,3	32,4

Se calculó el IC, % a partir de los valores  $\Delta H_f$  de las formulaciones y P188 al tratarse del componente que aporta al pico de fusión (**Tabla 4.1**). Los valores de IC, % para las formulaciones reflejan un desordenamiento de las moléculas de P188 de igual grado tanto en las nanopartículas sin encapsular fármaco como en las que contienen BNZ, reflejo de la incorporación de moléculas de Eudragit que aportan a la desorganización en la estructura del polímero.

Por otro lado, se estudió el análisis térmico de pérdida de masa mediante TGA. Se obtuvieron las curvas termogravimétricas de P188, BNZ, EU-VEHÍCULO y EU-BNZ (**Figura 4.3**). La curva de BNZ mostró un único proceso de degradación en el rango de 200- 300 °C, similar al reportado en (10) perdiendo el 80% de su masa hasta finalizar el experimento. Las curvas de P188, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO mostraron un único y similar proceso de degradación térmica que comenzó a los 350 °C y finalizó a los 400 °C, llegando a la pérdida total de las masas de las muestras. En base a esta observación se podría atribuir el comportamiento térmico de las formulaciones a la pérdida de peso del P188. No se registra en bibliografía el termograma para Eudragit NE-30D. La degradación térmica más similar que se encontró fue realizada para el Eudragit L100-55 cuya estructura química tiene analogía al NE-30D (**Figura 4.4**). El mayor proceso de degradación térmica para el polvo de Eudragit L100-55 sucede a los 390 °C (11), por lo que si hubiera contribución de la degradación del NE-30D en nuestros resultados, probablemente estarían solapados con el proceso de degradación del P188, y tal vez podrían denotarse si se utilizara el polvo del polímero como excipiente y no la suspensión acuosa de la que partimos. Por último, cabe recalcar que no se evidencia el proceso de degradación del cristal del fármaco en la formulación sumando a la evidencia de su incorporación a las nanopartículas en un estado amorfo.



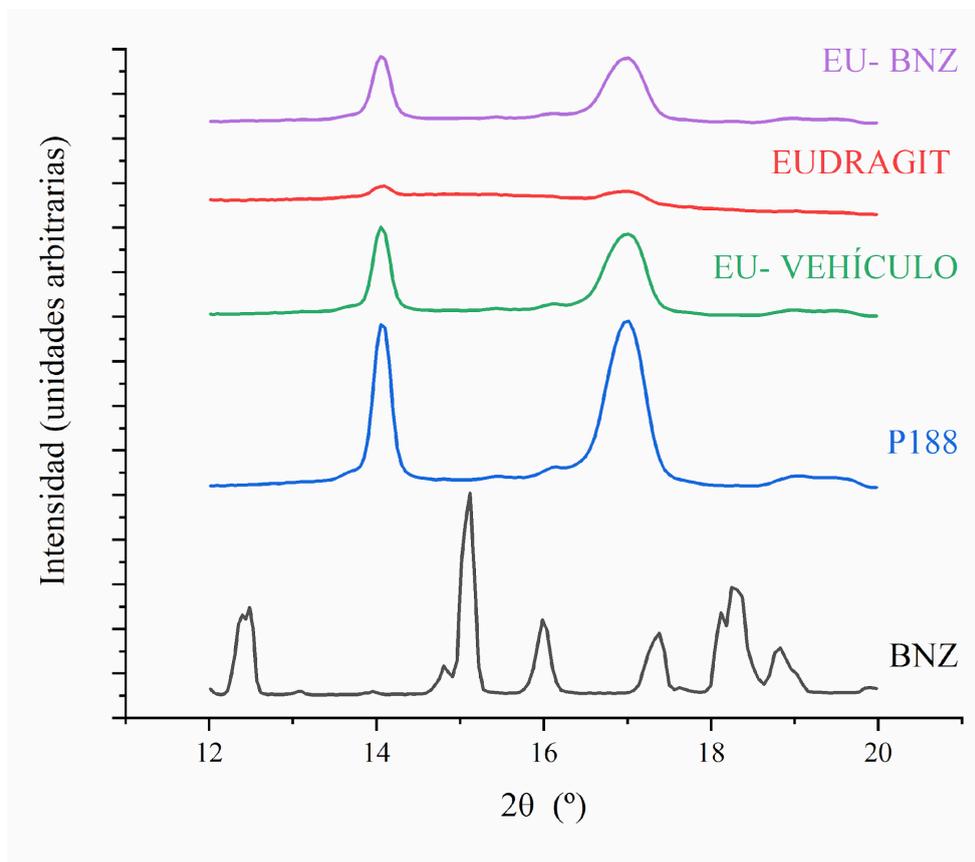
**Figura 4.3.** Termogramas de BNZ, P188, EU-VEHÍCULO Y EU-BNZ.



**Imagen 4.4.** Estructuras químicas del Eudragit L100-55 y NE-30D.

Complementariamente, se realizó el análisis de los datos obtenidos en los experimentos de cristalografía de rayos X. El análisis estructural se realizó seleccionando diferentes regiones angulares de los patrones de SAXS y WAXS. Los patrones de WAXS de las muestras liofilizadas (**Figura 4.5**) mostraron los dos picos de difracción principales del P188 a 14 y 17 nm<sup>-1</sup>. El Eudragit puro también presentó una contribución muy débil en esta región. Estas contribuciones podrían atribuirse a la presencia de nonoxinol utilizado

como surfactante para dispersar al polímero en agua. No hubo contribuciones de picos de difracción del fármaco en los patrones de EU-BNZ, lo que sugiere su incorporación amorfa.



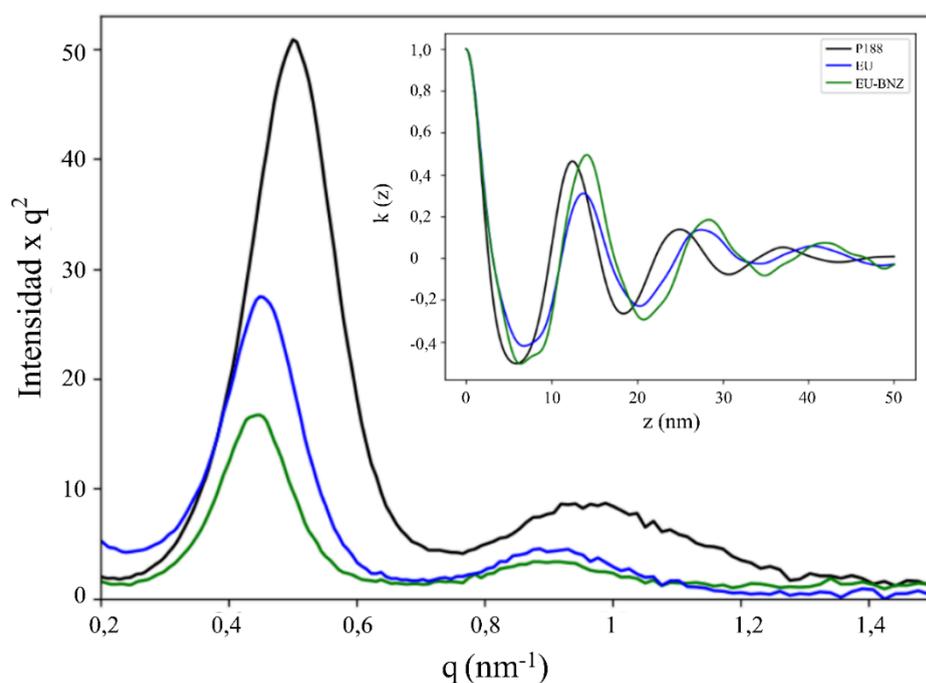
**Figura 4.5.** Espectros WAX para BNZ, EUDRAGTIT PURO, P188, EU-VEHÍCULO Y EU-BNZ.

Desde ángulos más pequeños, las muestras liofilizadas exhibieron una estructura tipo lamelar (12) atribuida al arreglo supramolecular del P188; este tipo de estructura también se observó en otros sistemas nanoparticulados en presencia de P188 (13). El gráfico de Lorentz/Kratky ( $q^2I$  vs  $q$ ) se muestra en la **Figura 4.6** donde la posición de los picos cambia en las muestras. Para un análisis más detallado, se empleó una función de correlación 1D para recuperar los parámetros estructurales del arreglo lamelar (14, 15). La transformación se muestra en la parte interna de la **Figura 4.6**. Los parámetros lamelares obtenidos a partir de la curva de correlación se muestran en la **Tabla 4.2**. El período largo aumentó desde el P188 puro hasta el EU-BNZ. El período largo, que es el

grosor lamelar, contiene dos contribuciones: el grosor amorfo y cristalino. Interesantemente, el parámetro más afectado fue el grosor cristalino.

**Tabla 4.2.** Parámetros lamelares obtenidos a partir de la curva de correlación 1D.

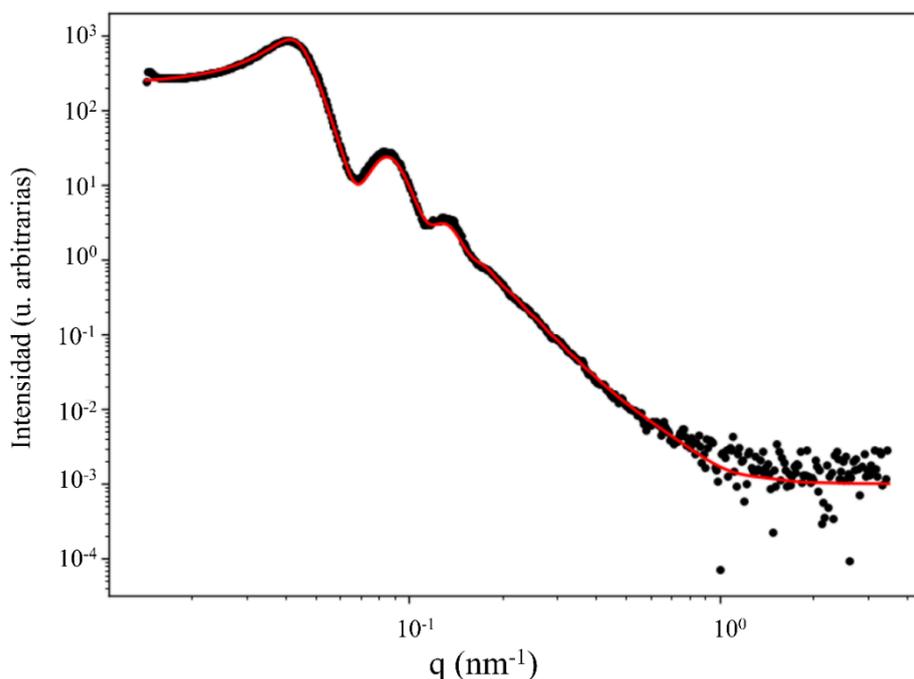
MUESTRA	Período largo (nm)	Espesor amorfo (nm)	Espesor cristalino (nm)	Polidispersión	Cristalinidad local
<b>P188</b>	<b>12,37</b>	<b>4,42</b>	<b>7,95</b>	<b>0,44</b>	<b>0,64</b>
EU-VEHÍCULO	13,71	4,63	9,08	0,37	0,66
<b>EU-BNZ</b>	<b>14,04</b>	<b>4,63</b>	<b>9,41</b>	<b>0,44</b>	<b>0,67</b>



**Figura 4.6.** Esquema Lorentz para patrones SAXS para EU, EU-BNZ y P188. El gráfico más pequeño muestra la transformación para la correlación lineal de los sistemas lamelares.

El Eudragit® puro disperso en solución mostró un patrón típico de nanopartículas esféricas con interacción de esferas duras debido a la alta concentración (16), como se

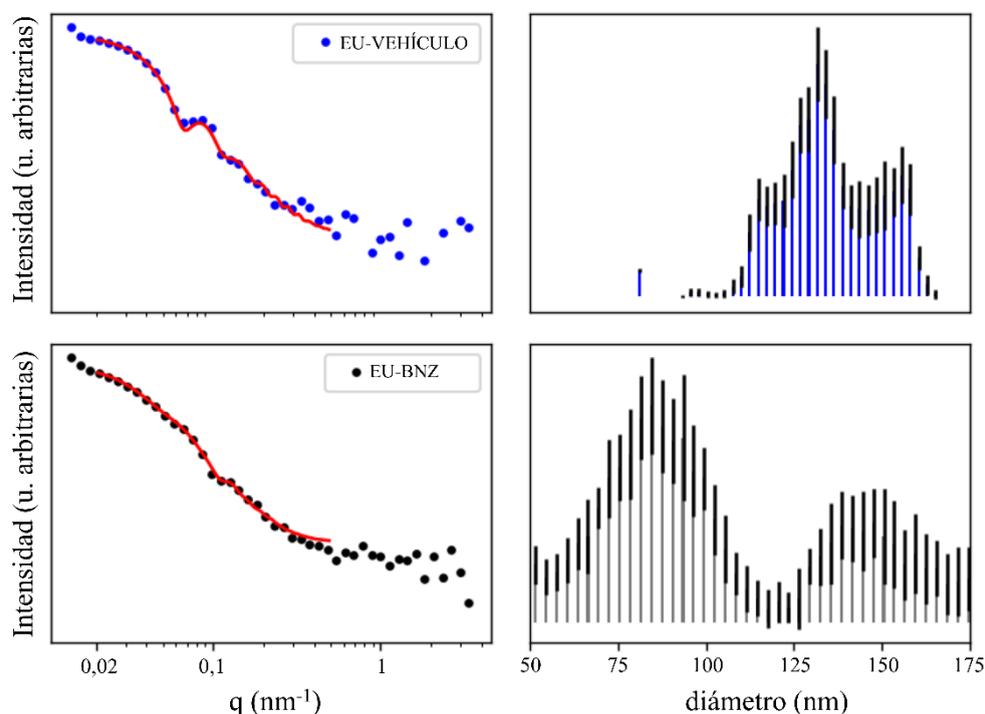
muestra en la **Figura 4.7**. El tamaño medio de diámetro fue de  $128,0 \pm 0,2$  nm con un Pdl de 0,1.



**Figura 4.7.** Patrones SAXS para EU puro en suspensión.

Los sistemas EU-VEHÍCULO y EU-BNZ (**Figura 4.8**) no mostraron ninguna estructura lamelar en el patrón SAXS. La estructura lamelar se debe al P188 utilizado como surfactante para dispersar las nanopartículas en la solución. El poloxamer hinchado perdió su disposición estructural y solo quedó el núcleo de nanopartículas con contraste suficiente. La distribución de tamaños del diámetro se obtuvo mediante simulación de Monte Carlo utilizando el programa McSAS (EE. UU.) (17). Las nanopartículas vacías de Eudragit mostraron un tamaño medio de diámetro similar al del Eudragit puro en solución, mientras que la carga con BNZ afectó significativamente el tamaño y la forma del núcleo de la nanopartícula. Bajo la suposición esférica, se observaron dos poblaciones alrededor de 80 y 150 nm. La población de mayor tamaño puede ser atribuida a las nanopartículas cargadas con BNZ (en concordancia con los resultados de TEM y DLS) mientras que la población menor puede deberse a artefactos de las síntesis (BNZ libre, surfactante, emulsiones secundarias). Por lo tanto, los resultados sugieren que el fármaco estaría alterando la estructura interna de la nanopartícula original, lo cual

resulta lógico considerando la naturaleza hidrofóbica del BNZ y el polímero Eudragit®NE30D (un copolímero neutro basado en etil acrilato y metil metacrilato).

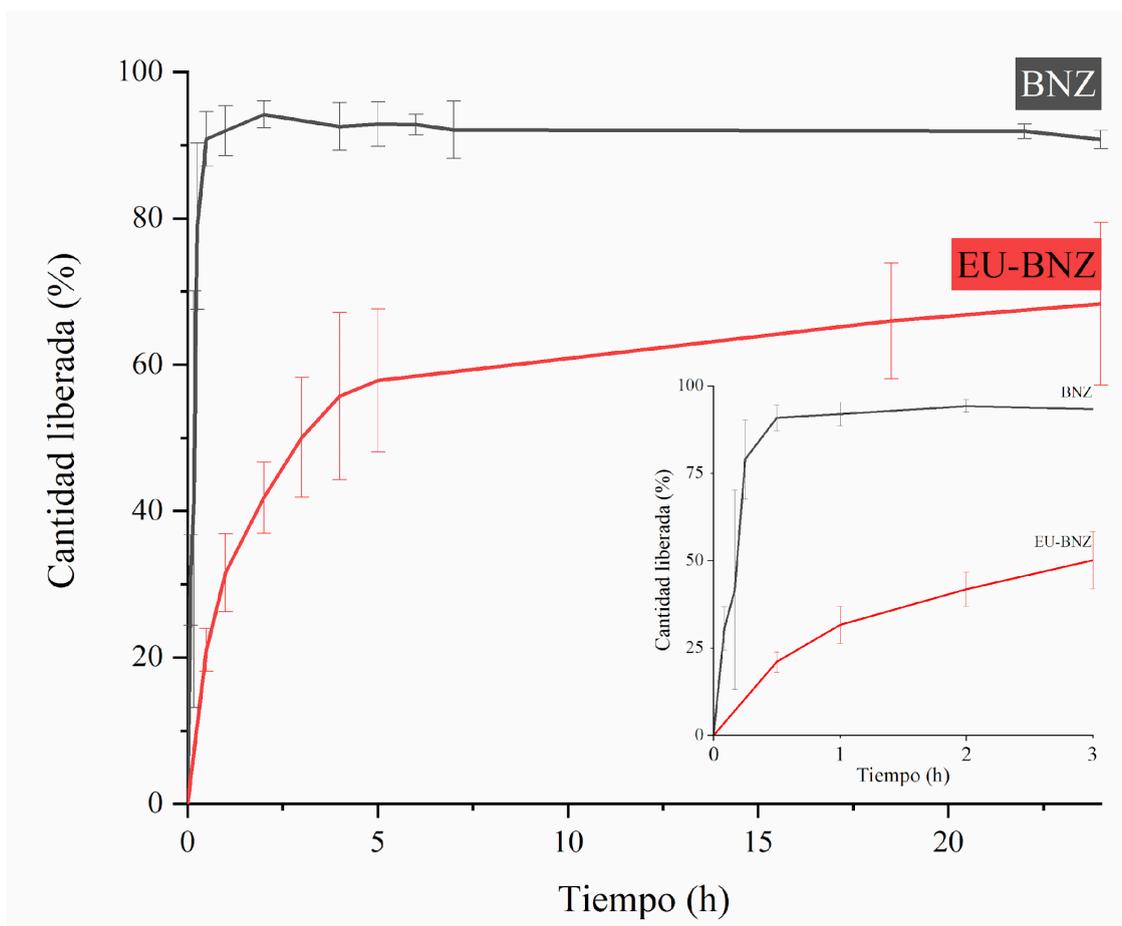


**Figura 4.8.** Patrones SAXS para EU-VEHÍCULO y EU-BNZ.

## 2. Ensayos de liberación y estabilidad fisicoquímica

Pasando al ensayo de liberación del BNZ desde las nanopartículas poliméricas, en primer lugar, se observó que el 90 % del fármaco se disolvió durante los primeros 30 minutos del experimento mientras que el 21% de BNZ fue liberado desde la formulación en ese lapso (**Figura 4.9**). Al inicio de la liberación se observó un proceso más rápido que fue declinando en velocidad dando lugar a una liberación sostenida de fármaco. Al igual que para las formulaciones lipídicas, la liberación inicial más rápida podría explicarse teniendo en cuenta la cantidad de moléculas de fármaco libre en las formulaciones (20% de la carga inicial del fármaco), y además, las moléculas de BNZ ubicadas más cercanas a la superficie de las nanopartículas que difunden rápidamente hacia el exterior del vehículo. Por otro lado, la liberación gradual del BNZ observada a continuación de esa etapa inicial podría deberse al movimiento de moléculas del fármaco desde el interior de las nanopartículas donde se encontraría el fármaco en estado amorfo según las metodologías de

caracterización fisicoquímica mencionadas anteriormente. Si el movimiento del BNZ desde las nanopartículas fuera netamente difusional, a medida que el gradiente de concentración del fármaco fuese disminuyendo con el tiempo, la velocidad de liberación acompañaría esa disminución. Aquí, este suceso no se evidencia ya que el experimento se realizó en condición de sumidero y/o porque en la liberación del fármaco podría contribuir la relajación de las cadenas poliméricas.



**Figura 4.9.** Perfil de liberación *in vitro* de BNZ y EU-BNZ. Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=3).

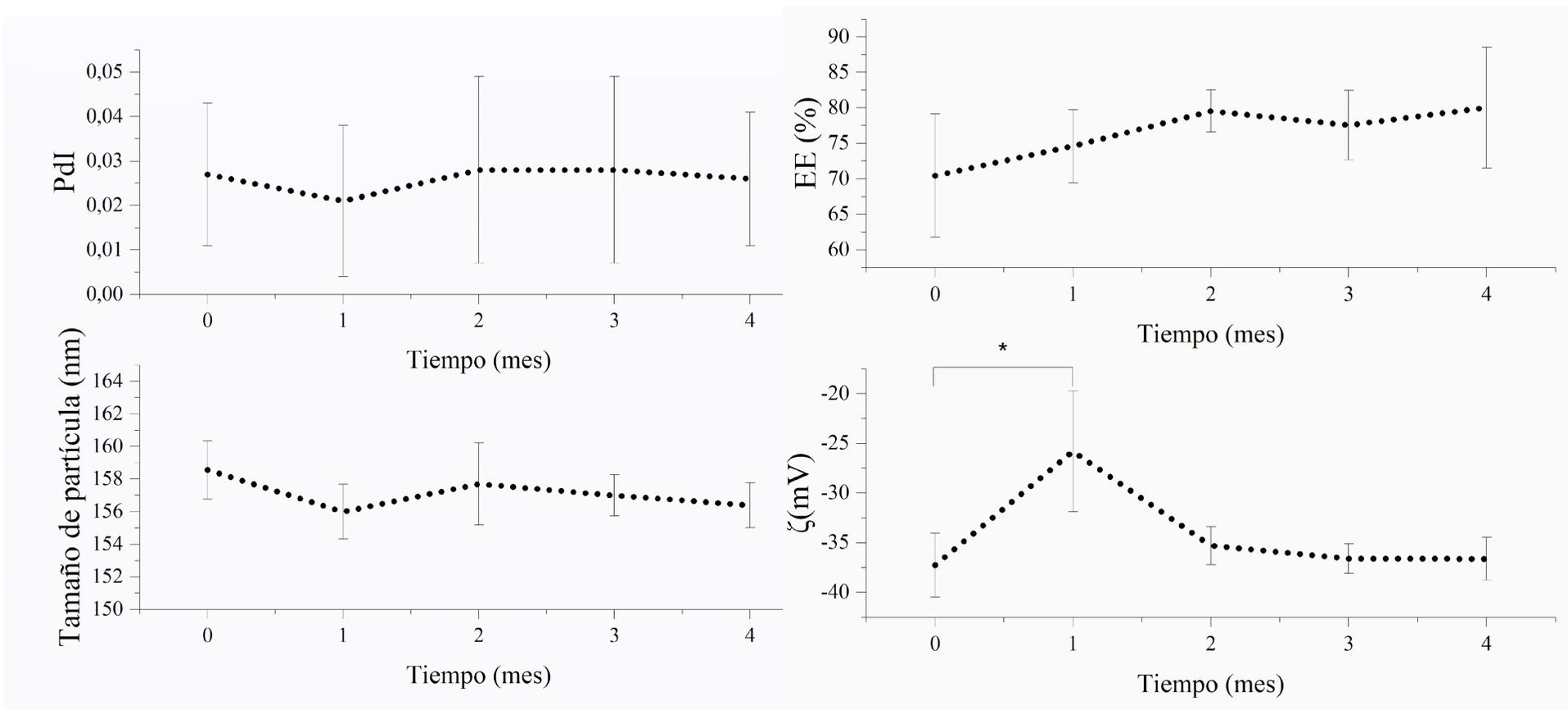
Como se realizó anteriormente, se ajustaron los datos de liberación *in vitro* a diferentes modelos matemáticos (Tabla 4.3). Los modelos que mejor ajustaron los datos fueron los de Korsmeyer-Peppas y Baker-Lonsdale ( $R^2 = 0,99$ ), arrojando el primer modelo mencionado un EMC levemente menor al segundo modelo. El modelo de Baker-Lonsdale tiene similitudes al modelo de Korsmeyer-Peppas en cuanto se aplica a matrices poliméricas en las que la liberación del fármaco puede explicarse por mecanismos de difusión gobernados por la ley de Fick o por degradación de la matriz

(18). Como se mencionó en el capítulo 3, el modelo de Korsmeyer-Peppas, o ley de potencia, describió inicialmente la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos planos mediante los mecanismos de relajación de las cadenas poliméricas y la difusión, aunque también se verificó su aplicabilidad en otros sistemas, como nanopartículas. Recordando la ecuación 3.2 que describe el modelo, tenemos los términos  $M_t/M_\infty$  para determinar la fracción disuelta,  $K$  es una constante que incorpora información estructural y geométrica de los sistemas, y el exponente  $n$  es el exponente de difusión o transporte, que proporciona información sobre el mecanismo de liberación. La estimación del exponente  $n$  fue 0,40 por lo que se podría explicar la liberación del BNZ como un proceso principalmente gobernado por la difusión de Fick ya que, para sistemas esféricos, un valor de  $n=0,43$  puede categorizarse como un modelo Fickiano en el que la liberación ocurre por difusión (19). En nuestro sistemas ambos modelos, tanto el de Baker-Lonsdale y el de Korsmeyer-Peppas, explicarían la liberación del fármaco por un modelo en el que predomina el proceso de difusión.

**Tabla 4.3.** Medidas de bondad de ajuste de los modelos matemáticos de liberación de fármaco desde NLC-BNZ.  $R^2$ : coeficiente de determinación; EMC: error medio cuadrado; AIC: criterio de información de Akaike.

Modelo	$R^2$	$R^2$ -ajustado	EMC	AIC
<b>Primer orden</b>	<b>0,84</b>	<b>0,84</b>	<b>71,31</b>	<b>44,41</b>
Hopfenberg	0,79	0,75	111,05	48,23
<b>Baker-Lonsdale</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>4,41</b>	<b>24,94</b>
Korsmeyer-Peppas	0,99	0,99	3,32	23,67
<b>Hixon-Crowell</b>	<b>0,79</b>	<b>0,79</b>	<b>92,54</b>	<b>46,23</b>

Se evidenció que las nanopartículas podrían almacenarse a 4 °C, en botellas de vidrio y protegidas de la luz, durante al menos cuatro meses sin perder sus propiedades iniciales (**Figura 4.10**). El análisis de DLS de las formulaciones reveló nanopartículas con un diámetro hidrodinámico promedio de  $157,1 \pm 1,9$  nm (un tamaño similar al obtenido para las NLC =  $150,6 \pm 4,7$  nm). Se obtuvo un valor de PDI 10 veces menor en comparación a las NLC ( $0,026 \pm 0,018$  versus  $0,202 \pm 0,009$ ), y además menor a 0,2, punto de corte para establecer que una formulación es monodispersa en formulaciones poliméricas (5). El pequeño valor de PDI es deseable y beneficioso ya que es indicativo que las propiedades fisicoquímicas de la formulación son uniformes.



**Figura 4.10.** Seguimiento de parámetros relevantes de la formulación durante 4 meses a fin de medir su estabilidad en determinadas condiciones de almacenamiento (refrigeración a 4 °C, viales de vidrio y resguardo de la luz  $*=p<0,05$ ). Los puntos corresponden a la media y el desvío estándar (n=3).

Como se mencionó anteriormente, las cargas superficiales necesarias para lograr una dispersión de nanopartículas estabilizadas por repulsión electrostática son alrededor de  $\pm 30$  mV (20). El valor de  $\zeta$  de nuestra formulación EU-BNZ fue  $-34,32 \pm 5,44$  mV, siendo un valor óptimo para la estabilización por repulsión electrostática. Tanto el valor promedio  $-34,32$  mV como el valor  $-14,08$  mV (formulación lipídica) podrían explicarse en base a los componentes de las formulaciones. El lípido, polímero y surfactante que se utilizaron son neutros a pH fisiológico ya que son compuestos con estructuras químicas tipo éster y/o éter. La diferencia entre los valores de  $\zeta$  debe residir, por lo tanto, en la utilización del lípido o del polímero, resultando las nanopartículas poliméricas con un valor de  $\zeta$  más negativo. Otras formulaciones compuestas por Eudragit<sup>®</sup>NE30D también arrojaron valores similares de  $\zeta$  (21). Durante el seguimiento de la estabilidad, se observó un aumento al primer mes de almacenamiento respecto a la condición inicial del sistema (mes 0). Sin embargo, esa diferencia no se observó entre los meses restantes y el mes 0, y no se vio reflejada en la estabilidad de la formulación con el paso del tiempo. Se comprobó que las formulaciones se mantuvieron sin precipitado de fármaco luego de 4 meses. En cuanto al EE, % se mantuvo en  $75,21 \pm 8,59$  % pese a haber una moderada dispersión en la medición de los datos, sin diferencia significativa con el paso de los meses.

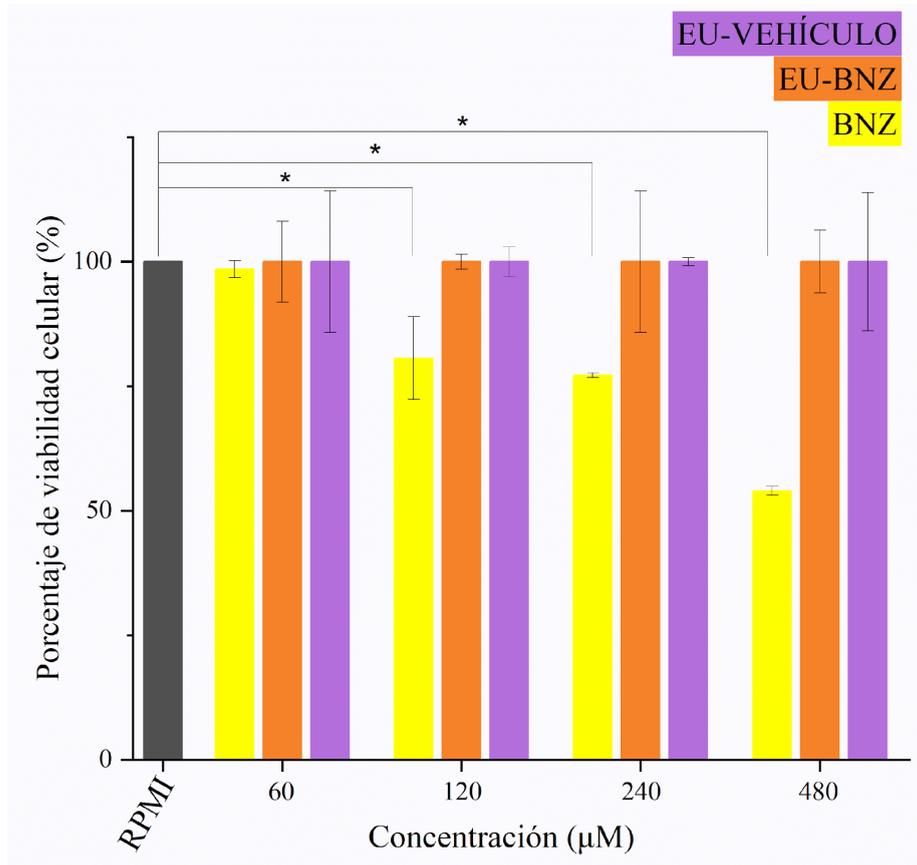
### 3. Citotoxicidad y actividad hemolítica

En cuanto al ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular CHO, en primer lugar se observó que la viabilidad celular disminuyó para el tratamiento con el fármaco libre dependiendo de la concentración (**Figura 4.11**). Los tratamientos con las formulaciones no mostraron una disminución en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones ensayadas. Esto podría deberse a dos factores, en primer lugar a que los componentes de la formulación son biocompatibles con las células, y, en segundo lugar, a que la encapsulación del fármaco las expone a una menor concentración de BNZ, el cual se libera desde las nanopartículas de forma paulatina.

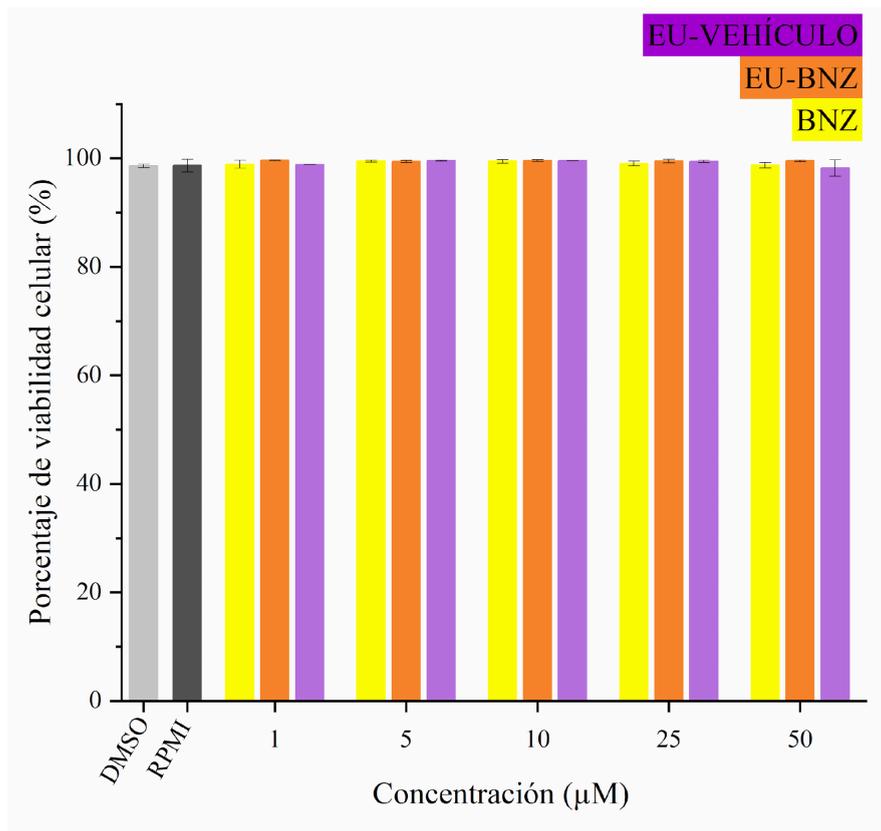
Además, se evaluó la toxicidad sobre una segunda línea celular, la línea Vero, mediante citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células muertas marcadas con IP (**Figura 4.12**). Aquí pudo observarse que ninguno de los tratamientos generó una amplia toxicidad en las células Vero más allá de matar al 1,5 % de las células, resultado que se

reprodujo también en los controles con medio de cultivo RPMI y RPMI + 1% de DMSO.

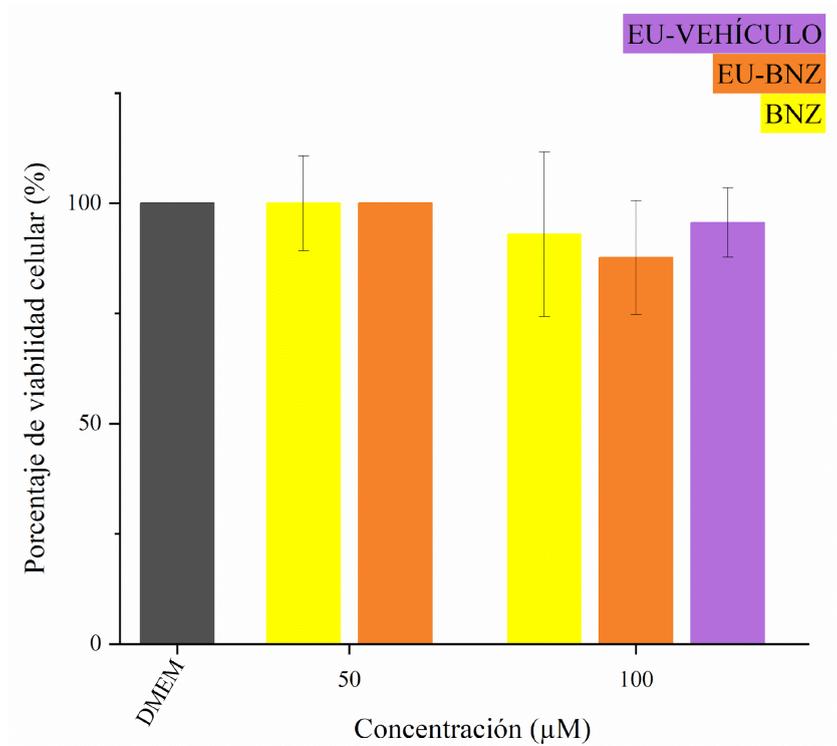
Por último, se probó la toxicidad de las formulaciones sobre células de la línea celular Caco-2 (**Figura 4.13**) sin hallar citotoxicidad luego de una incubación durante 3 horas.



**Figura 4.11.** Ensayo de citotoxicidad en la línea celular CHO luego de ser tratadas con BNZ, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO (\* $p < 0,05$ ). Se realizó la prueba de Dunnet para determinar diferencias significativas respecto al grupo control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Se informa el promedio y el desvío estándar ( $n=3$ ).

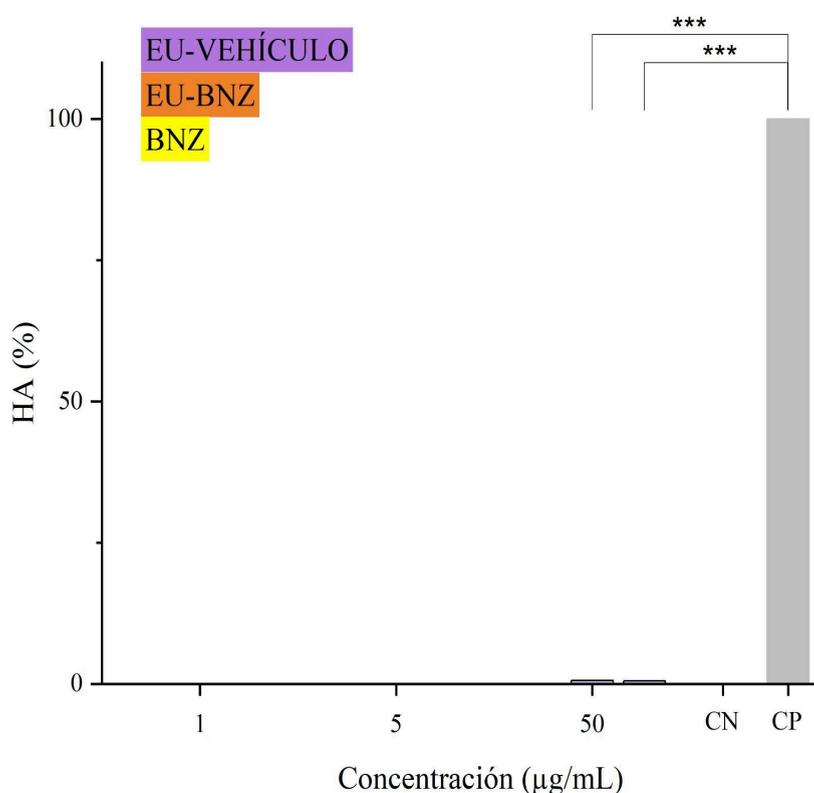


**Figura 4.12.** Ensayo de citotoxicidad en células Vero incubadas con BNZ, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO. Se informa la media y el desvío estándar (n=2).



**Figura 4.13.** Ensayo de citotoxicidad en células Caco-2 luego de ser tratadas con BNZ, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO. Se informa la media y el desvío estándar (n=3).

Siendo la vía parenteral la ruta de administración más habitual para sistemas nanoparticulados de acción sistémica, se evaluó la actividad hemolítica de la formulación a fin de evidenciar una posible toxicidad sobre células sanguíneas, como se realizó anteriormente con los nanosistemas lipídicos (**Figura 4.14**). Luego de 48 horas de incubación de las muestras no se observaron efectos hemolíticos superiores al límite establecido ( $< 5\%$ , ISO/TR 7406 o ASTM E2524-08) para materiales considerados seguros para aplicaciones biológicas (22). Por lo tanto, las formulaciones podrían considerarse hemocompatibles a las concentraciones ensayadas, como se reportó para otras formulaciones en base a Eudragit® (21, 23).



**Figura 4.14.** Actividad hemolítica luego de 48 horas de incubación con los tratamientos. Se realizó la comparación de las medias mediante el test de Tukey (\*  $p < 0,05$ ) y la comparación con el control positivo o negativo mediante el test de Dunnett (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). No se marcan las diferencias con el control negativo. CP (+): Tween. CN (-): solución salina

En principio, la falta de hemotoxicidad podría explicarse a partir de una falta de interacción con los eritrocitos debido a la repulsión provista por las cargas superficiales

negativas de ambos. Esta proposición se sustenta, en parte, en observaciones de otro trabajo, donde se modificaron las cargas superficiales de nanopartículas poliméricas y se midió la hemólisis (luego de 3 horas de incubación) encontrando una tendencia a un mayor nivel de liberación de hemoglobina luego de tratamientos con nanopartículas catiónicas (24). Retomando un resultado del capítulo 3, el  $\zeta$  de las NLC tuvo una medición de alrededor de -14 mV, por lo que ese valor menos negativo, en comparación con el  $\zeta$  de EU-BNZ, podría haber contribuido a la hemólisis leve que ya se discutió para ese sistema. Las concentraciones ensayadas fueron seleccionadas teniendo en cuenta los resultados de los ensayos *in vitro* y el intervalo terapéutico del fármaco. Se eligió a la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como el límite superior ya que es equivalente a una concentración 192  $\mu\text{M}$ , unas veinte veces la  $\text{EC}_{50}$  de BNZ en tripomastigotes, y alrededor de 8 veces el valor de la concentración mínima tóxica del intervalo terapéutico de BNZ (11-23  $\mu\text{M}$  (25)).

Los promedios de los tratamientos mostraron en todos los casos diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo. La comparación con el control negativo evidenció diferencias significativas respecto a EU-BNZ (5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y EU-VEHÍCULO (5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al igual que en los tratamientos con NLC (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Promedios de los tratamientos que presentaron diferencias significativas con el control negativo (CN).

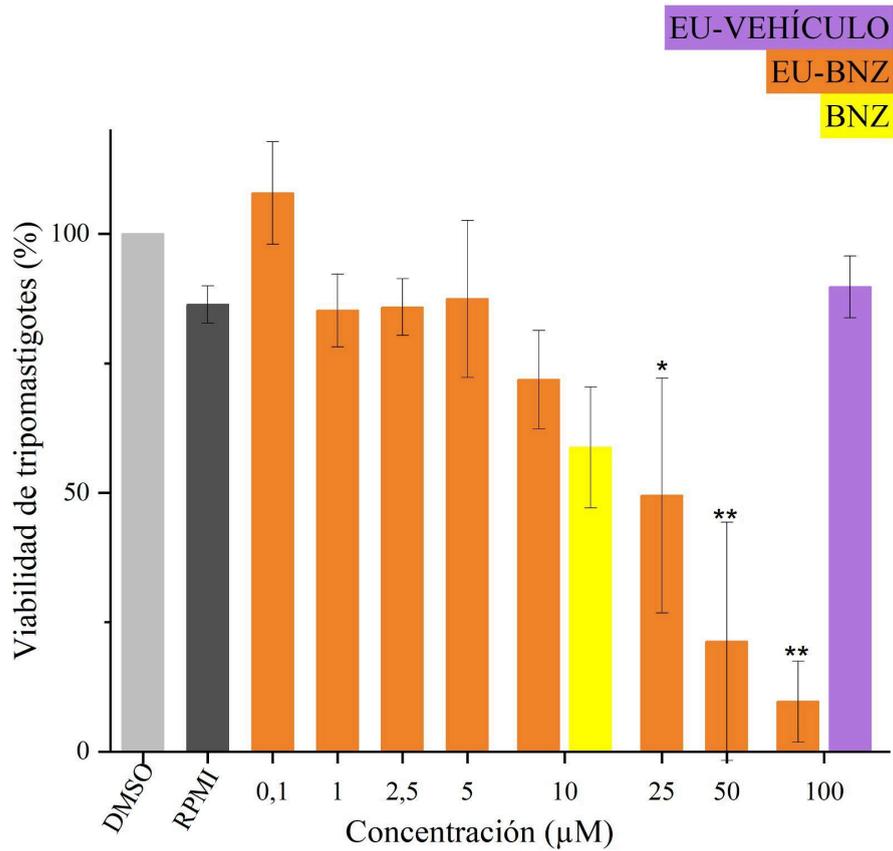
Tratamiento (concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$ o equivalente para EU-VEHÍCULO)	HA, % (desvío estándar)
<b>EU-BNZ (5)</b>	<b>0,0615 (0,0047)</b>
EU-BNZ (50)	0,5942 (0,0071)
<b>EU-VEHÍCULO (5)</b>	<b>0,0568 (0,0095)</b>
EU-VEHÍCULO (50)	0,5730 (0,0047)
<b>CN</b>	<b>0,0024 (0,0033)</b>

Si bien se evidenciaron diferencias frente al control negativo de solución salina, los valores de hemólisis estuvieron muy por debajo del límite considerado riesgoso por la normativa. Se observa un (muy leve) efecto supra-aditivo entre BNZ y la nanopartícula polimérica, al contrario de lo que sucedió para NLC-VEHÍCULO y NLC-BNZ a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En síntesis, comprobamos que las formulaciones no presentan efecto

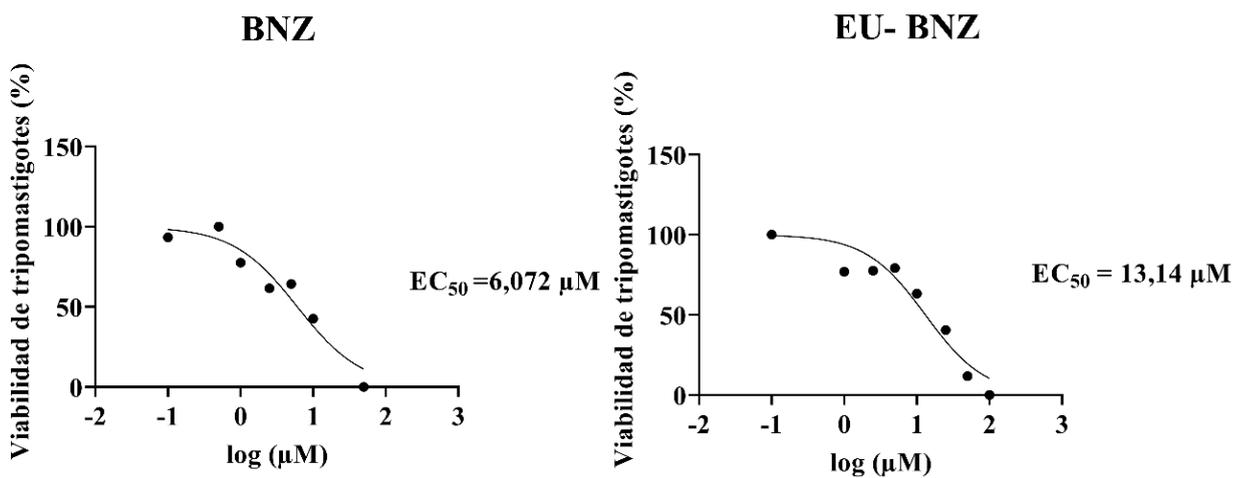
hemolítico. Sería interesante estudiar cómo afecta la formulación a los procesos de coagulación, la formación de trombos y la activación del sistema inmune, aspectos que no se estudiaron en este trabajo de tesis.

#### 4. Actividad tripanocida *in vitro*

Se evaluó la formulación polimérica EU-BNZ, EU-VEHÍCULO y el fármaco en un ensayo de incubación junto a una suspensión de parásitos en estadio tripomastigotes recolectados a partir de cultivo celular (**Figura 4.15**). En primer lugar, se observó una tendencia hacia una respuesta dependiente de la concentración en el tratamiento con EU-BNZ, en la que disminuye el porcentaje de viabilidad celular al aumentar la concentración del fármaco en las formulaciones. Si bien no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad para las distintas concentraciones, el promedio de los datos tiende hacia el tipo de respuesta concentración-dependiente esperada. Por otro lado, se observó que EU-VEHÍCULO no resultó tóxico para el parásito cuando se evaluó a una concentración equivalente a la que contendría la mayor concentración ensayada de EU-BNZ, al contrario de lo observado para la formulación nanolipídica. Junto a la presencia de componentes que no son tóxicos para *T. cruzi*, la carga superficial negativa de las nanopartículas podría sumar a la falta de efecto intrínseco del vehículo al igualar en signo negativo a la carga superficial del parásito resultado de la presencia de residuos de ácido siálico (26). Uno de los resultados más interesantes que se desprenden de este experimento reside en la comparación entre el tratamiento de BNZ y EU-BNZ a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . A primera vista ambos tratamientos conducirían a una disminución en la viabilidad de tripomastigotes del orden del 50%. Se procedió con el cálculo de las  $EC_{50}$ , y efectivamente, el efecto sobre tripomastigotes no muestra diferencias estadísticamente significativas entre BNZ y EU-BNZ a la concentración 10  $\mu\text{M}$ . Los valores de  $EC_{50}$  calculados (**Figura 4.16**) fueron 13,14  $\mu\text{M}$  para EU-BNZ (IC95%: 7,34- 22,22) y 6,072 (IC95%: 3,391-11,490) para BNZ. Es de interés denotar que el porcentaje de liberación de BNZ desde la formulación a las 24 horas fue de un 74% frente a un 90% de fármaco disuelto, por lo que habría una menor cantidad de moléculas de fármaco disponibles en el tratamiento con EU-BNZ. Se podría desprender la noción de que se necesitaría un tiempo más prolongado para alcanzar la misma concentración de fármaco libre en el tratamiento EU-BNZ y conseguir el mismo efecto.

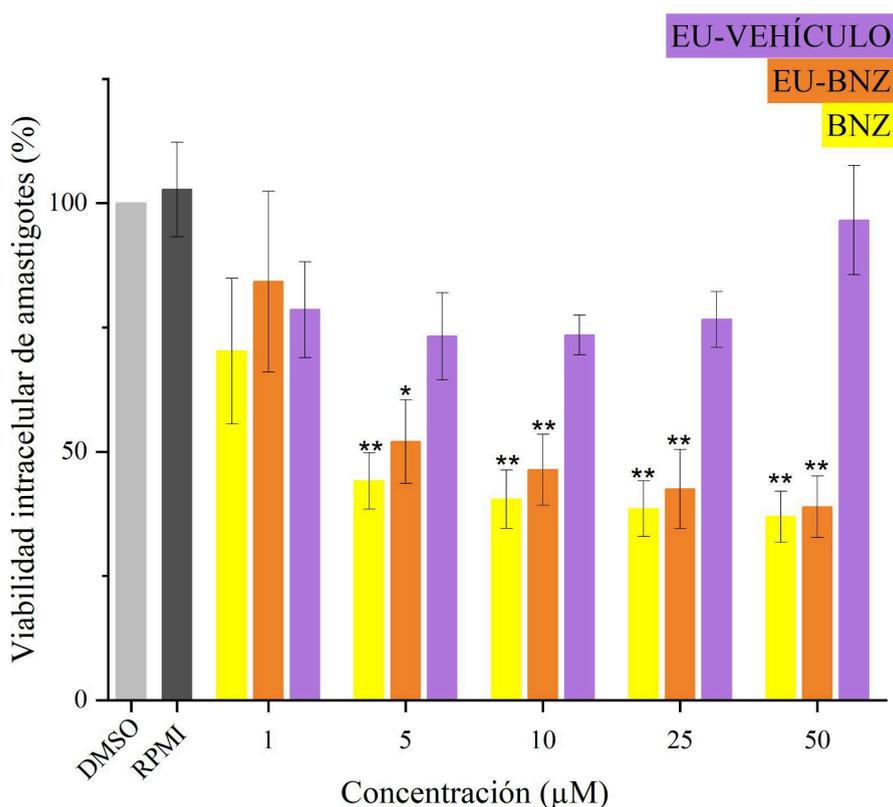


**Figura 4.15.** Efecto dosis-respuesta de BNZ, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO sobre los tripomastigotes de *T. cruzi*. Se realizó la prueba de Dunnet para identificar diferencias significativas respecto al grupo de control. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Los puntos corresponden a la media y el desvío estándar ( $n=3$ ).

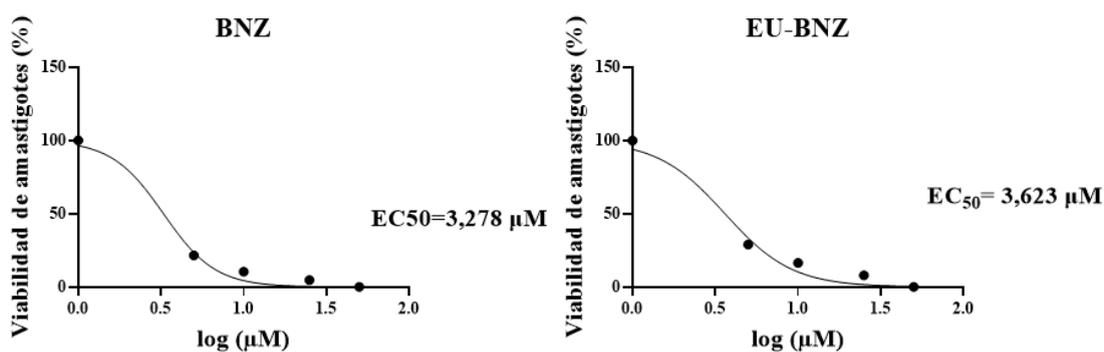


**Figura 4.16.** EC<sub>50</sub> para BNZ y EU-BNZ. La viabilidad de tripomastigotes (%) es frente al control con DMSO (1%). Los puntos corresponden a la media ( $n=3$ ).

Por otro lado, se evaluó la formulación en un ensayo de incubación *in vitro* frente a amastigotes internalizados en células Vero. En primer lugar, se observó una respuesta dependiente de la concentración en los tratamientos con BNZ y EU-BNZ. No se observó un efecto de EU-VEHÍCULO sobre la viabilidad de amastigotes diferente al ejercido significativamente por el control de medio de cultivo con DMSO al 1% (**Figura 4.17**). No se alcanzó un valor de viabilidad 0% a la concentración más alta de BNZ ni EU-BNZ. Los valores de  $EC_{50}$  del BNZ y EU-BNZ fueron 3,278 (IC95%: 2,233-6,708) y 3,623 (IC95%: 2,254-5,231)  $\mu$ M, respectivamente (**Figura 4.18**), por lo que se llega a la conclusión que no hay diferencias entre el tratamiento con el fármaco nanoencapsulado o no encapsulado. Sin embargo, como se dijo anteriormente, teniendo en cuenta el porcentaje de liberación a las 24 horas, habría una menor cantidad de moléculas del fármaco liberadas en el medio en comparación a la solución de BNZ, por lo que se habría un efecto beneficioso del vehículo si se evidencia el mismo nivel de efecto a una concentración menor.



**Figura 4.17.** Efecto dosis-respuesta de BNZ, EU-BNZ y EU-VEHÍCULO sobre los amastigotes de *T. cruzi*. Se realizó la prueba de Dunnet para identificar diferencias significativas respecto al grupo de control. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



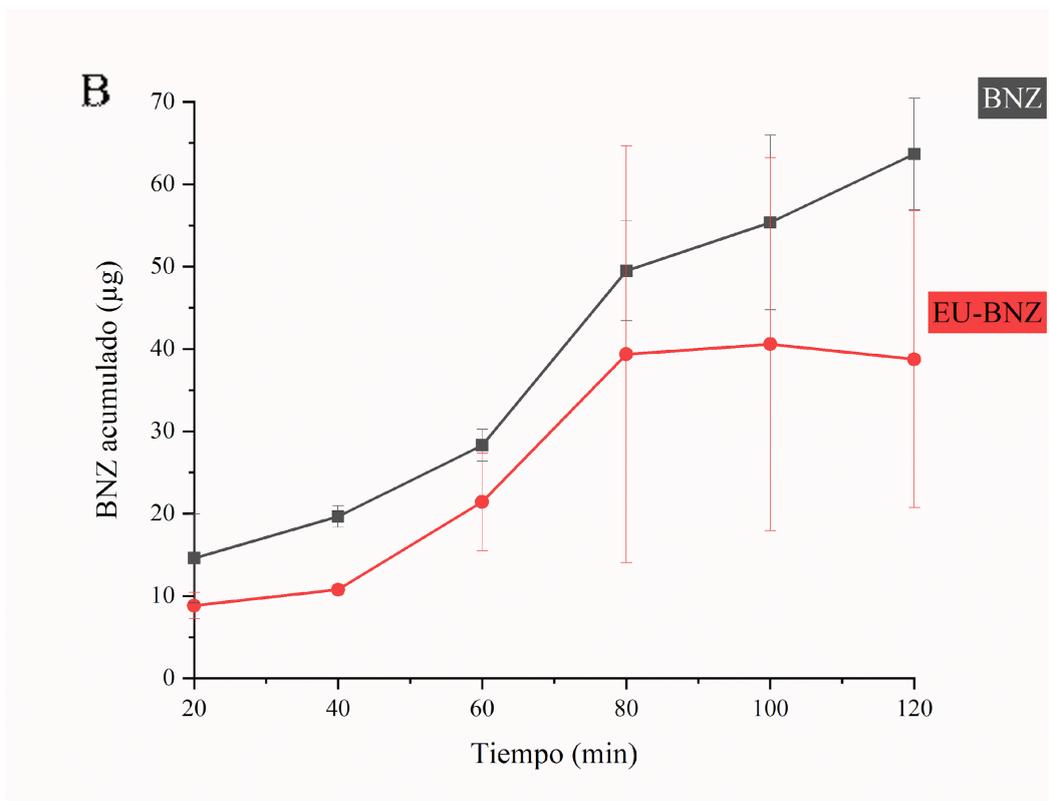
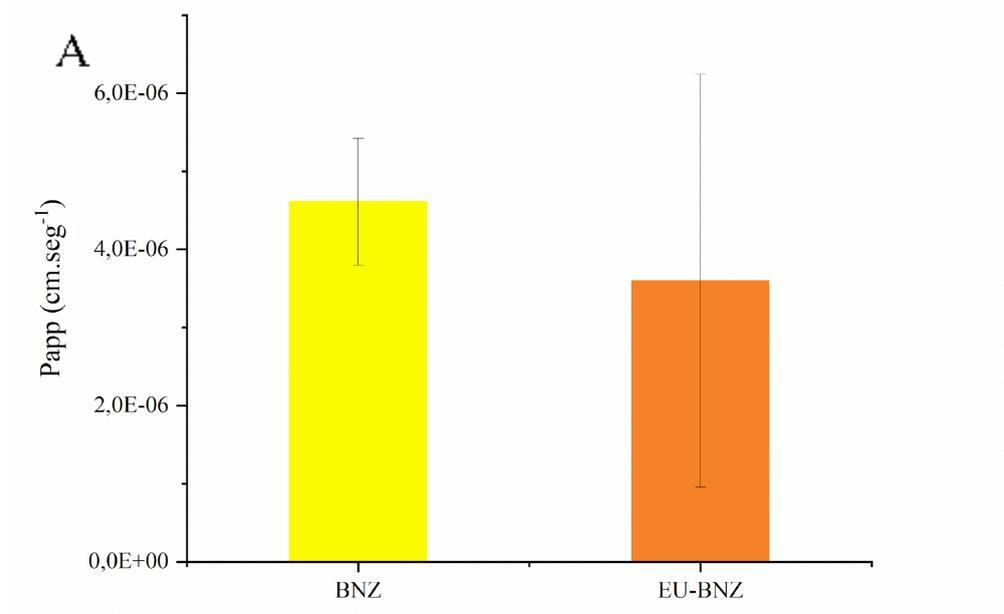
**Figura 4.18.**  $EC_{50}$  para BNZ y EU-BNZ. La viabilidad de amastigotes (%) es frente al control con DMSO (1%). Los puntos corresponden a la media (n=3).

## 5. Evaluación de la permeabilidad

Se realizó el ensayo de permeabilidad a través de una monocapa de células Caco-2 (**Figura 4.19**) no pudiendo observar diferencias significativas entre los coeficientes de permeabilidad ni la cantidad acumulada de BNZ en la cámara basolateral hacia el final del experimento. De igual modo a lo planteado para NLC-BNZ y BNZ, en este caso a los 120 minutos de iniciado el ensayo se evidenció que la cantidad de masa de fármaco en la cámara aceptora correspondió al 20% de la cantidad inicial dada al sistema, encontrando incluso una tendencia no significativa de NLC-BNZ hacia una permeabilidad menor. Como EE, % es de aproximadamente el 80% podría establecerse que el fármaco libre es el que estaría trasladándose hacia la cámara basolateral. Nuevamente, el tamaño y la carga superficial podrían desfavorecer la permeabilidad de las nanopartículas poliméricas en ciertas ocasiones.

Un ejemplo en el que la carga superficial aumenta la permeabilidad son las nanopartículas del polímero catiónico de Eudragit® (27), E100, conteniendo enalapril, que incrementaron la permeabilidad del fármaco encapsulado respecto al libre en 1,7 veces luego de probadas en un sistema de permeabilidad de saco invertido utilizando el intestino de ratas albinas macho de la cepa Wistar. Estos trabajos aportan a la hipótesis de la interacción entre las cargas superficiales de la membrana celular y las partículas como motor de la adhesión y posterior internalización celular. No obstante, tanto los nanosistemas como los mecanismos de permeación son complejos y nanopartículas poliméricas con carga superficial negativa (-40 mV) también pudieron incrementar la

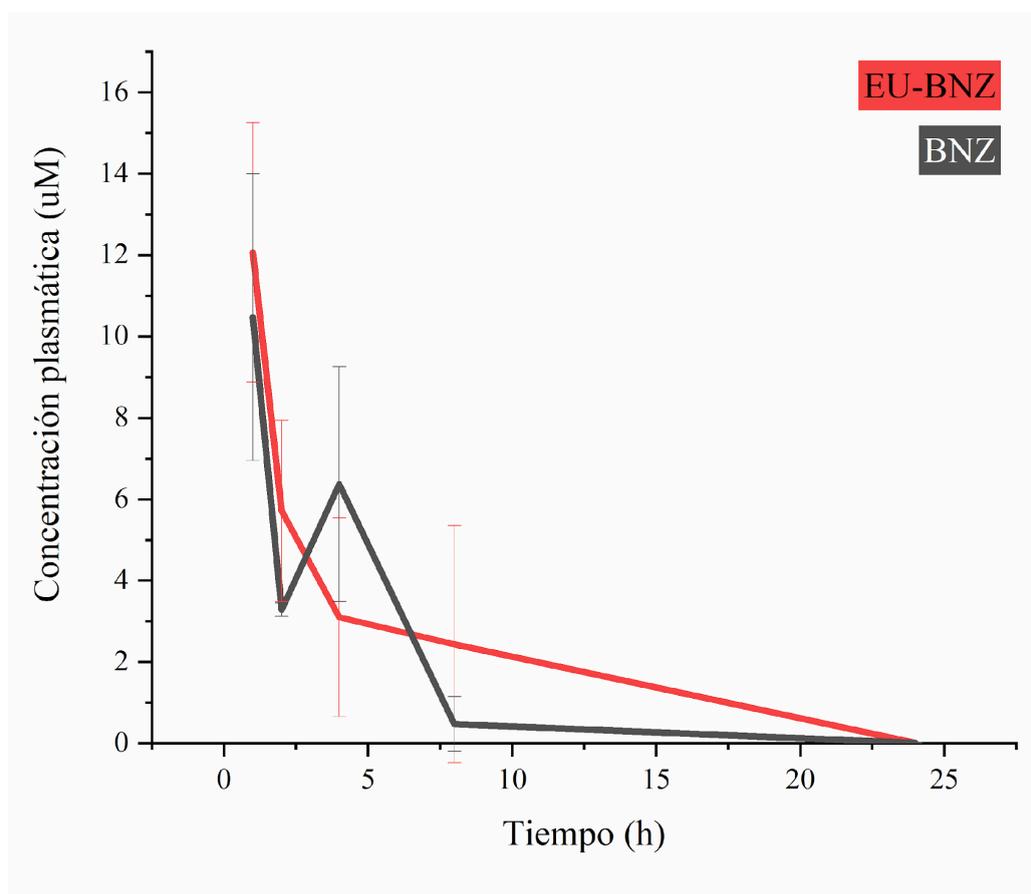
permeabilidad. Así se reportó para curcumina nanoencapsulada en nanopartículas de Eudragit® S100 y PLGA en el modelo de permeabilidad intestinal de Caco-2 (28). Allí, se consideró que el aporte del PLGA toma peso relevante, ya que es una molécula ampliamente utilizada en el desarrollo de nanopartículas y con abundante evidencia en literatura sobre sus aportes a la permeabilidad (29). Recientemente se publicó un estudio acerca del desarrollo de una formulación de nanopartículas con un núcleo polimérico de Eudragit® E100 y un recubrimiento lipídico donde se evidencia el aumento de la internalización celular del material genético frente a nanopartículas de Eudragit® RS100 (30). E100 es un polímero sensible al pH que libera el contenido de DNA dentro del interior celular evitando la pérdida del material genético, mientras que RS100 no es sensible al pH. Esto es evidencia de los grandes prospectos del Eudragit® en el área y de la complejidad en la predicción de materiales que aporten a la permeabilidad.



**Figura 4.19.** (A) Coeficiente de permeabilidad aparente y (B) cantidad de BNZ acumulado en la cámara basolateral de EU-BNZ y el fármaco libre. Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=2).

## 6. Evaluación farmacocinética de la formulación

Se obtuvieron los perfiles de concentración en plasma en función del tiempo utilizando los datos obtenidos después de una administración p.o. del fármaco sin encapsular o de la formulación EU-BNZ a una dosis de 30 mg/kg (**Figura 4.20**). Se realizó un cambio en la formulación inicial para poder incrementar la cantidad de BNZ y alcanzar las dosis necesarias para la administración *in vivo*. El cambio de composición en la formulación (2 % □ 6% p/v Eudragit® NE30D; 3% □ 4,5% p/v P188) no modificó sustancialmente los parámetro fisicoquímicos (el tamaño promedio pasó de  $157,12 \pm 1,97$  nm a  $154,99 \pm 1,02$  nm, el valor de PDI se mantuvo muy cercano al valor de la formulación inicial  $0,026 \pm 0,018$  pasando a  $0,019 \pm 0,015$ , y el valor de  $\zeta$  pasó de  $-34,32 \pm 5,44$  mV -a  $-39,60 \pm 1,90$  mV).



**Figura 4.20.** Perfiles plasmáticos de BNZ y EU-BNZ luego de una administración p.o.

Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=2).

Se calculó el  $AUC_{0-\infty}$  y  $AUC_{0-t}$  utilizando el método trapezoidal (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.5.** Valores de AUC expresado como promedio (desvío estándar).

Tratamiento	AUC <sub>0-t</sub> (μM.h)	AUC <sub>0-∞</sub> (μM.h)
<b>BNZ p.o.</b>	<b>39,38 (1,43)</b>	<b>39,54 (1,32)</b>
EU-BNZ p.o.	54,41 (36,28)	54,46 (36,25)

A partir del gráfico de concentración plasmática versus tiempo, los valores de AUC y la realización del análisis estadístico comparativo, se evidenció que la exposición a BNZ no difirió entre los tratamientos. Se observó una amplia dispersión en los valores de EU-BNZ p.o. Esto se debe a que una de las dos muestras correspondiente al tiempo 8 horas arrojó un valor de concentración plasmática más alto de lo esperado (cercano a los valores obtenidos para los primeros tiempos de muestreo). Si se descartara ese dato los valores de AUC<sub>0-t</sub> y AUC<sub>0-∞</sub> para EU-BNZ serían de  $31,92 \pm 4,46$  y  $31,97 \pm 4,43$  μM.h, respectivamente. La tendencia del valor del AUC sería un menor valor para el tratamiento de las nanopartículas.

Según los resultados del ensayo de permeabilidad *in vitro*, la formulación no favorece al pasaje a través de la barrera intestinal. Como no se observó un comportamiento demorado (como en NLC), si el AUC luego del tratamiento con EU-BNZ no es diferente al AUC para BNZ es plausible postular la pérdida de la integridad de las nanopartículas en alguna porción del tracto gastrointestinal, alcanzando, de esta manera, la misma cantidad de fármaco libre en el sitio de absorción. Debe tenerse en cuenta que la falta de diferencia significativa entre los valores de AUC de los tratamientos está relacionada con la dispersión de los datos, y deberíamos repetir el ensayo con grupos de animales de mayor tamaño para sustentar esta hipótesis. Asimismo, podría evaluarse la estabilidad de nuestro nanosistema en medios gástrico e intestinal simulados.

En cuanto a los valores farmacocinéticos como el  $t_{m\acute{a}x}$  se encontró similitud entre BNZ con los valores reportados en la bibliografía para el fármaco en ensayos preclínicos en ratones hembra Swiss en los que también se alcanzó la concentración máxima alrededor de la hora luego de una administración p.o. (31). Otro punto a destacar es que el valor alcanzado de Concentración ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de BNZ a una dosis subóptima de 30 mg/kg como la utilizada en este ensayo alcanzó un valor de concentración similar a 10 μM, cuando  $C_{m\acute{a}x}$  luego de la administración de una dosis estándar de 100 mg/kg en ratones es  $160,04 \pm 11,50$  μM (31). Se recalca esta diferencia para el desarrollo de la próxima sección donde

se exponen los resultados del efecto del fármaco libre y las formulaciones en ratones infectados.

Por otra parte, como se mencionó en el capítulo 3, se observó un segundo pico en la curva plasmática del BNZ libre, que podría evidenciar el proceso de recirculación enterohepática del BNZ en el organismo. Ese pico pudo no haberse observado en el tratamiento con EU-BNZ debido a la gran variabilidad de las concentraciones plasmáticas observadas para el grupo de ratones correspondiente a cada tiempo de muestreo.

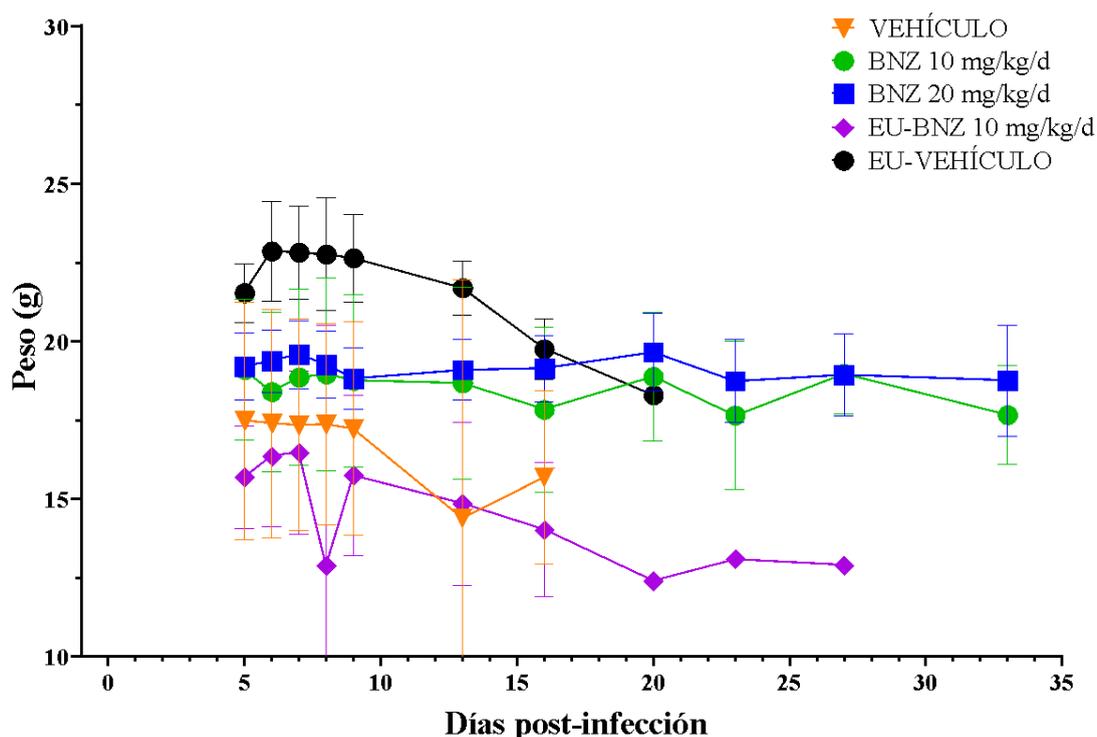
#### 7. Evaluación en un modelo murino de infección aguda

Como se mencionó en el capítulo 3 (Sección 6. *Evaluación en un modelo murino de infección aguda*), se realizó el seguimiento del peso, la parasitemia y la supervivencia de los ratones a fin de evaluar el desempeño de la formulación EU-BNZ y del fármaco libre frente a una infección aguda (**Figura 4.21-4.23**).

En primer lugar, se evaluó la evolución comparativa del peso entre los tratamientos y el vehículo, ya que ocasionalmente puede revelar o sugerir efectos tóxicos del tratamiento ensayado. En nuestro caso, BNZ 10 mg/kg/d y 20 mg/kg/d no evidenciaron efectos tóxicos evidentes ocasionados por el tratamiento (lo que parece consistente con los resultados sobre la citotoxicidad en las distintas líneas celulares). Se observó, sin embargo, que los grupos que recibieron EU-BNZ y VEHÍCULO (solución fisiológica + DMSO 20%) tuvieron una tendencia a bajar de peso durante o inmediatamente después del tratamiento. La distribución inicial de los ratones en sus hábitats tal vez debería haber sido más homogénea a fin de que si el peso fuera un factor que influye en el desarrollo de la parasitemia vea afectado al resultado equitativamente.

Una vez más, se utilizaron dosis sub-óptimas para poder evidenciar el efecto del fármaco en el nanovehículo, en caso de que existiera. Se observó que los tratamientos con BNZ a 10 mg/kg/d y 20 mg/kg/d presentaron un desempeño dosis-dependiente (**Figura 4.23**) y que la supervivencia de los ratones se vio disminuida para el tratamiento con EU-BNZ respecto a los tratamientos con fármaco libre. Retomando el resultado del ensayo farmacocinético, la exposición al fármaco no fue diferente entre el tratamiento con BNZ y EU-BNZ. Siendo así, ¿por qué la sobrevida del grupo EU-BNZ fue menor? Por un lado, como se discutió anteriormente, la cinética de absorción de sustratos de P-gp podría diferir en ratones sanos y en ratones infectados, estando

favorecida la absorción de BNZ libre en estos últimos. En caso de que las nanopartículas cargadas accedieran a BNZ, como en el caso de NLC-BNZ, la circulación sistémica del BNZ en las nanopartículas podría significar una menor concentración libre en plasma, lo que se vería reflejado en la sobrevida de los ratones (sin embargo, los estudios de permeabilidad *in vitro* no sustentan esta hipótesis).



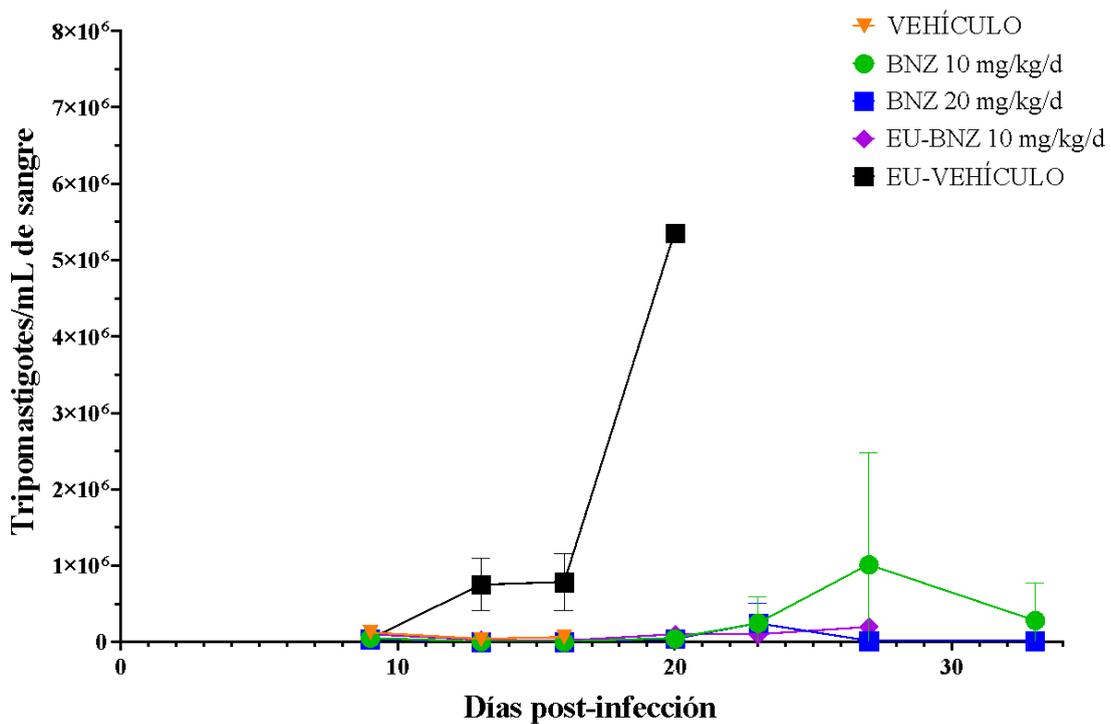
**Figura 4.21.** Evolución de pesos promedio. Los puntos corresponden al promedio y al desvío estándar (n=5).

Es interesante retomar lo mencionado en la sección anterior acerca de la  $C_{m\acute{a}x}$ . En estudios preclínicos previos se cuantificó una  $C_{m\acute{a}x}$  con un valor de 160  $\mu\text{M}$  bajo el tratamiento estándar de BNZ (100 mg/kg/d) en ratones (31), una  $C_{m\acute{a}x}$  dieciséis veces mayor a la  $C_{m\acute{a}x}$  cuantificada luego de una dosis de 30 mg/kg. Sin embargo, extrapolando los resultados, se observó que a una dosis de 20 mg/kg/d, y por lo tanto una  $C_{m\acute{a}x}$  menor, la supervivencia del grupo BNZ fue del 100% durante el ensayo, un resultado similar al obtenido para la supervivencia del grupo de ratones con el mismo tratamiento a una dosis estándar. Esto podría dar indicio de eficacia del tratamiento a dosis más bajas que no provean niveles de fármaco que pudieran sobrepasar las concentraciones mínimas tóxicas, con los consiguientes efectos adversos. En los últimos

años se ha reunido creciente evidencia acerca de esta observación. Se ha reportado un ensayo preclínico (32) en un modelo agudo ensayando dosis de 100, 40 y 20 mg/kg/d de BNZ suspendido en metilcelulosa 0,5% administrado p.o. durante 20 días en ratones hembra Swiss infectadas con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Y (DTU II) en los que la supervivencia fue del 100 % en los tres grupos. En nuestro caso, un tratamiento de 5 días arrojó la misma tasa de supervivencia. Los autores observaron que el menor pico de parasitemia se alcanzó con la dosis de 100 mg/kg/d ( $1 \times 10^4$  frente a  $3,5 \times 10^5$  tripomastigotes/mL para la dosis de 20 mg/kg/d) mientras que en nuestro caso el pico de parasitemia estuvo en  $2,4 \times 10^5$  tripomastigotes/mL en el tratamiento BNZ 20mg/kg/d. Interesantemente, los autores también ensayaron las mismas dosis en un modelo crónico, hallando tasas de curación del 88, 100 y 50 % con 100, 40 y 20 mg/kg/d, respectivamente, siendo los dos primeros valores significativamente diferentes entre ellos y con el control del vehículo del fármaco. Por otra parte, Diniz y colaboradores (33) reportaron eficacia del tratamiento durante 7 días con dosis 100 mg/kg/d en la misma cepa de *T. cruzi* y ratones, pero con un inóculo mayor ( $5 \times 10^3$  tripomastigotes). La tasa de supervivencia fue del 100% para la mayor dosis, mientras que para dosis de 50 y 25 mg/kg/d fueron 66 y 33%, respectivamente. Se ha reportado que un mayor inóculo conlleva cambios más severos en el desarrollo de la enfermedad en ratones (34). Sin embargo, no podría descartarse la eficacia de dosis más bajas sin antes conocer cómo se traslada el conocimiento del tamaño del inóculo inicial en humanos. Como este dato es multifactorial, cada cepa de *T. cruzi* posee una virulencia compleja de determinar y es muy difícil (casi imposible) determinar inóculos iniciales en las situaciones de contagio silvestres, no se hace foco en esta información saliendo del laboratorio. Lo que se lleva a cabo para estudiar la eficacia de nuevos regímenes posológicos son ensayos clínicos como los llamados BENDITA (#NCT03378661) y MULTIBENZ (#NCT03191162) evaluando dosis y duración del tratamiento con BNZ. En el estudio BENDITA (35) se comparó el tratamiento convencional (5-8 mg/kg/d), en pacientes de alrededor de 60 kg de peso, administrando 300 mg/d durante 8 semanas, 300mg/d durante 4 semanas, 300 mg/d durante 2 semanas y/o 150 mg/d durante 4 semanas. Si bien los autores remarcan que los grupos de tratamiento son pequeños para realizar una comparación estadística válida entre ellos, aun así hacen algunas comparaciones. En primer lugar, denotan que las reacciones adversas fueron reportadas en menor medida para la dosis más baja de BNZ, y luego que la tasa de curación no fue significativamente diferente entre las dosis. En MULTIBENZ (36, 37) los brazos de

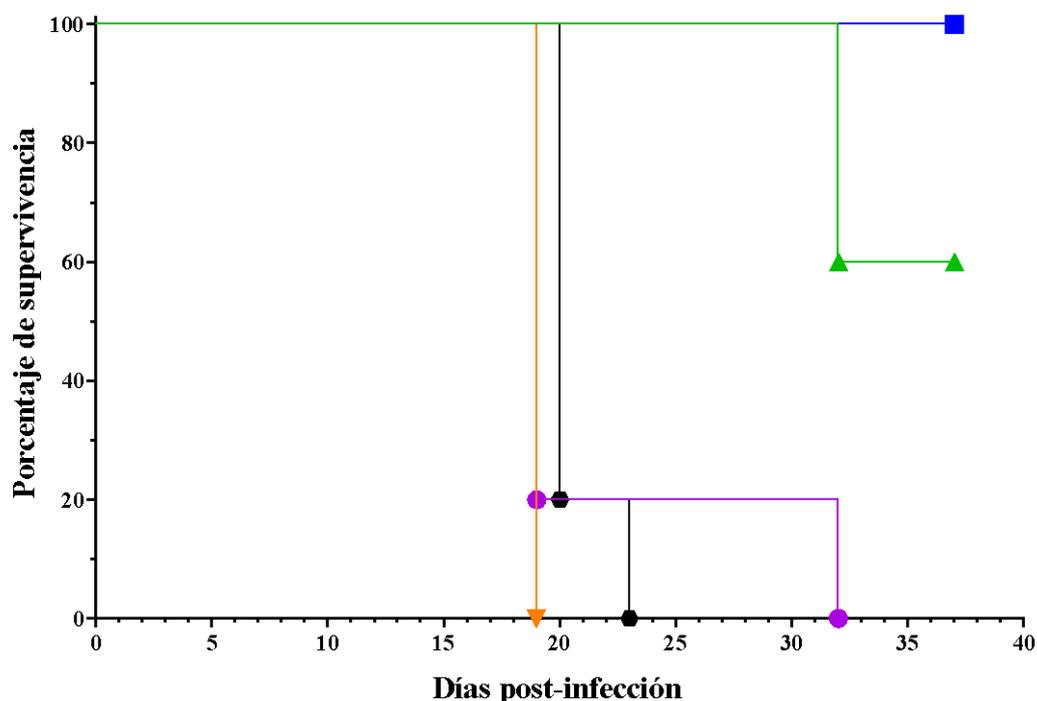
tratamiento fueron 300 mg durante 60 días, 150 mg durante 60 días y/o 400 mg durante 15 días. Se evidenció que la reducción del tiempo de tratamiento de 8 a 2 semanas mantuvo la respuesta antiparasitaria facilitando la adherencia al tratamiento.

En cuanto a los valores de parasitemia, el valor promedio para el tratamiento con EU-VEHÍCULO alcanzó un valor considerable de tripomastigotes en sangre y mayor que el resto de los tratamientos. El tratamiento con EU-BNZ tuvo una tendencia inicial muy favorable que no se tradujo en la sobrevivencia de los ratones (**Figura 4.23**). La parasitemia suele ser un parámetro muy variable que no siempre indica la efectividad del tratamiento, como puede observarse, por ejemplo, en el tratamiento con el vehículo, ya que el grupo tuvo parasitemia baja pero, al mismo tiempo, corto tiempo de supervivencia.



**Figura 4.22.** Evolución de parasitemias promedio. Los puntos corresponden al promedio y el desvío estándar (n=5).

▼ VEHÍCULO ▲ BNZ 10 mg/kg/d ■ BNZ 20 mg/kg/d ● EU-BNZ 10 mg/kg/d ● EU-VEHÍCULO



**Figura 4.23.** Curva de supervivencia durante la fase aguda de ratones Balb/c infectados con *T. cruzi* cepa RA, tratados con BNZ libre o nanoformulado en formulación polimérica (y sus respectivos controles). Se realizó la prueba log-rank para ver diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,001$ ).

Los ratones tratados con EU-BNZ tuvieron una mayor supervivencia en comparación a los ratones tratados con el VEHÍCULO y EU-VEHÍCULO. Por último y para resaltar, en comparación al resultado de porcentaje de supervivencia del capítulo 3 para NLC-VEHÍCULO, los ratones tratados con las nanopartículas lipídicas vacías tuvieron una mayor supervivencia respecto a los ratones tratados con las nanopartículas poliméricas vacías, mientras que la supervivencia de los ratones tratados con NLC-BNZ a los 20 días post-infección fue el doble en comparación al tratamiento con EU-BNZ. Estos resultados aportan una evidencia adicional respecto al efecto tripanocida del nanovehículo lipídico, que atribuimos al MM.

## Conclusiones parciales

En el presente capítulo se describe la obtención y caracterización fisicoquímica y biológica de un sistema polimérico encapsulando BNZ y la evaluación de su eficacia contra el agente etiológico de la enfermedad de Chagas en distintos modelos.

En primer lugar, se obtuvieron nanopartículas poliméricas esféricas a partir de un polímero neutro mediante una técnica de síntesis sencilla y económica. La caracterización térmica y de rayos X de la formulación indicó que el BNZ se encuentra, en este sistema, disperso en la matriz polimérica en estado amorfo.

Por otro lado, las formulaciones mostraron un perfil de liberación sostenida del fármaco durante 24 horas siguiendo un mecanismo de liberación ajustado al modelo de Korsmeyer-Peppas con una liberación regida por un mecanismo principalmente de difusión. La estabilidad fisicoquímica de la formulación fue durante al menos cuatro meses manteniendo valores constantes de tamaño de partícula,  $\zeta$ , PDI y EE, %.

Siguiendo con los ensayos *in vitro*, los experimentos de incubación de nuestro nanosistema con tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* mostraron viabilidades similares a las observadas para el fármaco libre y la falta de efecto del vehículo vacío, con una variabilidad del ensayo elevada. Aquí, además, se tuvo en cuenta que la liberación del BNZ desde EU-BNZ a las 24 horas no alcanzó el 100%, por lo que se alcanzarían viabilidades de parásitos similares entre los tratamientos mencionados con un número menor de moléculas de fármaco.

La permeabilidad de EU-BNZ en estudios en monocapa de células Caco-2 fue similar a la del fármaco libre. Por otro lado, el efecto citotóxico en células fue menor para EU-BNZ en comparación con el fármaco libre en la línea celular CHO, y el sistema nano tampoco presentó toxicidad en las líneas Caco-2 y Vero. Sumado a una muy baja actividad hemolítica, la formulación sugiere posibles beneficios para su uso en términos de su perfil de seguridad.

Pasando a los resultados de los modelos murinos, el ensayo farmacocinético mostró perfiles plasmáticos similares entre la nanoformulación versus el fármaco libre por vía oral, aunque en el caso del sistema nano se observó gran variabilidad entre los animales de experimentación por lo que sería conveniente sumar más réplicas al ensayo.

El desempeño de EU-BNZ en el ensayo *in vivo* de infección aguda resultó en una menor supervivencia de los ratones luego del tratamiento respecto a la misma dosis de BNZ, así como un similar control de la parasitemia. Aun así, en comparación al tratamiento

con el VEHÍCULO y con EU-VEHÍCULO, la supervivencia fue mayor para los ratones tratados con EU-BNZ. Por otro lado, trayendo a colación el resultado del ensayo *in vivo* agudo del capítulo 3, la supervivencia de los ratones tratados con NLC-VEHÍCULO fue mayor a la supervivencia de los ratones tratados con EU-VEHÍCULO, en línea con el efecto tripanocida observado en el MM.

## Referencias

1. dos Santos Silva A, de Caland L, de Melo Doro P, de S. L. Oliveira A, de Araújo-Júnior R, Fernandes-Pedrosa M, *et al.* Hydrophilic and hydrophobic polymeric benzimidazole-loaded nanoparticles: Physicochemical properties and *in vitro* antitumor efficacy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;51:700-7. DOI:10.1016/j.jddst.2019.04.005.
2. Seremeta K, Arrúa E, Okulik N, Salomon C. Development and characterization of benzimidazole nano- and microparticles: A new tool for pediatric treatment of Chagas disease? *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;177:169-77. DOI:10.1016/j.colsurfb.2019.01.039.
3. ImageJ, ImageJ, Inc Bethesda, MD, 2018.
4. Rodenak-Kladniew B, Noacco N, Pérez de Berti I, *et al.* Design of magnetic hybrid nanostructured lipid carriers containing 1,8-cineole as delivery systems for anticancer drugs: Physicochemical and cytotoxic studies. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021; 202:111710. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111710.
5. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018; 10: 57. DOI:10.3390/pharmaceutics10020057.
6. Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz M. Solid lipid nanoparticles for drug delivery: Pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Front Mol Biosc.* 2020; 7:587997. DOI: 10.3389/fmolb.2020.587997.
7. Maximiano F, Monteiro K, Bahia M, de Sá-Barreto L, Soares da Cunha-Filho. Polymorphic screen and drug–excipient compatibility studies of the antichagasic benzimidazole. *J Therm Anal Calorim.* 2011;106:819-824. DOI:10.1007/s10973-011-1371-6.
8. Nanaki S, Eleftheriou R, Barmpalexis P, Kostoglou M, Karavas E, Bikiaris D. Evaluation of dissolution enhancement of aprepitant drug in ternary pharmaceutical solid dispersions with Soluplus® and Poloxamer 188 prepared by melt mixing. *Sci.* 2019; 1:48. DOI:10.3390/sci1020048.
9. Göpferich A, Lee G. The influence of endogenous surfactant on the structure and drug-release properties of Eudragit® NE30D-matrices. *J Controlled Release.* 1992;18:133-44. DOI:10.1016/0168-3659(92)90182-Q.
10. Soares-Sobrinho J, de La Roca Soares M, Lopes P. *et al.* A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: Physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benzimidazole. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11: 1391–1396. DOI:10.1208/s12249-010-9495-8.
11. NETZSCH - Analyzing and Testing. Improving process conditions – Determining the thermal stability of Eudragit® by means of TGA-FTIR. Disponible en: <https://analyzing-testing.netzsch.com/en/application-literature/improving-process-condit>

ions-determining-the-thermal-stability-of-eudragit-r-by-means-of-tga-ft-ir. [Último acceso Mayo 2024].

**12.** Ambrosi M, Raudino M, Díaz I, Martínez I. Non-isothermal crystallization kinetics and morphology of poly(3-hydroxybutyrate)/pluronic blends, *Eur. Polym. J.* 2019; 109189. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2019.08.016.

**13.** Muraca G, Ruiz M, Gambaro R, Scioli-Montoto S, Sbaraglini M, Padula G, Cisneros S, Chain C, Álvarez V, Huck-Iriart C, Castro G, Piñero M, Marchetto M, Soto C, Islan G, Talevi A. Nanostructured lipid carriers containing benzimidazole: physicochemical, biopharmaceutical and cellular *in vitro* studies, *Beilstein J. Nanotechnol.* 2023; 804–818. DOI:10.3762/bjnano.14.66.

**14.** Nojima S, Terashima Y, Ashida T. Small-angle X-ray scattering study of the morphology of blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and polystyrene oligomer, *Polymer.* 1986;1007–1013. DOI:10.1016/0032-3861(86)90064-9.

**15.** Rivas-Rojas P, Ollier R, Alvarez V, Huck-Iriart C. Enhancing the integration of bentonite clay with polycaprolactone by intercalation with a cationic surfactant: effects on clay orientation and composite tensile properties, *J. Mater. Sci.* 2021; 5595–5608. DOI:10.1007/s10853-020-05603-5.

**16.** Pedersen J. Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting I, *Adv Colloid Interface Sci.* 1997. 40. DOI:10.1016/S0001-8686(97)00312-6.

**17.** Bressler B, Pauw A. Thünemann, McSAS: software for the retrieval of model parameter distributions from scattering patterns, *J. Appl. Crystallogr.* 2015; 962- 969. DOI:10.1107/S1600576715007347.

**18.** Tanquary A, Lacey R. *Controlled Release of Biologically Active Agents.* Springer US; 1974. 264 p.

**19.** Talevi A. *The ADME Encyclopedia.* Springer US; 2022. 613-621 p.

**20.** Kovačević A, Müller R, Savić S, Vuleta G, Keck C. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.* 2014; 444:15–25. DOI:10.1016/j.colsurfa.2013.12.023.

**21.** Toledo C, Gambaro R, Padula G, Vela M, Castro G, Chain C, et al. Binary medical nanofluids by combination of polymeric Eudragit® nanoparticles for vehiculization of tobramycin and resveratrol: antimicrobial, hemotoxicity and protein corona studies. *J Pharm Sci.* 2021;110(4):1739-48. DOI:10.1016/j.xphs.2021.01.005.

**22.** Chinnaiyan S, Karthikeyan D, Gadela V. Development and characterization of metformin loaded pectin nanoparticles for t2 diabetes mellitus. *Pharm Nanotechnol.* 2018; 6:253–263. DOI: 10.2174/2211738507666181221142406.

23. Jeswani G, Chablani L, Gupta U, Sahoo R, Nakhate K, Ajazuddin. Development and optimization of paclitaxel loaded Eudragit<sup>®</sup>/PLGA nanoparticles by simplex lattice mixture design: Exploration of improved hemocompatibility and *in vivo* kinetics. *Biomed Pharmacother.* 2021; 144:112286. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112286.
24. Chen L, Glass J, De Rose R, *et al.* Influence of charge on hemocompatibility and immunoreactivity of polymeric nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater.* 2018;1(3):756-767. DOI:10.1021/acsabm.8b00220.
25. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Artaza M, Moreno R, Perin L, Esquisabel A, Pinto L, Pedraz J. Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61. DOI:10.1128/aac.01912-16.
26. Souto-Pradrón T, De Souza W. The surface charge of *Trypanosoma cruzi*: analysis using cell electrophoresis, lectins and ultrastructural cytochemistry. *J Submicrosc Cytol.* 1986;18(4):701-709. PMID: 3097334.
27. Ramírez-Rigo M, Olivera M, Rubio M, Manzo R. Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. *Eur J Pharm Sci.* 2014;(55):1-11. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.01.001.
28. Beloqui A, Coco R, Memvanga P, Ucakar B, des Rieux A, Préat V. pH-sensitive nanoparticles for colonic delivery of curcumin in inflammatory bowel disease. *Int J Pharm.* 2014;473(1):203-12. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.009.
29. Zhi K, Raji B, Nookala AR, Khan MM, Nguyen XH, Sakshi S, Pourmotabbed T, Yallapu MM, Kochat H, Tadrous E, *et al.* PLGA nanoparticle-based formulations to cross the blood–brain barrier for drug delivery: from r&d to cgmP. *Pharmaceutics.* 2021; 13(4):500. DOI: 10.3390/pharmaceutics13040500.
30. Santhanes D, Zhang H, Wilkins A, John Aitken R, Gannon A, Liang M. Engineering pH-sensitive dissolution of lipid-polymer nanoparticles by Eudragit integration impacts plasmid DNA (pDNA) transfection. *Eur J Pharm Biopharm.* 2024;199:114299. DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114299.
31. Perin L, Moreira da Silva R, Fonseca K, Cardoso J, Mathias F, Reis L, Molina I, Correa-Oliveira R, Vieira P, Carneiro C. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61. DOI:10.1128/aac.02410-16.
32. Perin L, Fonseca K da S, de Carvalho TV, Carvalho L, Madeira J, Medeiros L da F, *et al.* Low-dose of benznidazole promotes therapeutic cure in experimental chronic Chagas' disease with absence of parasitism in blood, heart and colon. *Exp Parasitol.* 2020; 210:107834. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.107834.
33. Diniz L, Urbina J, de Andrade I, Mazzeti A, Martins T, Caldas I, *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant

and Sequential Treatments. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(8): e2367. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002367.

**34.**Rodrigues W, Miguel C, Marques L, da Costa T, de Abreu M, Oliveira C, *et al.* Predicting blood parasite load and influence of expression of inos on the effect size of clinical laboratory parameters in acute *Trypanosoma cruzi* infection with different inoculum concentrations in c57bl/6 mice. Front Immunol. 2022; 13. DOI: 10.3389/fimmu.2022.850037.

**35.**Torrice F, Gascón J, Barreira F, *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial [published correction appears in Lancet Infect Dis. 2021;21(8):1129-1140. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30844-6.

**36.**Molina-Morant D, Fernández M, Bosch-Nicolau P, Sulleiro E, Bangher M, Salvador F, Sanchez-Montalva A, Ribeiro ALP, de Paula AMB, Eloi S, Correa-Oliveira R, Villar JC, Sosa-Estani S, Molina I. Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): study protocol for a multicenter randomized Phase II non-inferiority clinical trial. Trials. 2020. Erratum in: Trials. 2023;24(1):726. DOI: 10.1186/s13063-023-07659-5.

**37.**Bosch-Nicolau P, Fernández M, Sulleiro E, Villar J, Perez-Molina J, Correa-Oliveira R, *et al.* Efficacy of three benznidazole dosing strategies for adults living with chronic Chagas disease (MULTIBENZ): an international, randomised, double-blind, phase 2b trial. Lancet Infect Dis. 2024;24(4):386-94. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00629-1.



## CAPÍTULO 5

### ***DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES. PERSPECTIVAS.***

## Capítulo 5

### *Discusión y conclusiones generales. Perspectivas.*

La Organización Mundial de la Salud caracteriza a la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida que afecta a 6-7 millones de personas en el mundo, mayormente habitantes y oriundos de Latinoamérica (1). La farmacoterapia para el tratamiento de la enfermedad de Chagas recae en dos fármacos, el BNZ y NFX, descubiertos en los años 1960s y 1970s, con eficacia comprobada en la etapa aguda de la infección, pero con eficacia limitada en la fase crónica (2) según los resultados de los estudios clínicos BENEFIT y TRAENA, discutidos en secciones previas.

El tratamiento con BNZ es largo (dura 60 días y utiliza dosis elevadas: la recomendación es de 5- 7,5 mg/kg/d dividido en dos dosis diarias administradas después de las comidas (3, 4)). Este régimen de administración resulta tóxico en un porcentaje relativamente elevado de los pacientes adultos, quienes presentan síntomas tales como dolor de cabeza, anorexia, debilidad, rash cutáneo, problemas gastrointestinales y efectos en sistema nervioso periférico, que en muchos casos conducen al abandono del tratamiento (5). Se ha debatido si la ocurrencia de efectos adversos se debe a la posible sobredosificación y, en algunos casos, a reacciones idiosincrásicas (6). Indagando acerca de la implicancia de la sobredosificación en el tratamiento, se encontraron trabajos en lo que se realizaron ensayos clínicos no aleatorizados acortando la duración del tratamiento de 60 a 30 días, y se observó que algunos efectos adversos (neuropatía periférica y disminución de la cantidad de células de la médula espinal) se previnieron con el régimen modificado mientras otros (dermatitis e intolerancia digestiva) no. Por otro lado, se han realizado ensayos con reducción de dosis, sumando evidencia de que los efectos dermatológicos parecerían ser idiosincráticos (7). Acerca del resto de los efectos adversos, la evidencia no es concluyente. Por un lado, un ensayo clínico reveló una falta de correlación entre los niveles plasmáticos de BNZ y la incidencia de los efectos en 54 pacientes (8). Por otra parte, un estudio piloto utilizando una dosis de 5 mg/kg en un tratamiento intermitente durante 60 días demostró que, si bien un 50% de los pacientes reportaron efectos adversos estos fueron leves y no condujeron a la interrupción del tratamiento (9). Adicionalmente, se ha obtenido evidencia indirecta de

la eficacia de tratamientos cortos a partir de un estudio en 81 pacientes en el que un 75% abandonó el tratamiento estándar a los 10 días debido a los efectos adversos, y en el que se encontró que luego de 9 años un 59 % de los mismos había logrado la seroconversión (10). No obstante, se necesita sumar más evidencia proveniente de ensayos clínicos más rigurosos, utilizando grupos aleatorizados, comparando tratamientos más cortos o dosis más bajas. En 2021 se publicaron los resultados del ensayo clínico BENDITA (#NCT03378661) (11) que evaluó distintas dosis y duración del tratamiento para BNZ en monoterapia o en combinación con fosravuconazol. Se reportó una respuesta tripanocida sin diferencias entre los tratamientos, salvo en relación con el abandono del tratamiento, siendo menos ocurrente en tratamientos más cortos o con dosis más bajas. Recientemente, en abril de 2024 se han reportado los resultados del ensayo clínico MULTIBENZ (#NCT03191162) en el que se comparó la efectividad de BNZ utilizado en tres esquemas de dosificación (I: 150 mg/d durante 60 días, II: 400 mg/d durante 15 días y/o III: 300 mg/d durante 60 días) hallándose que los pacientes tuvieron respuestas parasitológicas similares, pero que, por otro lado, el tratamiento fue discontinuado en menor medida por los pacientes cursando el esquema corto (II) en comparación con el control (III) (12).

Sumando a estas incertidumbres acerca de la duración y posología óptimas para mejorar la relación eficacia/seguridad, también se observan inconsistencias en la clasificación del BNZ en el marco del SCB, como se mencionó en el capítulo introductorio. Tanto si el BNZ es clasificado como un fármaco de clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) o como clase IV (baja solubilidad, baja permeabilidad), los nanovehículos farmacéuticos podrían entrar en juego como estrategias para mejorar la solubilidad y/o la permeabilidad intestinal. Por ejemplo, como sucede en el caso de los nanocristales, aumentando la solubilidad aparente del fármaco, u optimizando la velocidad de disolución. Por otro lado, en el caso de otros nanosistemas, gracias a su pequeño tamaño y naturaleza lipofílica (por ejemplo, las nanopartículas lipídicas) podrían permitir su pasaje por barreras biológicas mejorando la permeabilidad del principio activo y escondiéndolo, a modo de caballo de Troya, de la acción de transportadores de eflujo.

Durante los últimos 20 años se han investigado y desarrollado en el ámbito académico numerosas formulaciones de nanosistemas de BNZ y NFX a partir de un extenso abanico de materiales con diferentes propiedades fisicoquímicas siendo los más estudiados los polímeros, los lípidos y los nanocristales (13). Se obtuvieron

nanopartículas con mejor desempeño respecto al fármaco libre en varios aspectos; por ejemplo, formulaciones de  $\text{CaCO}_3$  encapsulando BNZ menos tóxicas que el fármaco libre según ensayos en células LLC-MK2 o nanocristales de BNZ con una mejora en la permeabilidad del fármaco a través de una monocapa de Caco-2. Dentro del abanico de nanopartículas están incluidas las lipídicas y las poliméricas. La encapsulación de BNZ en nanosistemas lipídicos ha arrojado resultados positivos en cuanto a la obtención de sistemas de liberación controlada y permeabilidad incrementada (14). En cuanto a las formulaciones poliméricas se ha recopilado extensa información acerca de modificaciones de polímeros para agregar ligandos que interaccionen con receptores, por ejemplo (15).

Durante el presente trabajo de tesis se obtuvieron y evaluaron dos formulaciones de nanovehículos farmacéuticos, una de base lipídica y otra de base polimérica, con el objetivo de mejorar los parámetros farmacocinéticos del BNZ y, de esta manera, optimizar la seguridad y la eficacia del fármaco de una manera económica.

La primera formulación obtenida fue una formulación de partículas lipídicas nanoestructuradas, consiguiendo aproximadamente un 80% de EE, % de BNZ. Se verificó la morfología esférica con un tamaño promedio de alrededor de 150 nm, medido como su diámetro hidrodinámico. Se realizó la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas por métodos termogravimétricos, cristalografía de rayos x y espectroscopía infrarroja. A partir de los resultados de la caracterización fisicoquímica, se observó que el fármaco se encontró presente en un estado amorfo en el interior de las nanopartículas, sin interactuar con los excipientes.

Por otro lado, el sistema mostró un perfil de liberación inicial rápida seguida por una cinética de liberación más lenta, y no resultó hemolítico ni citotóxico en células CHO, Vero y Caco-2 a la concentración máxima ensayada. Se consiguió un efecto contra tripomastigotes similar al del fármaco en solución ( $EC_{50}$  de 5,73  $\mu\text{M}$  frente a 6,07  $\mu\text{M}$  para el fármaco libre), sin diferencias significativas entre los valores. Vale la pena tomar en cuenta, a la luz de este dato, las curvas de liberación de BNZ obtenidas desde el sistema nano. A las 24 horas de iniciado el ensayo se observó un porcentaje de disolución del fármaco sin encapsular similar al 90%, frente a un 74% desde la formulación nanolipídica. Esto podría traducirse como una menor cantidad de moléculas de fármaco libre para interactuar con los tripomastigotes en ese período

temporal. Por lo tanto, considerando, de manera conjunta, la antedicha similitud de efectos entre el fármaco libre y la formulación frente a *T. cruzi*, y el ensayo de liberación de BNZ, podríamos concluir que la formulación nano obtuvo efectos similares con menor cantidad de BNZ libre durante buena parte del ensayo de enfrentamiento, implicando que de alguna manera la formulación lipídica incrementa el efecto *in vitro* de BNZ contra ese estadio de *T. cruzi*.

Consistentemente con la observación anterior, en el contexto de experimentos *in vitro*, se observó que el vehículo vacío demostró acción tripanocida sobre los parásitos, ya que se vio disminuida la viabilidad en tripomastigotes de manera concentración-dependiente. Luego de enfrentar los componentes de la formulación individuales contra tripomastigotes, se determinó que el componente con actividad tripanocida es el miristil miristato, resultado que es en sí mismo interesante ya que este es un componente frecuente de muchas formulaciones farmacéuticas.

Retomando el resultado del ensayo de incubación de la formulación con tripomastigotes, una conclusión posible podría ser que el efecto intrínseco del vehículo compensa la menor concentración de fármaco libre asociada a la cinética de liberación desde las nanopartículas, explicándose la similitud de las  $EC_{50}$ s obtenidas para la formulación y el fármaco libre.

Por otro lado, se ensayó la incubación de la formulación frente a amastigotes obteniendo un efecto similar entre las nanopartículas y el fármaco libre sin diferencias significativas entre tratamientos. Además, se evidenció el efecto concentración-dependiente del miristil miristato sobre los amastigotes, a concentraciones más elevadas respecto a las observadas en tripomastigotes, registrándose un efecto más pronunciado a partir de una concentración de 25  $\mu$ M. De aquí podría desprenderse que, tal vez, el mecanismo de acción de este lípido implique un blanco molecular con mayor nivel de expresión en el estadio tripomastigotes que en amastigotes.

Los resultados de ensayos farmacocinéticos mostraron que, al comparar los valores de áreas bajo la curva ( $AUC_{0-\infty}$  y  $AUC_{0-t}$ ) del perfil plasmático y los de concentración plasmática máxima ( $Cp_{m\acute{a}x}$ ) tanto para la formulación de nanopartículas lipídicas como para el fármaco libre en solución no hubo diferencias significativas entre los tratamientos luego de una administración oral.

El ensayo en el modelo murino de infección aguda, por su parte, mostró como resultado que el tratamiento con la formulación alcanzó un valor promedio de tripomastigotes por mililitro de sangre periférica sin diferencias respecto al BNZ 10 mg/kg/d, y que el porcentaje de supervivencia fue menor en comparación con el fármaco libre. El desempeño de las nanopartículas con BNZ fue, sin embargo, superior al del vehículo y al de las nanopartículas vacías en relación con el porcentaje de supervivencia. Por otra parte, se realizó un primer ensayo farmacocinético administrando por vía intraperitoneal el fármaco libre y la formulación. Si bien no se realizaron repeticiones para efectuar una comparación estadística, de este primer ensayo se observó una aparente tendencia para la formulación de nanopartículas a un mayor valor de AUC, por lo que sería interesante explorar si nuestras nanoformulaciones presentan alguna ventaja en términos de eficacia utilizando vías de administración distintas a la oral. No obstante, el perfil de desarrollo de productos terapéuticos para el tratamiento del Chagas en general prioriza el desarrollo de sistemas terapéuticos de uso oral. Por otro lado, en concordancia con el resultado de los estudios *in vitro* (en donde se observó un efecto intrínseco del vehículo y del miristil miristato sobre los parásitos), se evidenció un mayor porcentaje de supervivencia en los ratones tratados con las nanopartículas vacías comparados con los ratones tratados con el vehículo en el que se disolvió el fármaco.

La segunda formulación fue una formulación polimérica compuesta del polímero neutro Eudragit® NE30D. Esta formulación alcanzó una EE, % de alrededor del 80%, y mostró un perfil de liberación sostenida del fármaco. La morfología de las nanopartículas fue esférica con un diámetro medio de aproximadamente 150 nm. Se realizó la caracterización fisicoquímica y, de igual modo que en la formulación lipídica, se encontró al BNZ localizado de manera amorfa en el interior de las partículas.

La formulación no resultó hemolítica ni citotóxica en células CHO, Vero y Caco-2 a la concentración máxima ensayada. Del resultado del ensayo de incubación con tripomastigotes se observó que la  $EC_{50}$  del BNZ en la formulación polimérica tendió a ser más elevada en comparación con el fármaco libre (13,14  $\mu$ M frente a 6,07  $\mu$ M), aunque no hubo diferencias significativas debido a la dispersión entre las repeticiones. El vehículo vacío no presentó toxicidad a una concentración de 100  $\mu$ M. Teniendo en cuenta que el porcentaje de liberación del BNZ es del 90 % a las 24 horas mientras que del BNZ desde la formulación es del 70 %, se esperaría que una menor cantidad de BNZ desde la formulación interactuase con el parásito. Por otro lado, los ensayos de

incubación contra amastigotes revelaron resultados similares a los anteriores en cuanto a efecto del BNZ como fármaco libre y en la formulación, la eficacia de ambos tratamientos parecería ser la misma. Aunque de nuevo se observan tendencias en los datos, la variabilidad del ensayo es elevada y las diferencias aparentes no tienen peso estadístico.

Los ensayos farmacocinéticos arrojaron como resultado que las AUC no exhibieron diferencias significativas tanto para el tratamiento con el fármaco libre como para la formulación de nanopartículas poliméricas luego de una administración oral. De igual modo que para la formulación lipídica, en los ensayos *in vivo*, se alcanzaron valores de tripomastigotes por mililitro de sangre sin diferencia respecto a BNZ 10 mg/kg/d, y el porcentaje de supervivencia fue menor respecto al fármaco libre. Los ratones tratados con EU-BNZ tuvieron una mayor sobrevida en comparación a los ratones tratados con el vehículo y con las nanopartículas vacías.

Volviendo a los antecedentes en bibliografía, de manera similar a lo observado durante el estudio BERENICE, en el que se observó la necesidad de mayores dosis de NLC-BNZ para obtener efecto similar al fármaco libre, nuestras formulaciones no optimizaron el efecto del BNZ *in vivo*. Por nuestra parte, tal vez sería interesante si capitalizáramos la liberación retardada del BNZ encapsulado en sistemas nano para su estudio en modelos crónicos de la enfermedad.

### *Perspectivas a futuro*

En vista de seguir explorando el universo de las nanomedicinas como alternativas superadoras a los problemas farmacocinéticos de los fármacos categorizados como clase II y/o clase IV en el SCB, una perspectiva a futuro que nos interesaría es probar nuestras nanopartículas en un sistema *in vivo* en ratones debido a la baja permeabilidad del BNZ. Si bien es alta la correlación entre el modelo de permeabilidad en células Caco-2 con un modelo más complejo de absorción como un modelo *ex vivo* (utilizando una porción de tejido intestinal humano o animal), muchos fármacos de baja permeabilidad podrían tener mayor biodisponibilidad *in vivo* ya que se valen de las especialidades anatómicas del intestino para ser absorbidos, o la presencia de enzimas digestivas o el pH estomacal influyen fuertemente difiriendo en los valores de permeabilidad aparente obtenido en uno u otro modelo. Sería interesante probar la permeabilidad de nuestra formulación en

el modelo celular MDCK-*mdr1* que sobreexpresa P-gp para evaluar el impacto de las nanopartículas sobre la absorción.

Visto que en el ensayo en modelo murino de infección aguda el BNZ libre demostró un mejor desempeño que el BNZ encapsulado, sería interesante mejorar nuestros sistemas para conseguir direccionamiento activo hacia el parásito a través de la incorporación de moléculas decorativas de superficie con posibles interacciones con receptores ubicados en la membrana de *T. cruzi* o receptores del huésped regulados hacia arriba en células infectadas. Un objetivo concatenado a esto último es estudiar la distribución de las formulaciones a partir de la marcación de las nanopartículas con una sonda fluorescente para realizar su seguimiento en ratones, a fin de evaluar que órganos presentan una mayor acumulación de principio activo.

Además, en vista de seguir mejorando nuestros sistemas, nos sería de interés probar el agregado de aceites esenciales con actividad tripanocida a nuestra formulación lipídica como lípido líquido nanoestructurante. Se han realizado numerosos reportes de aceites esenciales extraídos de distintas partes de plantas con actividad tripanocida que podrían sumar a la acción del BNZ permitiendo una disminución de la dosis.

Teniendo en cuenta la carga levemente negativa de nuestras nanopartículas, sería interesante la síntesis de una nanopartícula híbrida con un núcleo lipídico y una cubierta polimérica a fin de poder modificar la superficie fácilmente alterando la carga superficial hacia valores más positivos, que podría favorecer la adhesión y captación celular, o la liberación dirigida uniendo covalentemente un anticuerpo que interactúe con algún antígeno de *T. cruzi*.

Una perspectiva interesante, y no anticipada, del trabajo realizado se vincula a la actividad intrínseca del miristil miristato, siendo de futuro interés el estudio de derivados de este compuesto con posible actividad tripanocida y la caracterización de su mecanismo de acción. Sería interesante evaluar mediante técnicas de microscopía si el lípido afecta la integridad de la membrana del parásito. Adicionalmente, habiendo verificado que existen numerosos reportes en literatura de la actividad antiprotozoaria de diversos ácidos grasos, la obtención de otros sistemas lipídicos nanoestructurados basados en otros ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos con actividad tripanocida resulta una perspectiva alentadora.

Finalmente, nuestro mayor interés a futuro reside en realizar los enfrentamientos de nuestros sistemas de liberación prolongada en modelos *in vivo* de la etapa crónica de la enfermedad a fin de evidenciar los posibles efectos de alcanzar una concentración de BNZ en plasma sostenida en el tiempo con el objetivo de una disminución de la dosis o de un cambio en el esquema de dosificación. En ese caso, podría priorizarse el uso de la formulación lipídica buscando un efecto sinérgico y/o de aditividad con el BNZ en el modelo crónico.

## Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). [Último acceso Abril 2024].
2. Ribeiro V, Dias N, Paiva T, Hagström-Bex L, Nitz N, Pratesi R, *et al.* Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2020; 12:7-17. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.11.004.
3. Drugs for Neglected Diseases *initiative*. Un estudio muestra que un tratamiento más corto para la enfermedad de Chagas puede ser igual de eficaz y mucho más seguro | DNDi. Disponible en: <https://dndi.org/press-releases-translations/2019/estudio-muestra-tratamiento-mas-corto-para-la-enfermedad-de-chagas/>. [Último acceso Abril 2024].
4. Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación | Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/guias-para-la-atencion-al-paciente-infectado-con-trypanosoma-cruzi-enfermedad-de-chagas>. [Último acceso Abril 2024].
5. Aldasoro E, Posada E, Requena-Méndez A, Calvo-Cano A, Serret N, Casellas A, *et al.* What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(4):1060-7. DOI: 10.1093/jac/dkx516.
6. Keenan M, Chaplin J. A new era for chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem.* 2015; 54:185-230. DOI: 10.1016/bs.pmch.2014.12.001.
7. Cafferata M, Toscani M, Althabe F, Belizán J, Bergel E, Berrueta M, Capparelli E, Ciganda Á, Danesi E, Dumonteil E, Gibbons L, Gulayin P, Herrera C, Momper J, Rossi S, Shaffer J, Schijman A, Sosa-Estani S, Stella C, Klein K, Buekens P. Short-course Benznidazole treatment to reduce *Trypanosoma cruzi* parasitic load in women of reproductive age (BETTY): a non-inferiority randomized controlled trial study protocol. *Reprod Health.* 2020;17(1):128. DOI: 10.1186/s12978-020-00972-1.
8. Pinazo M, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 ;57(1):390-5. DOI: 10.1128/AAC.01401-12.
9. Álvarez M, Ramírez J, Bertocchi G, *et al.* New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: clinical, parasitological, and serological assessment after three years of follow-up. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(9):e00439-20. DOI:10.1128/AAC.00439-20.
10. Alvarez M, Vigliano C, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Viotti R. Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(10):636-638. DOI:10.1016/j.trstmh.2012.07.010.

- 11.** Torrico F, Gascón J, Barreira F, *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial [published correction appears in *Lancet Infect Dis.* 2021;21(8):1129-1140. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30844-6.
- 12.** Bosch-Nicolau P, Fernández M, Sulleiro E, Villar J, Perez-Molina J, Correa-Oliveira R, *et al.* Efficacy of three benznidazole dosing strategies for adults living with chronic Chagas disease (MULTIBENZ): an international, randomised, double-blind, phase 2b trial. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(4):386-94. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00629-1.
- 13.** Morilla M, Ghosal K, Romero E. Nanomedicines against Chagas disease: a critical review. *Beilstein J Nanotechnol.* 2024;15(1):333-49. DOI:10.3762/bjnano.15.30.
- 14.** Arrua E, Hartwig O, Loretz B, Murgia X, Ho D, Bastiat G, Lehr C, Salomon C. Formulation of benznidazole-lipid nanocapsules: Drug release, permeability, biocompatibility, and stability studies. *Int J Pharm.* 2023; 642:123120. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123120.
- 15.** Elsabahy M, Wooley K. Strategies toward well-defined polymer nanoparticles inspired by nature: chemistry versus versatility. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2012; 50(10):1869-1880. DOI:10.1002/pola.25955.

# Producción científica

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron las siguientes presentaciones y/o publicaciones internacionales con referato:

## 1. Reuniones científicas

- XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Parasitología

Autores: Muraca G, Piñeiro M, Marchetto M, Chain C, Cisneros S, Alba Soto C, Islan G, Talevi A.

Título: “*Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and amastigotes in vitro viability after incubation with benznidazole-loaded polymeric nanoparticles”.

1 al 3 de Noviembre 2023, La Plata, Argentina (Presentación de póster).

- XI Congreso de la Sociedad Argentina de Parasitología

Autores: Muraca G, Soto C, Sbaraglini M, Chain Y, Alvarez V, Castro G, Islan G, Talevi, A.

Título: “*The effect of benznidazole-loaded nanostructured lipid carriers on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and amastigotes*”.

16 al 18 de Marzo 2022, Mendoza, Argentina (Presentación de póster).

- II Conferencia “Frontiers in Nanobiotechnology”

Autores: Muraca G, Islan G, Ruiz M, Scioli S, Pesce G, Talevi A.

Título: “*Chagas disease: pharmaceutical nanovehicles encapsulating benznidazole*”.

4 y 5 de Febrero 2020, Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires (Presentación de póster).

- LXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biociencias

Autores: Muraca G, Islan G, Ruiz M, Scioli S, Pesce G, Talevi A.

Título: “*Chagas disease: pharmaceutical nanovehicles encapsulating benznidazole*”.

13 al 16 de Noviembre 2019, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (Presentación de póster).

- 1ª Congreso en Ciencia Reguladora ANMAT

Autores: Muraca G, Islan G, Ruiz M, Scioli S, Pesce G, Talevi A.

Título: “Enfermedad de Chagas: desarrollo de nanovehículos farmacéuticos encapsulando benznidazol”.

10 y 11 de Septiembre 2019, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (Presentación de póster).

## 2. Publicaciones

- **Muraca G**, Ruiz M, Gambaro R, Montoto S, Sbaraglini M, Padula G, Cisneros S, Chain Y, *et al.* Nanostructured lipid carriers containing benznidazole: physicochemical, biopharmaceutical and cellular *in vitro* studies. *Belstein j nanotechno.* 2023; (14):804-818. DOI:10.3762/bjnano.14.66.

- Scioli Montoto S, **Muraca G**, Di Ianni M, Couyoupetrou M, Pesce G, Islan G, *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. DOI:10.1016/j.jddst.2021.102470.

- Talevi A\*, **Muraca G**, Rivero Berti I, Sbaraglini M, Fávvaro W, Durán N, Castro G. Trypanosomatid-caused conditions: state of the art of therapeutics and potential applications of lipid-based nanocarriers. *Front. Chem.* 2020; (8):601151 DOI:10.3389/fchem.2020.601151.

- Scioli Montoto S, **Muraca G**, Ruiz M.A\*. Solid lipid nanoparticles for drug delivery: pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Front. Mol. Biosci.* 2020; (7):587997. DOI:10.3389/fmolb.2020.587997.

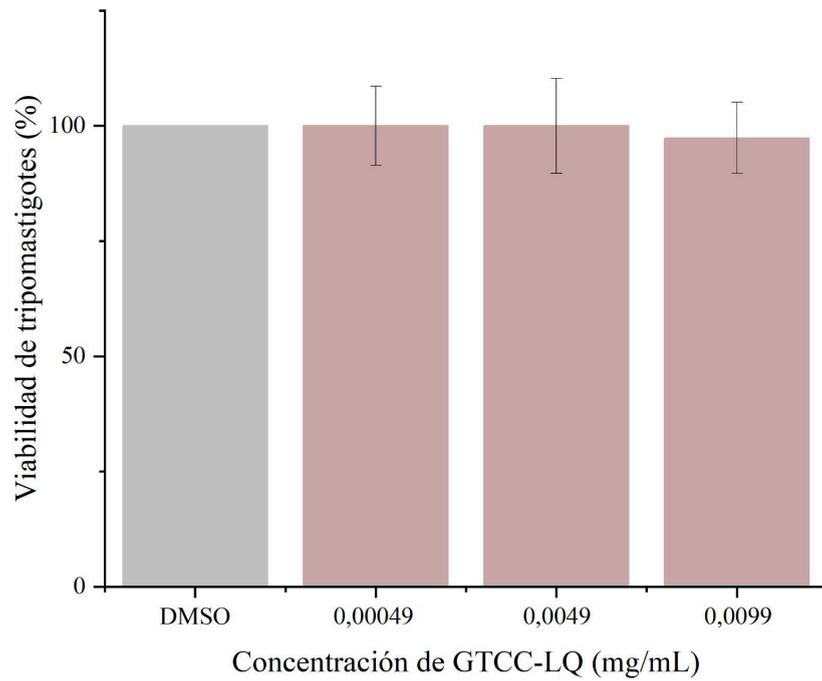
Se obtuvieron las siguientes becas de estudio:

- Beca de viaje y asistencia al curso de posgrado “*Concepts in Parasitology*” patrocinado por “*Australian Parasitology Society*” y llevado a cabo en la

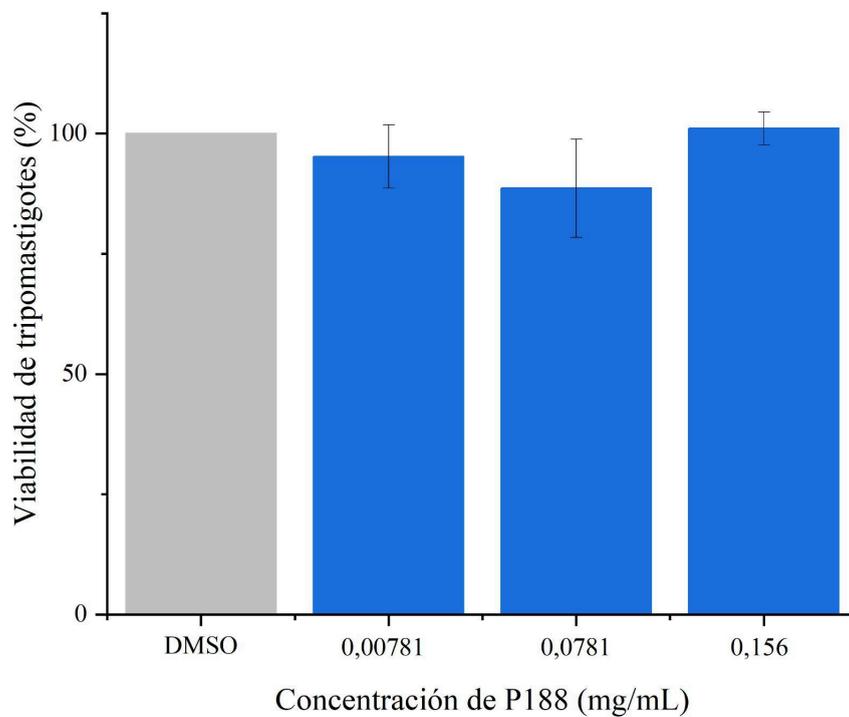
Universidad de Queensland, Dunwich, Australia.

- Beca de viaje y asistencia al curso de posgrado “III Diseño y ejecución de ensayos biológicos aplicados a la biomedicina” patrocinado por el Sistema Nacional de Bioterios y llevado a cabo en la Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fé.
- Beca de viaje y asistencia al curso de posgrado “Produção e formulação nanoestruturada de biofármacos” patrocinado por “Escuela Brasileira- Argentina de Biotecnología” y llevado a cabo en Universidade de São Paulo- USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

## Material suplementario



**Figura S1.** Porcentaje de viabilidad de tripomastigotes en presencia de concentraciones crecientes de una suspensión de lípido líquido GTCC-LQ. Se reporta el promedio y desvío estándar.



**Figura S2.** Porcentaje de viabilidad de tripomastigotes en presencia de concentraciones crecientes de una solución de P188. Se reporta el promedio y el desvío estándar.

## Tablas de parasitemia

- Ensayo *in vivo* en modelo murino de enfermedad aguda. Tratamientos: VEHÍCULO (solución fisiológica + DMSO20%), BNZ 10 mg/kg/d, BNZ 20 mg/kg/d, NLC-BNZ 10 mg/kg/d, EU-BNZ 10 mg/kg/d, NLC-VEHÍCULO y EU-VEHÍCULO.

**Tabla S1.** Medición de parasitemia del grupo “VEHÍCULO” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+++	5,75E+05	9,50E+05	X	X	X
2	-	+++	2,00E+05	1,20E+06	X	X	X
3	-	++	4,00E+05	5,00E+04	X	X	X
4	-	++	1,00E+05	6,50E+05	X	X	X
5	-	+++	4,30E+05	4,50E+05	X	X	X

**Tabla S2.** Medición de parasitemia del grupo “BNZ 10 mg/kg/d” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+	1,30E+05	5,00E+04	1,00E+05	5,00E+04	0
2	-	+	0	0	3,50E+05	1,00E+05	5,00E+04
3	-	++	6,00E+04	0	9,00E+05	2,50E+05	1,76E+06
4	-	+++	5,00E+04	0	1,50E+05	0	0
5	-	+	5,00E+04	5,00E+04	8,30E+05	8,33E+05	3,25E+06

**Tabla S3.** Medición de parasitemia del grupo “BNZ 20 mg/kg/d” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+	5,00E+04	0	0	6,60E+04	0
2	-	++	0	5,00E+04	6,30E+05	3,50E+05	0
3	-	+	0	0	1,50E+05	6,60E+04	0
4	-	+	3,00E+04	0	1,25E+06	6,66E+05	5,00E+04
5	-	+	0	5,00E+04	1,00E+05	6,60E+04	0

**Tabla S4.** Medición de parasitemia del grupo “NLC-BNZ 10 mg/kg/d” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+	0	2,50E+05	2,06E+06	4,0E+05	3,47E+06
2	-	+++	0	X	X	X	X
3	-	++	1,00E+05	1,00E+05	7,00E+05	6,33E+05	5,66E+05
4	-	+	1,30E+05	1,15E+06	X	X	X
5	-	++	1,00E+05	6,00E+05	X	X	X

**Tabla S5.** Medición de parasitemia del grupo “NLC-VEHÍCULO” por animal mediante el método semi-cuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+++	5,00E+05	6,50E+05	X	X	X
2	-	-	7,00E+05	6,50E+05	X	X	X
3	-	+	6,00E+05	1,00E+06	2,60E+06	9,00E+05	5,00E+01
4	-	++	9,00E+05	7,50E+05	7,30E+06	X	X
5	-	+	6,50E+05	6,50E+05	5,30E+06	3,07E+06	X

**Tabla S6.** Medición de parasitemia del grupo “EU-BNZ 10 mg/kg/d” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	19 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	+++	2,60E+05	0	1,00E+06	1,00E+05	2,00E+05
2	-	++	<b>6,00E+05</b>	<b>7,00E+05</b>	X	X	X
3	-	++	2,00E+05	5,00E+04	X	X	X
4	-	+	<b>1,30E+05</b>	<b>1,00E+05</b>	X	X	X
5	-	++	5,00E+04	0	X	X	X

**Tabla S7.** Medición de parasitemia del grupo “EU-VEHÍCULO” por animal mediante el método semicuantitativo de gota fresca. -: 0parásitos/20 campos; +: 1-5 p/20 campos; ++ 5-10 p/20campos; +++ >10 p/20campos

Ratón	Gota Fresca		Tripomastigotes/mL				
	5 dpi	10 dpi	13 dpi	16 dpi	20 dpi	23 dpi	27 dpi
1	-	-	3,00E+05	8,50E+05	X	X	X
2	-	+	<b>7,67E+05</b>	<b>8,00E+05</b>	X	X	X
3	-	++	5,50E+05	1,35E+06	X	X	X
4	-	-	<b>9,50E+05</b>	<b>4,50E+05</b>	<b>5,35E+06</b>	X	X
5	-	++	1,20E+06	4,50E+05	X	X	X

### Seguimiento de peso por ratón

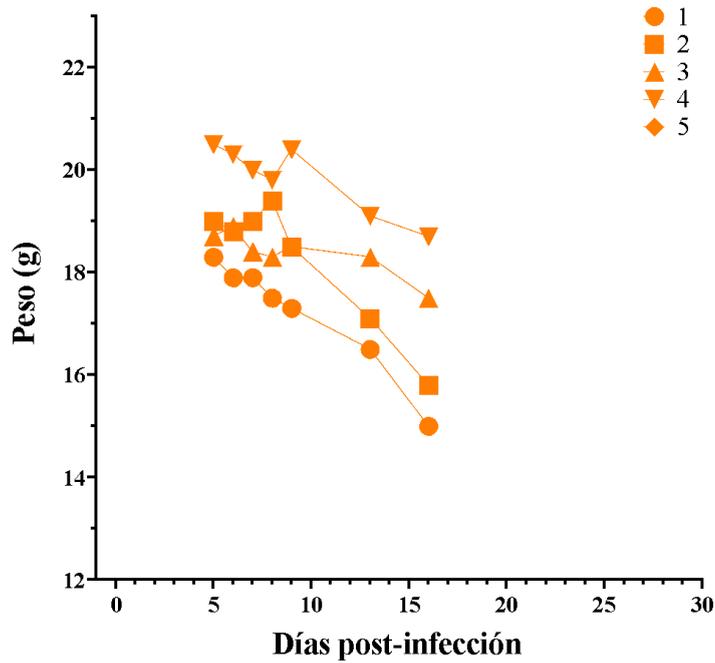


Figura S1. Pesos individuales de los ratones del grupo VEHÍCULO.

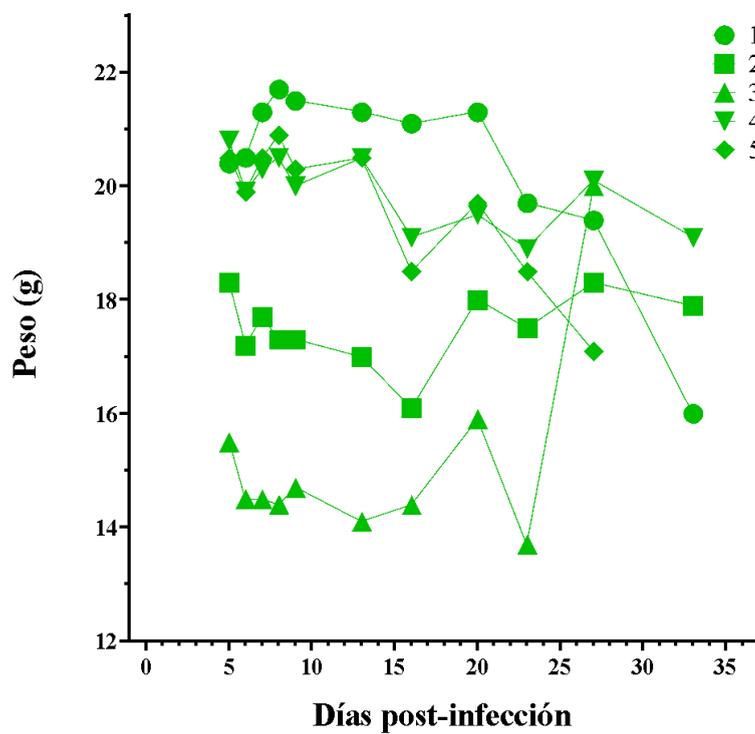


Figura S2. Pesos individuales de los ratones del grupo BNZ 10 mg/kg/d.

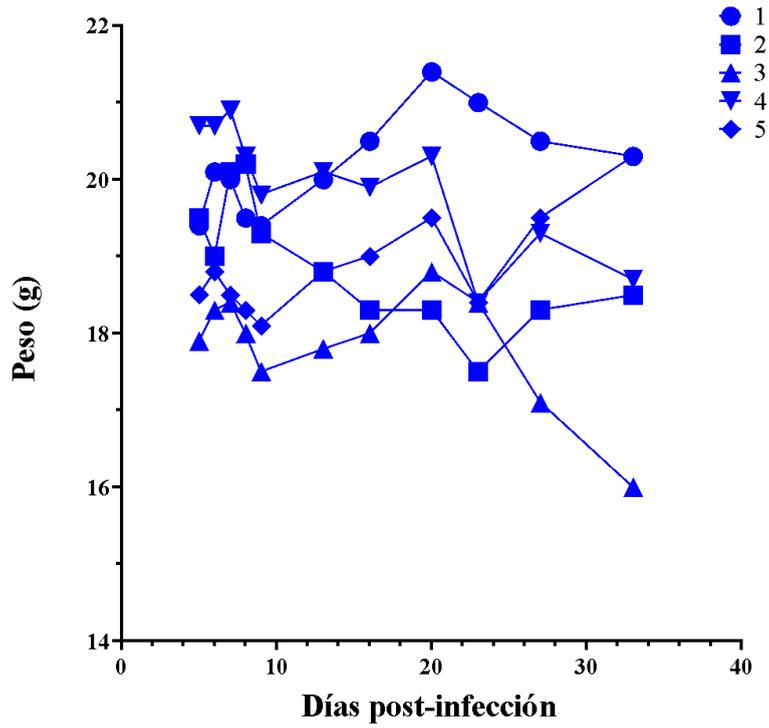


Figura S3. Pesos individuales de los ratones del grupo BNZ 20 mg/kg/d.

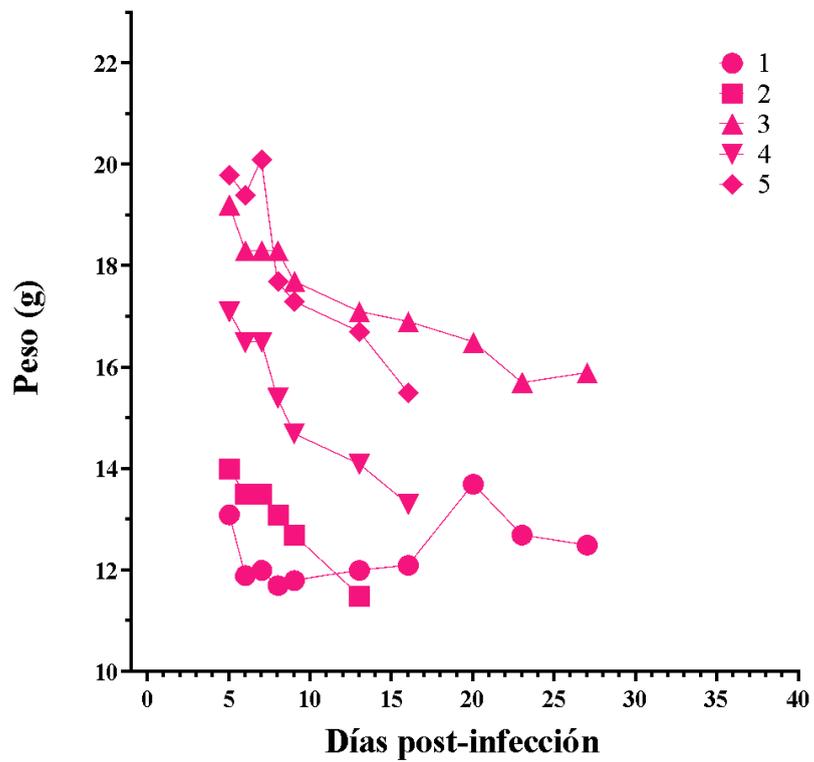


Figura S4. Pesos individuales de los ratones del grupo NLC 10 mg/kg/d.

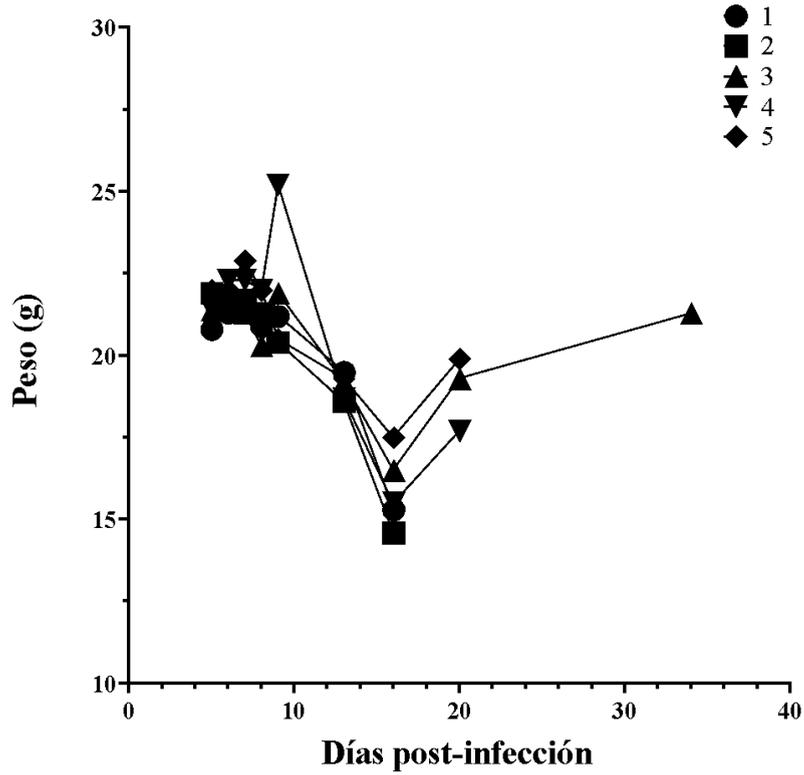


Figura S5. Pesos individuales de los ratones del grupo NLC-VEHÍCULO.

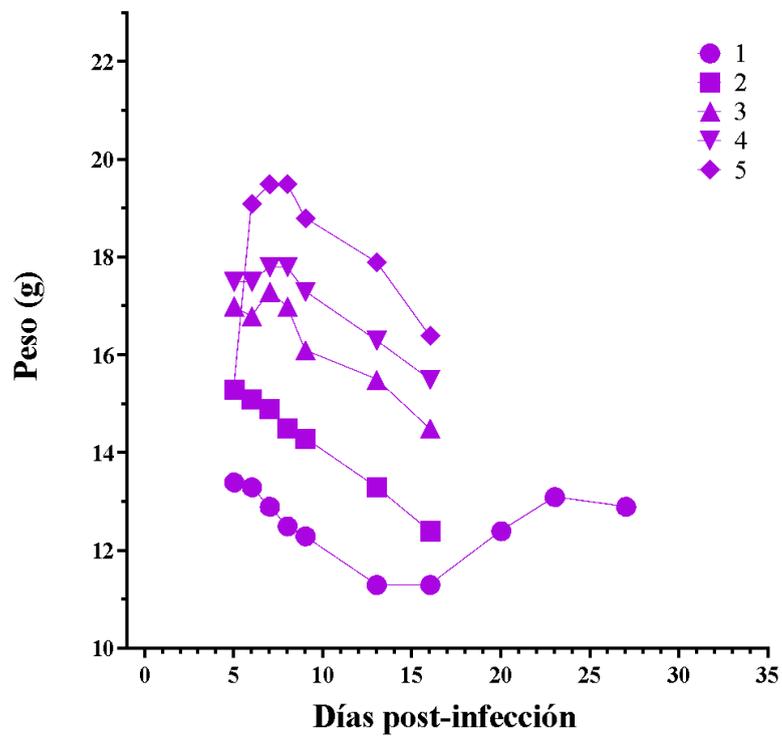


Figura S6. Pesos individuales de los ratones del grupo EU-BNZ 10 mg/kg/d.

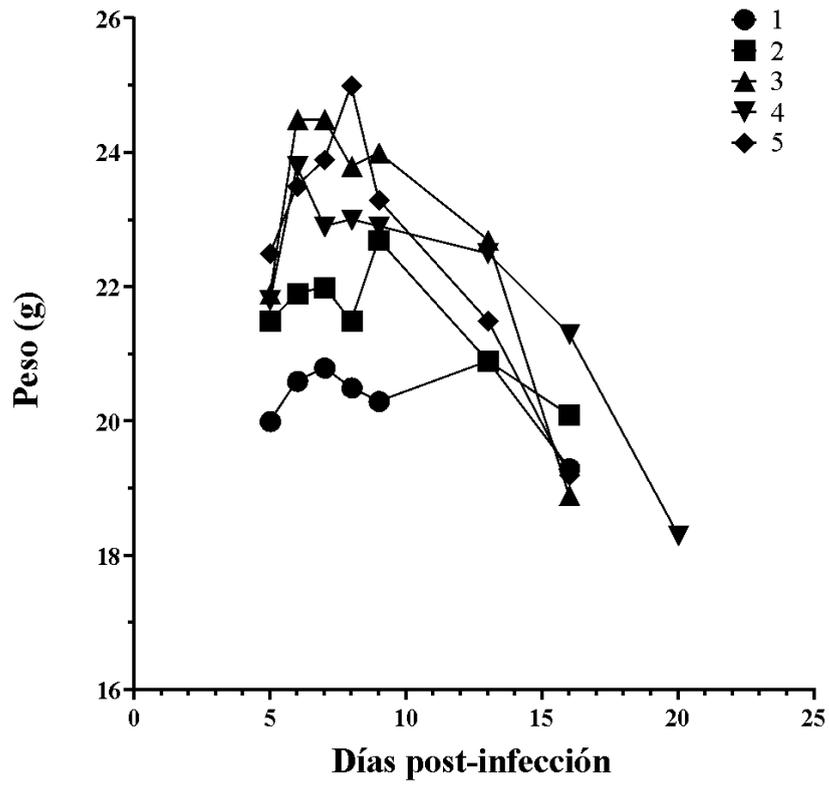


Figura S7. Pesos individuales de los ratones del grupo EU-VEHÍCULO.

### Seguimiento de parasitemia por ratón

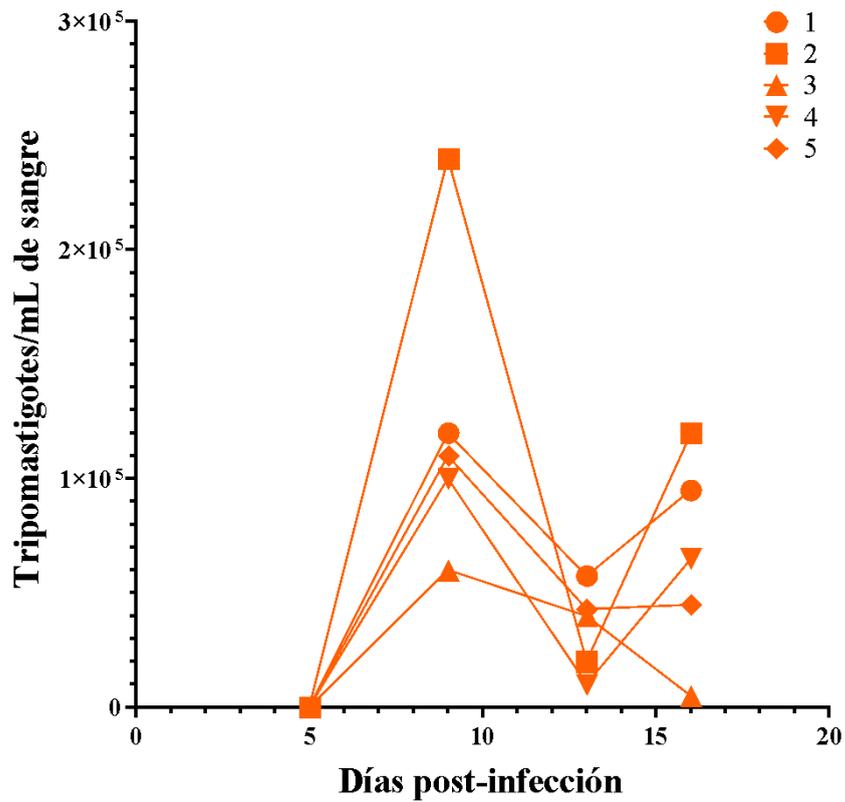


Figura S8. Parasitemias individuales de los ratones del grupo VEHÍCULO.

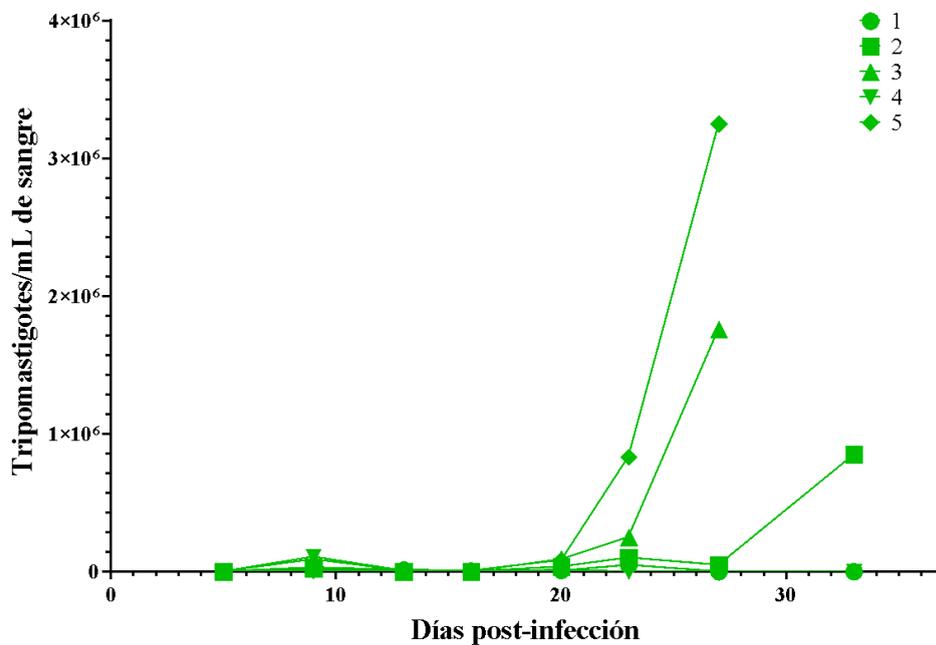


Figura S9. Parasitemias individuales de los ratones del grupo BNZ 10 mg/kg/d.

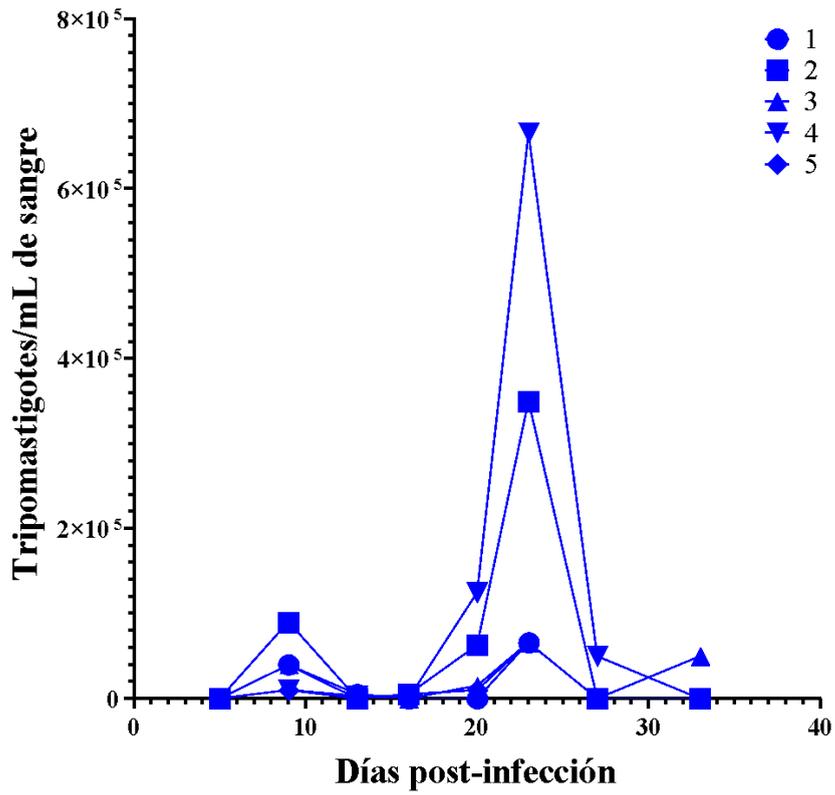


Figura S10. Parasitemias individuales de los ratones del grupo BNZ 20 mg/kg/d.

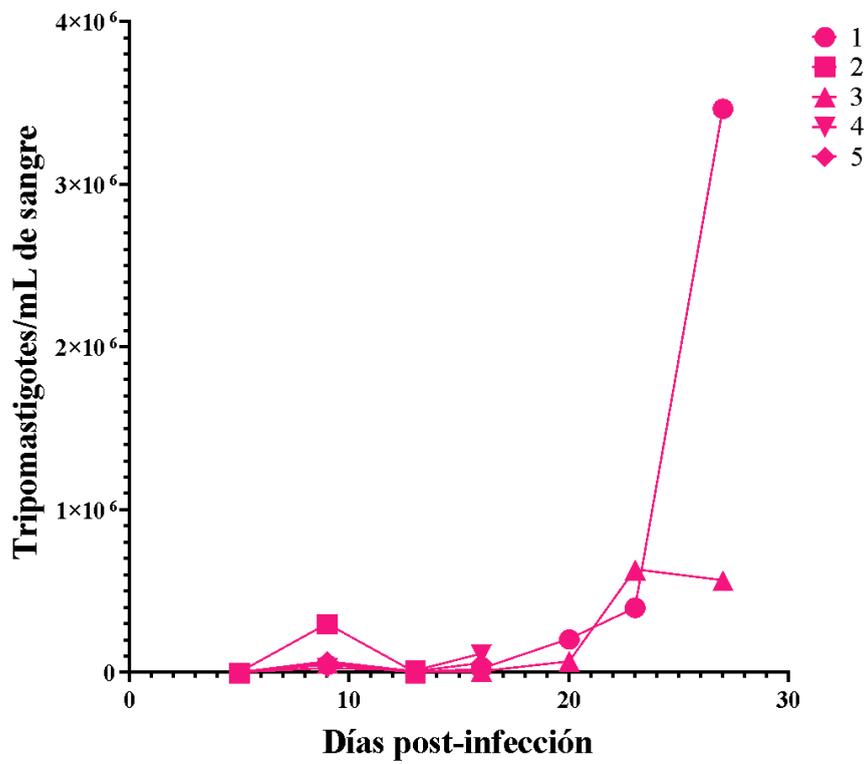


Figura S11. Parasitemias individuales de los ratones del grupo NLC-BNZ 10 mg/kg/d.

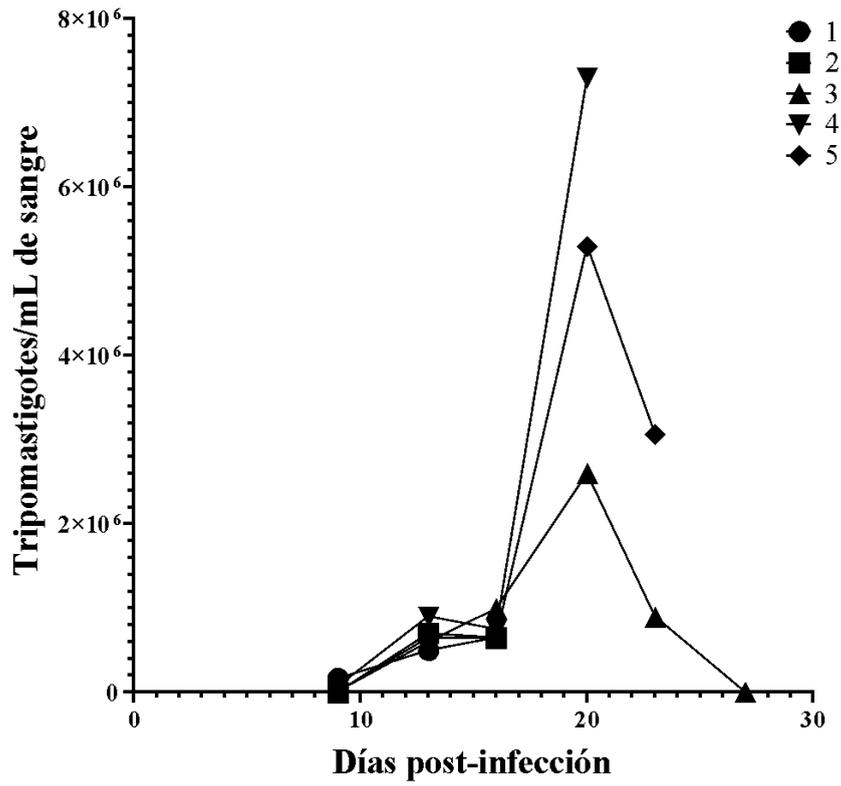


Figura S12. Parasitemias individuales de los ratones del grupo NLC-VEHÍCULO.

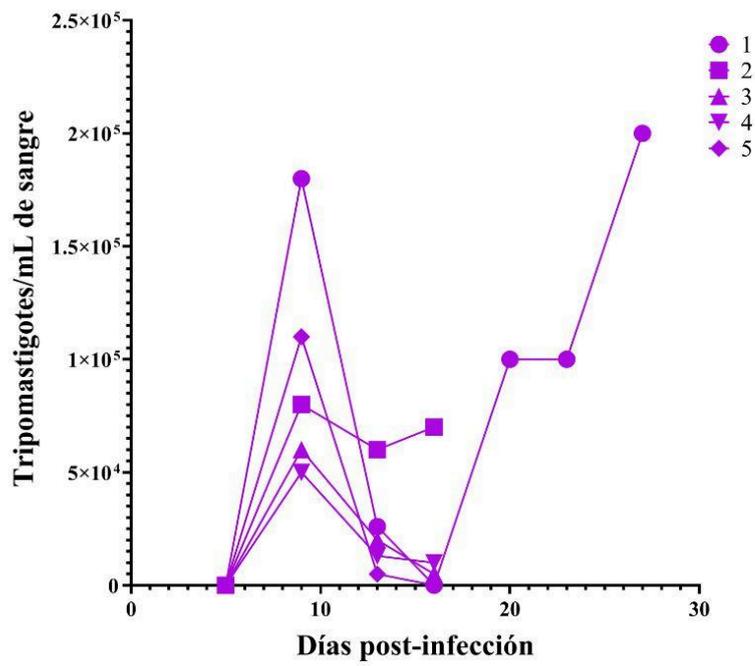
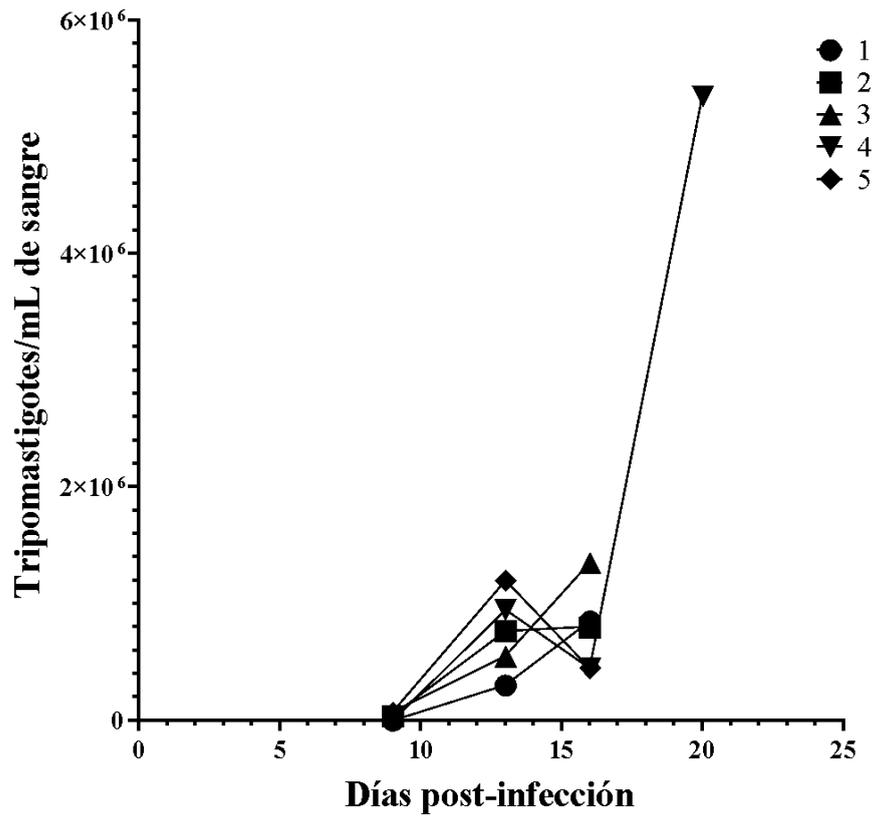


Figura S13. Parasitemias individuales de los ratones del grupo EU-BNZ 10 mg/kg/d.



**Figura S14.** Parasitemias individuales de los ratones del grupo EU-VEHÍCULO.

# Anexo I



La Plata, 24 de abril de 2023

Se deja constancia de que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha recibido el protocolo de utilización de animales presentado por el Dr. Alan Talevi (Dra. María Esperanza Ruíz, como responsable alterno), titulado "ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE FÁRMACOS."

Actualmente se encuentra en evaluación respecto de las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica (Consejo Nacional de Investigaciones, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

Número de Protocolo: **004-00-23**



Prof. Dra. Daniela Harbor  
Lab. VacSal IBBM-FCE-UNLP-COMCET

Coordinadora CICUAL



Pablo F. Pérez  
Responsable alterno

PROTOCOLO **004-00-23**  
"ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE FÁRMACOS."  
Responsable: Dr. Alan Talevi  
Responsable Alterno: Dra. María Esperanza Ruíz



*1821 Universidad de Buenos Aires*

## **Resolución Consejo Directivo**

**Número:** RESCD-2022-3544-E-UBA-DCT#FMED

CIUDAD DE BUENOS AIRES  
Viernes 14 de Octubre de 2022

**Referencia:** RESCD- EX-2022-02948470- -UBA-DMEA#FMED.- LA

---

SESION DEL CONSEJO DIRECTIVO DEL DIA 13 DE OCTUBRE DE 2022

**VISTO:** la presentación elevada por **Catalina Dirney ALBA SOTO**, mediante la que solicitaron el aval del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio, de acuerdo a lo establecido en la resolución (CS) n°4081/04; y

### **CONSIDERANDO:**

Que obra en la presentación lo dictaminado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio.

Que se aprueba el dictamen de la Comisión de Investigación.

Que el Estatuto Universitario en su artículo 113° faculta a este Cuerpo para el dictado de la presente.

Por ello,

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE MEDICINA

RESUELVE:

ARTICULO 1º.-Aprobar el protocolo presentado por **Catalina Dirney ALBA SOTO** titulado "**Obtención y evaluación preclínica de nanovehículos farmacéuticos para aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Chagas**" con lugar de trabajo en el **Instituto de Microbiología y Parasitología (IMPAM)-UBA-CONICET**, de acuerdo a lo establecido en la Resolución (CD) n° 4081/04.

ARTICULO 2º.- REGISTRESE; pase a la Secretaría de Ciencia y Técnica para su conocimiento, comunicaciones que correspondan y demás efectos.

Digitally signed by DAMIN Carlos Fabian  
Date: 2022.10.14 15:43:10 ART  
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

**Carlos Damin**  
Secretario General  
Secretaría General  
Facultad de Medicina UBA

Digitally signed by NEGRI Claudia Viviana  
Date: 2022.10.14 18:18:07 ART  
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

**Claudia Viviana Negri**  
Vicedecana  
Decanato  
Facultad de Medicina UBA

*Aval del Comité Consultivo Central de Bioética de la U.N.L.P.*

*Conformidad del Comité Consultivo Central de Bioética.*

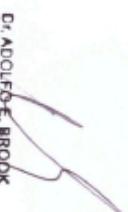
----- Por la presente se informa que se ha leído y aprobado el proyecto de investigación "Daño genómico asociado a la administración de dos formas de tratamiento preventivo de la anemia ferropénica: una aproximación in vitro" y corresponde su aprobación.-----

*Apellido y nombre de la postulante Lic. Rocio Gambaro.*

*La Plata, 14 de Setiembre de 2017.*



Dr. DANIEL DE SAVA STIZMAN  
Comité Consultivo Central de Bioética  
Dirección de Salud UNLP



Dr. ADOLFO E. BROOK  
Presidente  
Comité Consultivo Central de Bioética UNLP



La Plata, 13 de Diciembre de 2016

Dra Gisel Padula

Del IGEVET (UNLP-CONICET)

S \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ D

Me dirijo a Usted de acuerdo a la solicitud de hemocomponentes con el fin de utilizarla por la Lic. Rocío Gambaro DNI: 35073033 para llevar a cabo técnicas vinculadas al proyecto **“Daño genómico asociado a la administración de dos formas de tratamiento preventivo de la anemia ferropénica: una aproximación *in vitro*”** y afines.

En este contexto, le hago saber que cuentan con la entrega a demanda de hemocomponentes por parte de esta Institución para realizar dicho proyecto.

Sin más, saludo a Ud atentamente.