

MICROESFERAS DE QUITOSANO COMO POTENCIALES TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y OTROS BIOACTIVOS

Alvaro D. Olivera¹, María F. Barreiro², Mary Lopretti^{1,3,*}

1) Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: mlopre@fcien.edu.uy

2) Laboratório de Processos de Separação e Reacção (LSRE), Laboratório Associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857 Bragança, Portugal.

3) Laboratorio de Tecnológico del Uruguay (LATU), Avenida Italia, 6201 Montevideo, Uruguay

Recibido: Marzo 2012; Aceptado: Septiembre 2012

RESUMEN

En este trabajo se prepararon microesferas de quitosano cargadas con ADN comercial como prototipo de sistemas de liberación de ácidos nucleicos. Para preparar las microesferas se utilizó una metodología basada en la preparación de una emulsión agua en aceite (w/o) seguida de entrecruzamiento con glutaraldehído. Las microesferas producidas fueron caracterizadas desde un punto de vista morfológico (HRSEM), evaluadas en cuanto al tamaño (SEM y citometría de flujo) y utilizadas para determinar el perfil de descarga de ADN. Se obtuvieron microesferas con una estructura porosa y con tamaño entre 1 y 20 μm de diámetro (SEM), destacándose una población de partículas individualizadas alrededor de 45% (en número) entre las 6 y 12 μm , según los datos aportados por la citometría de flujo. En cuanto al perfil de liberación en medio a valor de pH fisiológico se observó una liberación rápida, siendo que durante la primera hora 85% del principio activo había sido liberado alcanzándose 100% al final de dos horas.

Palabras claves: quitosano, microesferas, liberación controlada, ADN, ácidos nucleicos

ABSTRACT

In this work chitosan microspheres loaded with ADN have been produced having in view the development of nucleic acids prototype release systems. The microspheres have been formed by using a methodology based on the preparation of a water-in-oil emulsion (w/o) followed by crosslinking with glutaraldehyde. The obtained particles were characterized in terms of morphology (HRSEM), size (SEM and flow cytometry) and used to access the ADN release profile. The obtained results have shown porous-like microspheres with a size ranged from 1–20 μm , where 45% of the particles (in number) can be described as individual elements with sizes comprised between 6–12 μm , as indicated by flow cytometry analysis. The determined release profile using a neutral medium pointed out an 85% release of the active principle after one hour, whereas complete release was achieved just after two hours.

Keywords: chitosan, microspheres, controlled release, ADN, nucleic acids

INTRODUCCIÓN

El quitosano, β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa o D-glucosamina, es un polisacárido con excelentes propiedades biológicas. La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso y es uno de los motivos de su actividad biocida [1]. Este polímero biocompatible y biodegradable encuentra diversas aplicaciones en el área biomédica como vehículo para la liberación controlada de fármacos [2, 3]. Estos sistemas son utilizados para distribuir o transportar fármacos dentro del organismo, orientados a un órgano, tejido, o grupo de células, permitiendo programar un perfil de descarga del componente microencapsulado, mientras llevan “a salvo” el agente terapéutico para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Pueden cargar varios componentes activos, beneficiando la distribución, la retención en el organismo, o incrementando la eficacia del

tratamiento mientras suprimen los mecanismos sistémicos o celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica. La presencia de grupos amino facilita la unión de distintos componentes permitiendo la funcionalización de los microvehículos [4].

La adaptación de esta tecnología a la administración de ácidos nucleicos, tiene la capacidad de superar las barreras extracelulares que limitan la terapia génica. La liberación controlada puede mantener concentraciones elevadas de ADN en el microambiente celular, protegiendo el ADN contra la degradación mediada por nucleasas incrementando así la efectividad del tratamiento, a la vez que permiten disminuir el número de dosis o la cantidad en gramos suministrados. También permiten reducir la generación de efectos colaterales dañinos para el organismo. Forman parte de las alternativas a los clásicos vectores virales los cuales encuentran trabas frente a las normas que rigen su utilización en la industria farmacéutica. Otros vectores no virales como la poli-L-lisina, liberan su contenido de forma concertada, lo que resulta en períodos cortos de expresión génica y la necesidad de repetir la administración de la dosis [5]. Se ha reportado que plásmidos microencapsulados en quitosano, inducen una muy alta actividad proteica durante períodos de 12 semanas post transfección [3].

Las moléculas de ADN o ARN negativamente cargadas, potencialmente complejados con proteínas, polímeros o lípidos catiónicos, interactúan con los biomateriales poliméricos a través de mecanismos no específicos, incluyendo interacciones hidrófobas, electrostáticas y *van der Waals*. Alternativamente, pueden introducirse interacciones específicas a través de grupos funcionales complementarios, tales como antígeno-anticuerpo o biotina-avidina, que permiten controlar la unión del vector al sustrato [4].

En la terapia con ácidos nucleicos, existen numerosos ensayos clínicos para una variedad de desordenes genéticos que asocian distintas patologías. La mayoría de estos ensayos no muestran eficacia terapéutica significativa debido a la baja tasa de transfección obtenida al inyectar ácidos nucleicos “desnudos”, pérdida de estabilidad en la expresión génica, acción del sistema inmune, o la expresión de otro gen desde el vector o las células. Los complejos polielectrolito formados por el ADN cargado negativamente y el quitosano, le brindan protección a los ácidos nucleicos frente a la degradación por nucleasas, lo que se traduce en una mayor eficiencia de transfección [2]. Los sistemas de entrega de genes basados en polímeros, pueden mejorar la entrega de estas macromoléculas y extender la expresión del transgene para sintetizar cantidad suficiente de proteína que actuará en forma local o sistémica [6].

PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparación de las microesferas. En este trabajo fueron preparadas microesferas de quitosano utilizando una técnica basada en el trabajo de *Thanoo et al.* y modificada por *Dhawan et*

al. [7]. La misma se basa en la formación de una emulsión agua en aceite (w/o) con la posterior adición de un agente entrecruzante (glutaraldehído) que coagula las microgotas formadas por la fase dispersa. Para preparar la fase dispersa se disolvió quitosano al 2,0% (p/v) en ácido acético al 5,0% (p/v) en agitación continua durante 24 horas utilizando un agitador magnético. Esta solución se filtró con bomba de vacío utilizando un filtro de MN 640 w *Macherey–Nagel* con una capacidad promedio de retención de entre 7 y 12 μm . Para preparar la fase continua se mezclaron 125,0 mL de aceite de girasol y Span 80 (HLB = 4,3) al 0,5% (p/v) como tensioactivo.

En condiciones de agitación constante (1.100 rpm), se agregaron 3,0 mL de la fase dispersa por goteo lento a una tasa de 5 mL/minuto, a 125,0 mL de la fase continua. Luego se adicionó por goteo, glutaraldehído en solución acuosa (25%, v/v) en 4 aplicaciones (2,5 mL cada una) a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se mantuvo bajo las mismas condiciones de agitación durante 2,5 horas. Una vez finalizado este proceso, se dejó decantar por 24 horas a temperatura ambiente. Para la recolección de las microesferas se empleó un sistema de filtración con bomba de vacío utilizando un filtro de 0,8 μm (*Gelman Sciences*). Se descartó el sobrenadante y se realizaron sucesivos lavados, primero con éter de petróleo, a continuación con agua bidestilada *Milli-Q*, finalizando nuevamente con éter de petróleo. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para los ensayos de caracterización se prepararon microesferas sin principio activo mientras para los ensayos de liberación se produjeron microesferas conteniendo ADN. En este caso se agregaron 100 μg de ADN de timo de vaca (*GE Healthcare*) diluidos en 100 μL de agua *Milli-Q* a 3,0 mL de la solución de quitosano 2% (p/v) promoviendo la homogeneización por medio de agitación vortex. Se procedió con el protocolo descrito anteriormente.

2. Microscopía óptica. Se montaron muestras con medio sintético. Se observaron y capturaron imágenes con una cámara digital marca *Samsung SDC–310* acoplada a microscopio marca *Olympus BX40* y software de control *Image–Proexpress 4.01*.

3. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Se procesaron muestras metalizando a vacío con oro–paladio. Se observaron en un microscopio *Jeol JSM–5900 LV* a una aceleración de voltaje de 20 kV en la unidad de microscopía electrónica de barrido de la *Facultad de Ciencias de la Universidad de la República*.

4. Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HRSEM). Se metalizaron muestras con oro y se observaron en una estación de trabajo *Fei Nova A–200 Nanolab Dual Beam Fib* (FIB: *focused ion beam*) equipada con cañón emisor de campo. Se cortaron esferas con y sin recubrimiento metálico utilizando el cañón emisor de iones (FIB). Este trabajo se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica de ultra alta resolución (MELUAR) del *Instituto Mexicano*

del Petróleo (IMP).

5. Citometría del flujo. Se resuspendieron esferas en agua *Milli-Q* sometiendo estas a vortex y sonicador. Se centrifugó, se obtuvo el sobrenadante y se llevó al citómetro *FACSVantage – BD* del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (*SECIF*) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para la clasificación de tamaño por poblaciones, se utilizaron esferas estándar de 6 y 12 μm .

6. Ensayos de liberación. Se siguió un procedimiento basado en los ensayos de *Dini et al.* [8]. Se pesaron 50 mg de microesferas cargadas con ADN y se preparó un batch resuspendiendo estas microesferas en 15 mL de buffer de fosfato (pH = 7,4) manteniendo después una agitación continua de 80 rpm con un agitador orbital (*Labnet International, Inc. Orbit 1000*). Se retiró, cada 10 minutos un mL del batch, que se centrifugó durante 20 segundos, en una minicentrífuga *Beckman Microfuge E* a 13.000 rpm. El sobrenadante se colocó en una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro *Varian Cary 50 Tablet UV-Visible Spectrophotometer*, a 260 nm. Luego de cada medida se devolvieron las muestras a su batch original. Para realizar el calibrado del espectrofotómetro se preparó una solución patrón de ADN (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), obteniéndose una absortividad de 111,77 $\mu\text{L}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se prepararon microesferas esféricas individualizadas como se pudo comprobar por análisis inmediata por microscopía óptica de los productos obtenidos en los distintos batches producidos. Se pudo demostrar que el efecto de agregación o “*clustering*” de las microesferas, tiene mayor incidencia luego del proceso de secado de las mismas, siendo que mientras resuspendidas en agua, se mostraran como unidades más discretas (Figura 1). En futuros trabajos se estudiará distintos procesos de secado que permitan obtener “unidades” en su mayoría lo cual amplía el espectro de aplicación.

Por análisis SEM fue posible comprobar que las microesferas presentaban un diámetro entre 1 y 20 μm (Figura 2), destacándose una población de partículas individualizadas alrededor de 45% (en número) entre las de 6 y 12 μm , según los datos aportados por la citometría de flujo y realizados con muestras de microesferas re-suspendidas en agua. Por las condiciones en que se realizó la técnica de SEM, fue necesario asegurarse que el producto estuviese totalmente seco, observándose claramente y a mayor aumento, el efecto de agregación de las partículas.

La técnica de HRSEM permitió analizar de forma más clara la morfología de las microesferas pondo en evidencia una estructura porosa siendo que estas se parecen a una esponja donde se

observan perfectamente los espacios que podrán ser ocupados durante la penetración de líquidos así como los caminos de escape para los componentes microencapsulados durante el proceso de descarga (Figura 3).

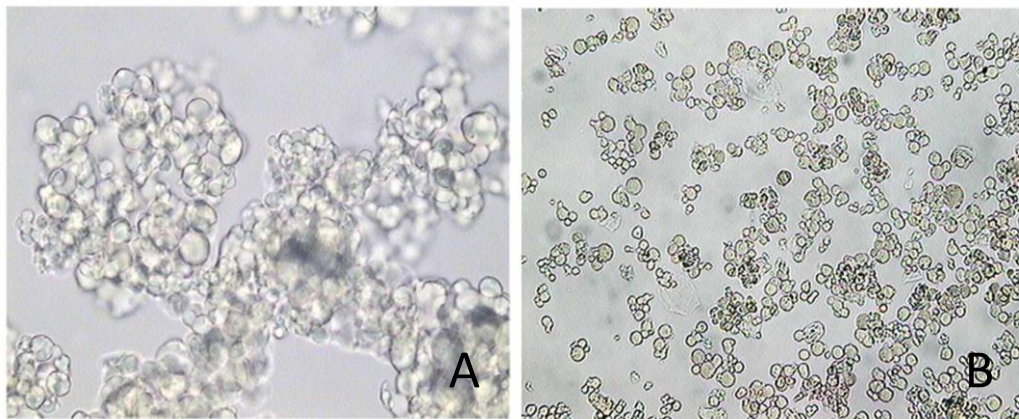


Figura 1. Microscopía óptica de las microesferas producidas: (A) después del proceso de secado (200X), y (B) después de ser re-suspendidas en agua (100X).

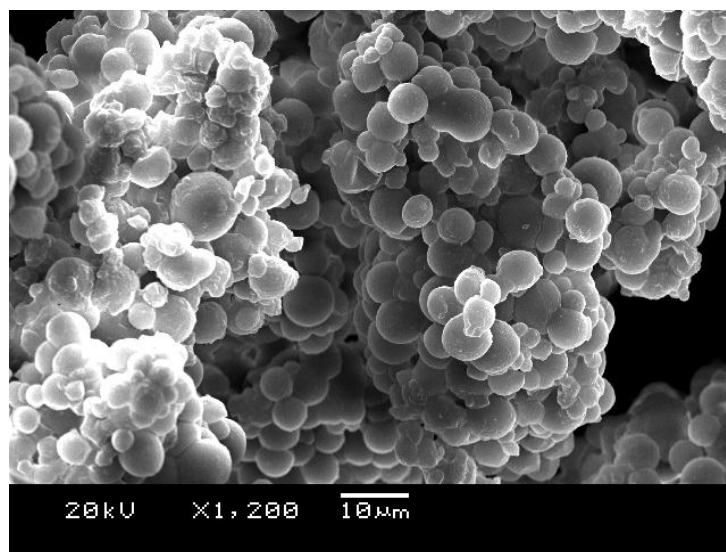


Figura 2. Micrografía SEM mostrando microesferas de quitosano cargadas con ADN.

El perfil de liberación realizado sobre una muestra de 50,0 mg de microesferas cargadas con ADN, se muestra en la Figura 4. Se puede verificar una buena eficiencia de incorporación de lo principio activo prototipo así como una liberación rápida, siendo que durante la primera hora 85% del ADN había sido liberado alcanzándose 100% al final de dos horas. De notar que la concentración máxima teórica, suponiendo que se logró microencapsular la totalidad del ADN utilizado en el ensayo de encapsulación es de 0,0056 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los tiempos estudiados son aptos para un tipo de retención de sustancias y transito adecuado en aplicaciones terapéuticas. En el caso de requerirse mayores tiempos de permanencia se debería incluir un tipo de enlace permanente, en

determinadas condiciones o usar polielectrolitos de enlace. En todos los casos se requerirá para futuros trabajos estudios in vivo, determinar la permanencia, tiempo de llegada al destino final, etc.

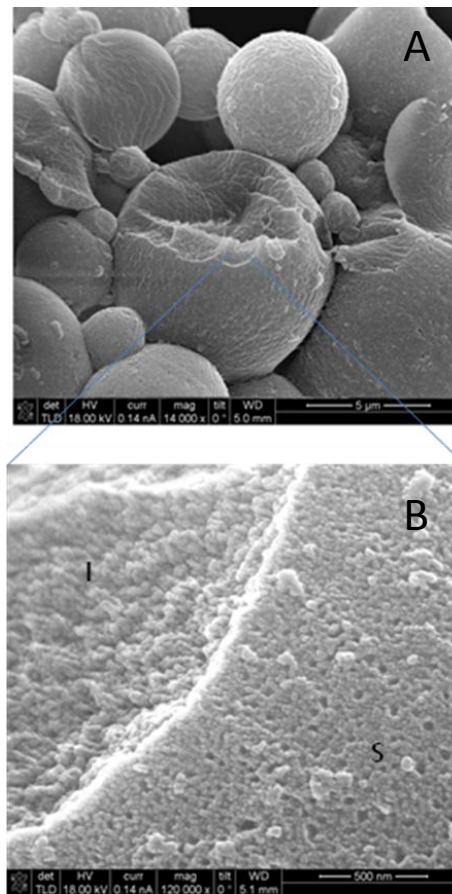


Figura 3. Microscopía de HRSEM de las microsferas: (A) (14.000X) pone en evidencia la estructura interior de una sola esfera, y (B) (120.000X) donde se destaca el detalle de la superficie (S) y el interior de la matriz (I).

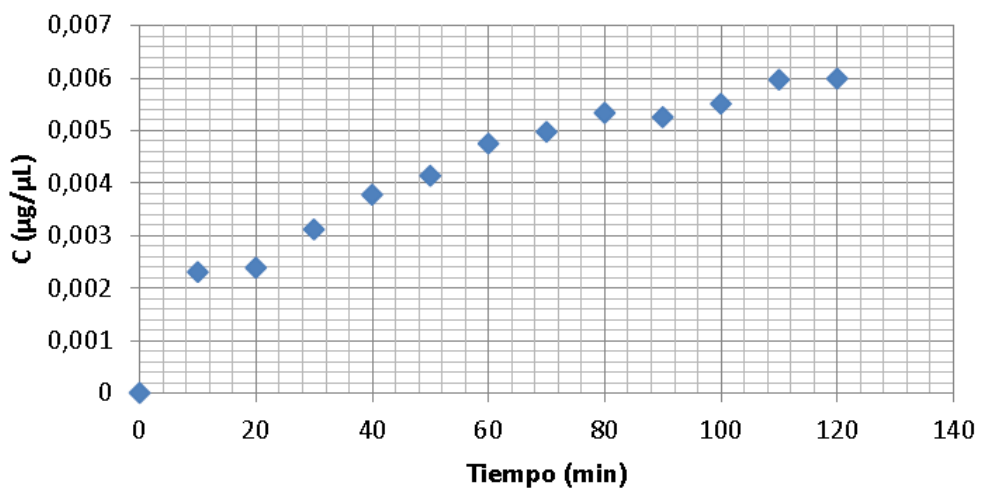


Figura 4. Perfil de liberación del ADN microencapsulado.

CONCLUSIONES

Se mostró que estos sistemas son aptos para la microencapsulación de ácidos nucleicos. Además de la protección física que otorga la microencapsulación contra la degradación del componente cargado, el empleo de un polímero con actividad biocida incrementa la protección de los bioactivos y del sistema completo, protegiendo contra bacterias de los instrumentales y sistemas utilizados. Las características de retención de estas matrices permiten obtener nuevamente en forma libre, todo el agente microencapsulado, posibilitando así la programación de dosis de acción terapéutica. La conjunción de estas propiedades viabiliza su desarrollo y aplicación en la industria farmacéutica.

Si bien este tipo de encapsulación biocompatible permite obtener una liberación gradual del bioactivo en un organismo vivo, fue nuestro objetivo controlarlo en tiempos no muy prolongados, con el fin de estudiar el comportamiento del sistema prototipo. En futuros trabajos, basados en estos resultados, se ensayará la liberación de bioactivos específicos en sus sitios de acción. El uso de metodologías de radiotrazadores ayudará a deliberar además, la dispersión de las cápsulas en órganos y tejidos no específicos por medio de la distribución biológica in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lárez Velásquez C “Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica”. *UDO Agrícola*, **8(1)**, 1 (2008)
- [2] Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM “Recent advances on chitosan-based-micro- and nanoparticles in drug delivery”, *J. Controlled Release*, **100**, 5 (2004)
- [3] Kato Y, Onishi H, Machida Y “Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **4**, 303 (2003)
- [4] Hermanson GT “*Bioconjugate Techniques*”. San Diego (Estados Unidos): Academic Press, 1996, p.p. 785
- [5] Aral C, Akbuga J “Preparation and *in vitro* transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA: poly(L-lysine) complexes”, *J. Pharm Pharmaceut Sci.*, **6(3)**, 321 (2003)
- [6] Lai W-F, Lin MC-M “Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives”, *J. Controlled Release*, **134**, 158 (2009)
- [7] Dhawan S, Singla AK, Sinha VR “Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods”, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **5**, (4) Article 67 (2004)
- [8] Dini E, Alexandridou S, Kiparissides C “Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications”, *J. Microencapsulation*, **20(3)**, 375 (2003)