



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Farmacia - Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN NUEVO
SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRAMIPEXOL
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

CONSTANZA PAZ FUENTES CARRASCO

CONCEPCIÓN - CHILE

2017

Profesor Guía: Marcos Fernández Escobar
Departamento de Farmacia – Facultad de Farmacia

Universidad de Concepción

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN NUEVO
SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRAMIPEXOL PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Trabajo presentado para optar al Grado de **Magister en Ciencias Farmacéuticas**
por

CONSTANZA FUENTES CARRASCO

Comisión de Evaluación de Tesis:



Dr. Marcos Fernández Escobar
Profesor Guía
Departamento de Farmacia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dr. Carlos von Plessing Rossel
Departamento de Farmacia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dr. José Guzmán González
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue diseñar un sistema de liberación controlada, microesferas biodegradables de pramipexol, para su administración parenteral.

La formulación fue elaborada mediante el método emulsión/evaporación de solvente a partir de una emulsión O/W, cuyo desarrollo fue optimizado a través de un diseño de experimentos. Esto permitió evaluar el efecto combinado de dos variables de formulación (cantidad de fármaco y velocidad de homogenización de la emulsión) en tres respuestas relevantes para formulaciones de microesferas de liberación prolongada (eficacia de encapsulación, efecto burst y tamaño). La formulación optimizada fue caracterizada fisicoquímicamente y se evaluó la liberación del principio activo *in vitro*. Debido a que la esterilidad es un requisito para formulaciones parenterales, las microesferas fueron esterilizadas por radiación gamma y fueron caracterizadas para determinar si el proceso de irradiación produjo algún cambio respecto a la formulación no esterilizada. Por último, se evaluó la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson, mediante ensayos de comportamiento (test de aquinesia, catalepsia y natación).

Según lo obtenido por el diseño de experimentos, se elaboraron partículas esféricas de superficie regular cuya eficacia de encapsulación fue de $63,1 \pm 7,7 \%$, un efecto burst a la primera hora de un $32,8 \%$ y un tamaño medio de $41,1 \pm 16,2 \mu\text{m}$. Tras el proceso de irradiación gamma, la eficacia de encapsulación del fármaco fue de un $55,5 \pm 3,3\%$, un efecto burst a la primera hora de un $39,5 \%$ y un tamaño medio de $42,2 \pm 17,1 \mu\text{m}$.

Mediante difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y espectrometría infrarroja se identificaron pequeños cambios en las características del polímero debido al proceso de microencapsulación, sin embargo, no se atribuyeron cambios significativos a la irradiación, tanto en los componentes puros como en la formulación final. El estudio de liberación *in vitro* mostró diferencias en

ambas formulaciones, ya que las microesferas irradiadas liberaron casi la totalidad del fármaco a los días 14 de estudio, mientras que la formulación no irradiada liberó el principio activo de manera mucho más lenta, liberando un 95,0 % a los 30 días. Estas diferencias entre la formulación antes y después del proceso de irradiación gamma, implican que este procedimiento de esterilización no se puede utilizar para la esterilización final de la formulación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de catalepsia, aquinesia y natación demuestran la eficacia del diclorhidrato de pramipexol en la reversión de la sintomatología, que fue especialmente notoria con la dosis más alta ensayada de la formulación seleccionada (cantidad equivalente a 1 mg/kg/día de diclorhidrato de pramipexol administrada vía subcutánea cada 15 días durante 45 días).



ABREVIATURAS

AD: agonista dopaminérgico

CL: cuerpos de Lewy

COMT: catecol-O-metil transferasa

DPMX: diclorhidrato de pramipexol

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EDC: estimulación dopaminérgica continua

EE: eficacia de encapsulación

EP: enfermedad de Parkinson

FT-IR: espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

GPe: porción externa del globo pálido

GPI: porción interna del globo pálido

LP: liberación prolongada

MAO-B: monoaminoxidasa-B

MPTP: metil-fenil-tetrahidropiridina

NaCl: cloruro de sodio

Ni: níquel

NST: núcleo subtalámico

O/W: aceite/agua

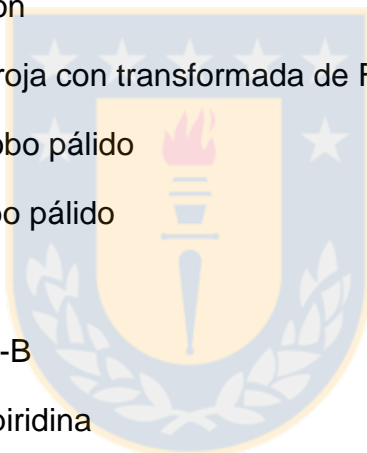
pcSN: parte compacta de la sustancia nigra

PLA: ácido poliláctico

PLA-PCL: copolímero del ácido láctico y caprolactona

PLGA: copolímero del ácido glicólico y ácido láctico

PMX: pramipexol



prSN: parte reticulada de la sustancia nigra

PVA: poli (vinilalcohol)

SEM: microscopía electrónica de barrido

SN: sustancia nigra

UCH-L1: ubiquitin C-terminal hidrolasa L1

UV: ultravioleta

XRD: difracción de rayos X

α S: α -sinucleína



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Epidemiología de la EP	3
Fisiopatología de la EP.....	4
Manifestación clínica de la EP.....	9
Tratamiento farmacológico.....	10
Pramipexol	12
Estimulación dopaminérgica continua	15
Sistemas de liberación controlada para la administración de fármacos....	15
Microencapsulación	16
Diseño de experimento en el desarrollo de micropartículas	22
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
MATERIALES Y REACTIVOS.....	27
Principios activos y reactivos	27
Materiales y equipos	27
METODOLOGÍA	29
1.- Elaboración y optimización del método de microencapsulación de diclorhidrato de pramipexol.....	29
1.1.- Elaboración de las microesferas	29
1.2.- Diseño experimental	30
2.- Caracterización de las microesferas de PLGA	32
2.1.- Determinación del rendimiento del proceso	32
2.2.- Determinación de la eficacia de encapsulación y carga.....	32
2.3.- Método para la cuantificación de DPMX desde microesferas de PLGA.	33
2.4.- Caracterización morfológica y distribución de tamaño de partícula	34
2.5.- Determinación de la interacción entre principio activo y polímero	35
2.6.- Evaluación de la cinética de liberación <i>in vitro</i> del principio activo desde las microesferas de PLGA.....	36

3.- Esterilización de la formulación optimizada	37
4.- Evaluación de la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson	37
4.1.- Tratamientos administrados.....	38
4.2.- Diseño experimental de estudios <i>in vivo</i>	38
5.- Análisis estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
1.- Elaboración y optimización del método de microencapsulación de diclorhidrato de pramipexol.....	43
2.- Caracterización de la formulación optimizada.....	49
3.- Esterilización de la formulación optimizada	49
3.1. Efecto de la irradiación gamma en la EE	50
3.2. Efecto de la irradiación en la morfología y tamaño de las microesferas..	51
3.3.- Determinación de la interacción entre principio activo y polímero	53
3.4.- Evaluación de la cinética de liberación <i>in vitro</i>	62
4.- Evaluación de la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson	65
4.1.- Evaluación de peso corporal.....	65
4.2.-Test de akinesia.....	66
4.3.- Test de Catalepsia	68
4.4.- Test de natación.....	72
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Polímeros biodegradables utilizados en la elaboración de micropartículas	18
Tabla 2 : Variables del diseño central compuesto para la elaboración de microesferas de DPMX	31
Tabla 3: Distribución de grupos de animales y tratamientos administrados	39
Tabla 4: Valores medios y desviaciones estándar de las respuestas evaluadas en el diseño experimental	44
Tabla 5: Rendimiento, parámetros de encapsulación y tamaño de formulación optimizada	49
Tabla 6: Comparación de parámetros de encapsulación de microesferas estériles y no estériles	51
Tabla 7: Comparación de tamaños e Índice Span entre microesferas pre y post irradiación gamma	53
Tabla 8: Comparación de los perfiles de liberación de las formulaciones	63



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema comparativo de relaciones de los ganglios basales en condiciones normales y Enfermedad de Parkinson.....	6
Figura 2: Despigmentación de la SN a nivel del mesencéfalo y Cuerpos de Lewy .	7
Figura 3: Estructura química del pramipexol	13
Figura 4: Esquema representativo de las diferencias morfológicas y estructurales de las micropartículas	17
Figura 5: Estructura química representativa del PLGA	19
Figura 6: Elaboración de microesferas por emulsión/evaporación de solvente.....	21
Figura 7: Esquema de elaboración de microesferas de PLGA cargadas DPMX...	30
Figura 8: Imágenes SEM de formulaciones F6 y F3	44
Figura 9: Diagrama de Pareto para la eficacia de encapsulación	45
Figura 10: Diagrama de Pareto para efecto burst	46
Figura 11: Diagrama de Pareto para el tamaño de partícula.....	46
Figura 12: Gráfico de Superficie de Respuesta del diseño experimental	47
Figura 13: Imágenes SEM de microesferas no estériles y microesferas estériles	52
Figura 14: Difractograma de PLGA irradiado y PLGA no irradiado	54
Figura 15: Difractogramas de PLGA irradiado y PLGA no irradiado	54
Figura 16: Difractogramas de microesferas blancas irradiadas y microesferas blancas no irradiadas	55
Figura 17: Difractogramas de microesferas cargadas irradiadas y microesferas cargadas no irradiadas	55
Figura 18: Termogramas	57
Figura 19: FT-IR de PLGA irradiado y PLGA no irradiado	59
Figura 20: FT-IR: de DPMX irradiado y DPMX no irradiado	60
Figura 21: Comparación de espectros FTIR de PLGA puro irradiado y microesferas blancas irradiadas	61
Figura 22: FT-IR de microesferas cargadas con DPMX irradiadas y microesferas cargadas con DPMX no irradiadas.....	62

Figura 23: Perfil de liberación de DPMX desde las microesferas.....	63
Figura 24: Evolución del peso corporal de los diferentes grupos de ratas Wistar .	65
Figura 25: Evolución de tiempos de latencia de ratas en test de akinesia	67
Figura 26: Comparación tiempo de latencia de ratas en test de akinesia día 45 ..	68
Figura 27: Evolución de tiempo de latencia en test de catalepsia en grilla	69
Figura 28: Evolución de tiempo de latencia en ratas en test de catalepsia en barra	70
Figura 29: Comparación de tiempo de latencia en test de catalepsia grilla al día 45 de estudio.....	71
Figura 30: Comparación de tiempo de latencia en test de catalepsia barra al día 45 de estudio	71
Figura 31: Evolución de puntuaciones en test de natación	72
Figura 32: Comparación de puntuaciones en test de natación en día 45 de estudio. frente a G1	73



INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso humano es una compleja red de órganos y tejidos que controla la mayoría de las funciones del organismo. Compuesto por más de cien mil millones de neuronas que se comunican mediante más de mil billones de sinapsis, capta y procesa estímulos que permiten la interacción del cuerpo con el medio que lo rodea, mediante la generación de una respuesta frente a aquellos estímulos.

Sin embargo, las funciones del sistema nervioso pueden verse comprometidas por diferentes afecciones causadas por infecciones, traumatismos, intoxicaciones u otras como las enfermedades neurodegenerativas. Estas últimas constituyen un grupo de patologías que se caracterizan por afectar al sistema nervioso debido a daños o a muerte neuronal en diferentes áreas, causando desórdenes a nivel cognitivo, alteraciones de conducta y funciones corporales como el equilibrio, el movimiento, la respiración, la función cardíaca y el habla.

Dentro de las más conocidas, se encuentran la Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica; la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP). Estas, además de ser enfermedades que se relacionan con el proceso de envejecimiento del organismo, también tienen en común que la mayoría sólo dispone de tratamientos paliativos que retrasan la progresión de la enfermedad o disminuyen los síntomas clínicos los cuales, hasta ahora, no han sido capaces de brindar una cura. Debido a esto, tanto la EP como las otras, han sido objeto de numerosas investigaciones en búsqueda de un tratamiento curativo o preventivo, contando con importantes hallazgos y avances en relación al entendimiento de los mecanismos bioquímicos involucrados en la fisiopatología de estas.

A pesar de ello, sigue siendo la terapia farmacológica la primera opción de tratamiento, ya que ha demostrado su eficacia al controlar los síntomas de la enfermedad y mejorar en cierto grado la funcionalidad de los pacientes que la

padecen. Sin embargo, los fármacos disponibles para el tratamiento de la EP, en general, poseen problemas en cuanto a la tolerabilidad por parte del paciente (es decir, causan efectos adversos desagradables) y en algunos casos también se presentan problemas farmacocinéticos (baja biodisponibilidad, problemas de absorción, dificultad para llegar al sitio de acción, rápida biotransformación, etc).

En este contexto, la industria farmacéutica ha buscado optimizar estos tratamientos para hacerlos más eficientes y uno de los medios por los que logran este objetivo es a través del desarrollo y elaboración de formas farmacéuticas innovadoras que permitan el acceso de estos pacientes a un tratamiento que mejore su calidad y expectativa de vida.



MARCO TEÓRICO

Epidemiología de la EP

La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, siendo la segunda patología neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer [1]. Su desarrollo se inicia generalmente entre los 50 y 60 años de edad, sin embargo, puede manifestarse en personas de menor edad en las cuales existe predisposición genética. La EP afecta a todos los grupos étnicos, tanto a hombres como a mujeres, con una ligera inclinación hacia el género masculino.

Estimaciones realizadas en diversos estudios indican que su incidencia varía de 10 a 18 casos por cada 100.000 personas por año y que su prevalencia oscila entre un 0,3 y 3% de la población general [2, 3]. Esta cifra es cercana al 1% en la población sobre los 60 años de edad [4], observándose un aumento de manera exponencial a partir de los 65 años de edad [5, 6]. Actualmente, se estima que sólo en EEUU hay 1 millón de personas afectadas por EP [7] y que la cifra mundial es de 6,3 millones de personas [8], pudiendo llegar al doble en 2030 [9].

A pesar de que no existe una estadística exacta sobre la prevalencia en Chile, se tiene el registro de alrededor de 15 mil chilenos con EP que se atienden a través del programa de salud GES. Sin embargo, se estima que la cantidad de personas afectadas podría ascender a 35 mil e incluso más, ya que según cifras internacionales, entre 1 y el 3% de la población mayor de 60 años tiene la enfermedad, lo cual cada vez cobra más importancia debido al cambio demográfico que está experimentando nuestro país.

A esto, se debe sumar la gran repercusión social, sanitaria y económica de la EP, ya que los pacientes afectados sufren un gran impacto en su calidad de vida. La incapacidad laboral, la pérdida de habilidades sociales, la carga física y psicológica de los cuidadores de los enfermos y el gasto económico que generan

la atención social y sanitaria de todos ellos. Según algunos estudios, los costos asociados a la EP en 2010 en EEUU superaron los USD\$14,4 mil millones o USD\$22.800 por paciente por año [10], mientras que en Europa, se han estimado unos € 13,9 mil millones en el mismo año [11], lo que convierte a la EP en una patología costosa para los sistemas de salud de cada país.

Fisiopatología de la EP

La base fisiopatológica de la EP radica en la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas pigmentadas de la parte compacta de la sustancia nigra (pcSN) que forma parte de los ganglios basales, más la presencia de agregaciones proteicas anormales intracelulares denominadas cuerpos de Lewy (CL) en las neuronas restantes [12].

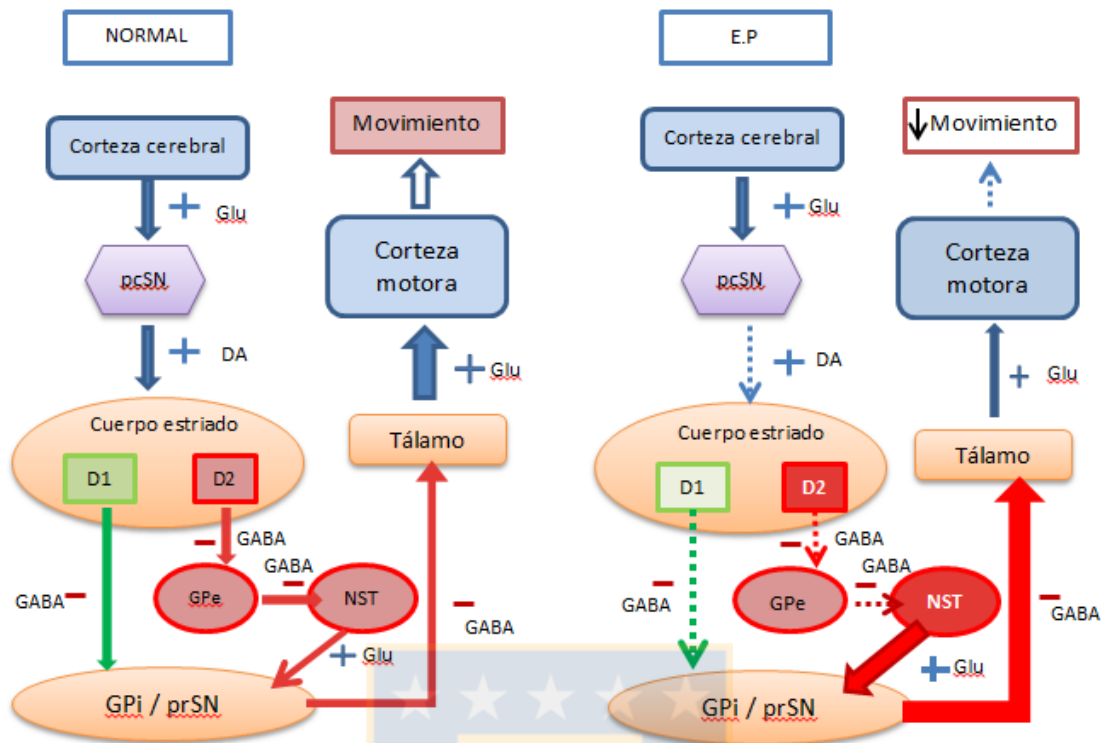
A pesar de que la pérdida de neuronas dopaminérgicas es normal en el proceso de envejecimiento (la población sana presenta una pérdida de alrededor del 4,4 %), para que se produzca la enfermedad sintomática se requiere de la pérdida del 70 – 90 % de estas [13, 14].

Normalmente, la modulación del movimiento ocurre a nivel de los ganglios basales, los cuales regulan el flujo de información desde la corteza cerebral hacia las neuronas motoras de la médula espinal. En este proceso, la pcSN proyecta neuronas dopaminérgicas al cuerpo estriado de los ganglios basales, en el cual se expresan predominantemente receptores de dopamina D₁ y D₂. Luego, desde esta estructura, los estímulos de salida pueden seguir dos vías: la vía directa, que va desde el cuerpo estriado a la parte reticulada de la sustancia nigra (prSN) y a la porción interna del globo pálido (GPi) ejerciendo una función excitatoria a nivel cortical; y la vía indirecta, que va desde el cuerpo estriado, pasando por la porción externa del globo pálido (GPe) y por el núcleo subtalámico (NST) hasta el tálamo, ejerciendo finalmente una función inhibitoria a nivel de la corteza [15].

A causa de la depleción dopaminérgica que se observa en la EP, se produce una hipersensibilidad en los receptores de dopamina D_2 , por lo que la actividad de la vía indirecta aumenta y, por otro lado, se produce una hiporespuesta de los receptores D_1 del cuerpo estriado, resultando en una vía directa menos activa. Esto finalmente lleva a que se produzca un efecto neto inhibitorio en la corteza motora, manifestándose clínicamente en los típicos síntomas de la enfermedad (Figura 1).

Debido a la pérdida neuronal, histopatológicamente se puede observar despigmentación y gliosis en la sustancia nigra, sobre todo en la parte compacta y locus ceruleus, mientras que en las neuronas restantes se pueden observar los CL (Figura 2), que corresponden a agregaciones fibrilares esféricas y eosinofílicas constituidas principalmente por la proteína α -sinucleína (α S) [16]. Aunque esta proteína está presente y cumple funciones como el almacenamiento y liberación de neurotransmisores en un cerebro normal, se cree que un mal plegamiento de la α S produce su acumulación excesiva, llevando a una función anormal y gatillando la muerte neuronal.

La presencia de los CL es considerada un marcador de la patología, siendo muy importante al momento de diagnosticarla. También se considera que la difusión de los CL tiene un progreso similar al curso clínico de la EP, aunque estudios recientes sugieren que no son la causa principal de la muerte de las neuronas, señalando que la pérdida de células en la SN es gradual y muy variable, explicando en parte la heterogenicidad clínica de la patología [17].



DA: Dopamina; Glu: Glutamato; GABA : Ácido γ -aminobutírico

Figura 1: Esquema comparativo de relaciones de los ganglios basales en condiciones normales y Enfermedad de Parkinson. (Adaptado de Brunton, L., Lazo, J., Parker, K. Goodman&Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Undécima edición, McGraw-Hill, 2007)

El mecanismo por el cual se produce la neurodegeneración en la EP no está del todo dilucidado, no obstante, se sabe que diversos factores endógenos y exógenos interactuarían produciendo finalmente apoptosis y necrosis de las neuronas de la sustancia nigra.

Existe evidencia indirecta que sugiere que la citotoxicidad por elevados niveles de glutamato favorece la muerte celular, ya que la unión de este neurotransmisor con su receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) abre canales de calcio en las neuronas dopaminérgicas. Esto produciría una entrada masiva de calcio al interior de estas células, lo cual sería altamente tóxico llegando a producir muerte neuronal [18-20].

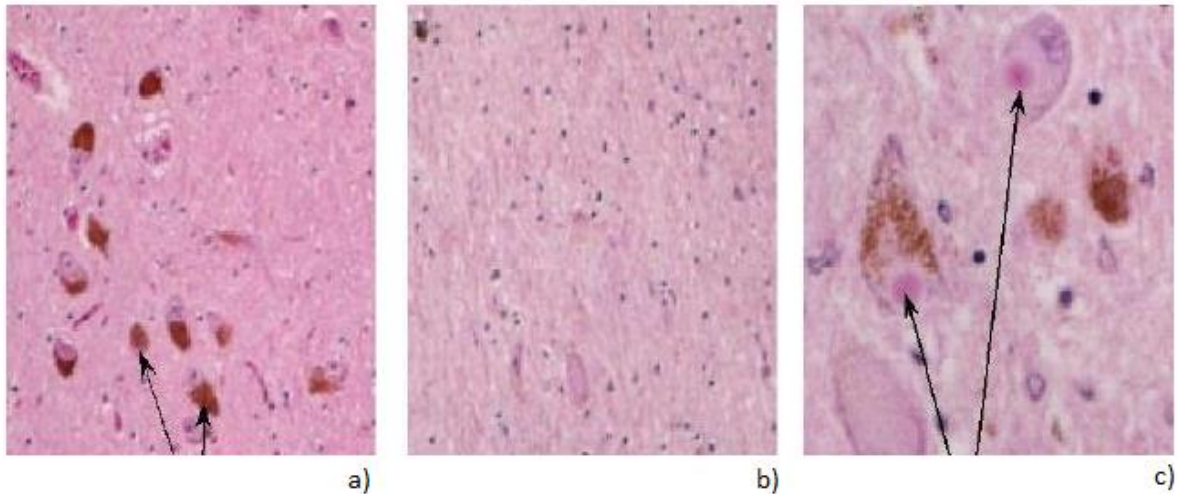


Figura 2: Despigmentación de la SN a nivel del mesencéfalo: a) Pigmentación normal; b) despigmentación en EP; c) presencia de Cuerpos de Lewy. Fuente: <https://www.saludymedicina.info/wp-content/uploads/2010/10/parkinson.jpg>

Asimismo, el estrés oxidativo puede influir en el desarrollo de la EP, debido a que las especies reactivas del nitrógeno (RNS) como el NO, producen la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y esta inhibición causa la agregación de la α S, contribuyendo a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. También se ha visto el daño neuronal que pueden causar la especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), al anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son en su mayoría productos del metabolismo oxidativo mitocondrial. Estas ROS pueden causar la destrucción de enzimas proteolíticas, ruptura de polisacáridos y causar peroxidación lipídica de la membrana, lo cual altera la permeabilidad de la mitocondria, afectando sus funciones [18, 21-23].

Por otro lado, también se ha visto que existen factores ambientales como la exposición a ciertos herbicidas como el paraquat y la rotenona [24], el compuesto metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP), los cuales pueden inhibir el complejo I y ciertos metales pesados como el manganeso, hierro, zinc, aluminio y cobre, los cuales al acumularse en la sustancia nigra, incrementarían el estrés oxidativo,

además de evidencia que ha mostrado que la presencia de metales pesados facilitarían la agregación de la α S [25].

Otro mecanismo relacionado con la toxicidad y muerte neuronal es el metabolismo de la propia dopamina, lo cual se ha visto fuertemente relacionada a estrés oxidativo, ya que la degradación de este neurotransmisor puede generar ROS y la oxidación puede producir intermediarios altamente tóxicos y potencialmente neurotóxicos [26].

También se ha postulado la relación de procesos inflamatorios con la predisposición a padecer la enfermedad, no estando claro si estos son causa o efecto de la patología.

El componente genético también es un factor importante. Se ha determinado que los genes vinculados con la enfermedad son los involucrados en el metabolismo de la dopamina, en el metabolismo mitocondrial y en la detoxificación, entre los cuales destacan el de la α S, DJ-1, PINK1 que causan formas raras y de inicio temprano de la EP, ya que sus mutaciones aumentarían la susceptibilidad al estrés celular, UCH-L1 (Ubiquitin C-terminal hidrolasa L1), Parkina, entre otros [27].

Todo esto, junto a la edad avanzada y otros factores como la dieta pobre en antioxidantes y algunas enfermedades metabólicas [3] tienen influencia directa en la génesis de la EP, principalmente en su variante esporádica la cual es la más común.

Por otra parte, se han descrito factores que pueden prevenir el desarrollo de esta patología, como el consumo de cafeína, que actúa inhibiendo el receptor α 2 de la adenosina favoreciendo la función motora, y el tabaco, observándose que su consumo disminuye casi en un 50 % el riesgo de desarrollar la EP [28-30]. Sin embargo, debido al riesgo-beneficio que produce el consumo de estas sustancias

en el organismo, no se recomienda el uso de ellas para prevenir la aparición de esta patología.

Manifestación clínica de la EP

La EP se caracteriza por tres síntomas principales: bradicinesia, temblor y rigidez, los cuales varían en cada paciente [31].

El temblor, presente en el 85% de los pacientes, es de reposo, disminuyendo cuando la persona mantiene una postura o realiza un movimiento. Generalmente, este se inicia en una mano con compromiso unilateral, extendiéndose luego al lado contralateral a medida que pasan los años. También puede afectar las piernas, lengua, labios y mandíbula [30, 32].

La bradicinesia, definida como una lentitud al inicio, durante o al finalizar un movimiento voluntario, es la principal causa de discapacidad en los pacientes debido a que interfiere en todos los aspectos del diario vivir. Afecta prácticamente a todos los pacientes con EP, evolucionando hasta un congelamiento de la marcha.

La rigidez, presente en el 90 % de los pacientes, se considera como una resistencia al movimiento pasivo de una articulación a lo largo del rango completo de movimiento, generalmente se inicia unilateralmente coincidiendo con el lado del temblor pudiendo progresar al lado contralateral.

La inestabilidad postural, por lo general, es un síntoma más tardío, contribuyendo a caídas arriesgando al paciente a sufrir fractura de cadera y heridas que conducen a un aumento en la morbilidad y mortalidad [33, 34]. Otras manifestaciones motoras que se observan son hipofonía, disfagia, facie hipomímica, alteración del parpadeo, distonías y sialorrea [35].

A pesar de que la EP es una enfermedad que afecta primordialmente al sistema motor, también puede tener manifestaciones no motoras, las que incluyen demencia, depresión, ansiedad, alteraciones cognitivas, trastornos del sueño, del ánimo, disfunciones autonómicas (como ortostatismo, incontinencia urinaria, constipación) y olfatorias (hiposmia o anosmia) [36].

En la mayoría de los casos, en 10 a 15 años, la EP evoluciona hasta un estado acinético rígido, donde el paciente pasa a requerir asistencia para la mayor parte de sus actividades cotidianas. De esta manera, al final de la enfermedad el individuo es totalmente dependiente, situación que es posible retrasar con un tratamiento adecuado.

Es por ello que la terapia en la EP es tan importante, ya que a pesar de que no existe una cura, un tratamiento farmacológico eficaz puede cambiar el pronóstico de la enfermedad. En la mayor parte de los casos se puede conservar una buena movilidad funcional durante muchos años y la esperanza de vida de los pacientes tratados adecuadamente aumenta de manera significativa [37].

Tratamiento farmacológico

Los objetivos del tratamiento farmacológico son mantener la funcionalidad del paciente y su calidad de vida, controlando los síntomas y reduciendo los efectos secundarios de los fármacos que se utilizan para ello.

Entre los medicamentos disponibles para el tratamiento de la EP se encuentra la levodopa, precursor de la dopamina, que es uno de los más eficaces. Se ha visto que beneficia prácticamente a todos los pacientes con EP confirmada, no obstante, una de sus desventajas es la necesidad de ser administrada junto con otros fármacos (como la carbidopa o bencerasida) que inhiben la acción periférica de la decarboxilasa e impiden la degradación de la levodopa antes de llegar al

sistema nervioso central [13, 38]. Los principales efectos adversos de este fármaco son: náuseas, vómitos e hipotensión ortostática.

Además, se ha observado que en los tratamientos a largo plazo su efectividad va disminuyendo con el tiempo, apareciendo alteraciones motrices en parte importante de los pacientes. Una de ellas es el fenómeno de *wearing-off* que corresponde a una aparición o empeoramiento de los síntomas motores antes de que haga efecto la dosis siguiente de levodopa. A esto se pueden sumar discinesias, distonía y síntomas psiquiátricos [39]. Estas complicaciones se presentan en el 50% de los pacientes tratados con levodopa durante más de 5 años, en el 80% de los pacientes tratados durante más de 10 años, y en casi todos los pacientes con enfermedad de aparición temprana [40].

Con el fin de aminorar estos inconvenientes, desde hace tiempo se están desarrollando fármacos complementarios a la levodopa, con mayor duración de sus efectos positivos. Dentro del abanico terapéutico se dispone de fármacos inhibidores de la enzima monoaminoxidasa-B (MAO-B), inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), anticolinérgicos, la amantadina y los agonistas dopaminérgicos (AD).

Los agonistas dopaminérgicos actúan directamente sobre los receptores nigroestriatales de dopamina. Entre ellos se encuentran derivados del ergot como la bromocriptina, pergolida y derivados no ergóticos como el ropirinol, rotigotina y el pramipexol. Estos, a pesar de tener una menor eficacia sintomática que la levodopa, presentan ventajas potenciales. En primer lugar, tienen una duración de acción mucho más prolongada, lo que permite una estimulación estriatal más continua y fisiológica, la cual posiblemente permite retrasar la aparición de complicaciones motoras [41]. Además, su actividad no requiere conversión enzimática y actúan directamente sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos, de modo que resultan efectivos en fases avanzadas de la enfermedad, a pesar de la degeneración progresiva de la vía dopaminérgica

presináptica [42]. Por último, no tendrían el inconveniente de una posible liberación de radicales libres resultante del metabolismo de la dopamina. Debido a que se ha asociado riesgo de enfermedad valvular cardíaca con los AD ergóticos, se aconseja el uso de los no ergóticos ya que tienen perfiles de eficacia similares [43].

Pramipexol

El pramipexol, agonista dopaminérgico que actúa selectivamente sobre la familia de receptores D₂ (D₂, D₃ y D₄), con afinidad preferente por el receptor D₃ [42] y , a diferencia de los otros AD, presenta una pobre o nula interacción con receptores adrenérgicos o serotoninérgicos. Administrado como monoterapia, es eficaz en el tratamiento de los síntomas motores desde fases iniciales de la enfermedad, retrasando notablemente la introducción de la levodopa al tratamiento [32]. Por otro lado, en pacientes con EP avanzada, que presentan fluctuaciones motoras y que están en tratamiento con levodopa, el pramipexol ha demostrado ser eficaz en la mejoría sintomática y la reducción del tiempo *wearing-off* [42, 44], permitiendo junto con ello una disminución de la dosis de levodopa [45]. Además, debido a su selectividad presenta una menor proporción de efectos secundarios autonómicos, cardiovasculares y digestivos, ya que en comparación con ropirinol y rotigotina, se ha visto que el pramipexol tiene una menor incidencia en efectos adversos como náuseas, mareos, somnolencia y discinesias [46].

Debido a que las terapias sintomáticas del Parkinson conllevan a largo plazo efectos secundarios que empeoran la calidad de vida del paciente, el propósito más actual de investigación se orienta hacia el bloqueo del desarrollo de la enfermedad, utilizando agentes neuroprotectores. En este aspecto, el pramipexol ha demostrado efectos neuroprotectores que se relacionan con sus propiedades antioxidantes [47], ya que actúa como *scavenger* de radicales libres; además de inhibir la apoptosis [48], se ha sugerido su capacidad protectora de las neuronas dopaminérgicas frente a la citotoxicidad causada por el metabolismo de la

dopamina endógena [49], reduciendo la fosforilación de la α S (principal forma de esta proteína en los CL) al inhibir ciertas vías enzimáticas [50]. Estas propiedades aún son objeto de estudio, sin embargo, alientan la posibilidad de su uso temprano en el tratamiento de la EP [51].

Químicamente, el pramipexol (Figura 3) es un derivado amino-benzotiazólico sintético.

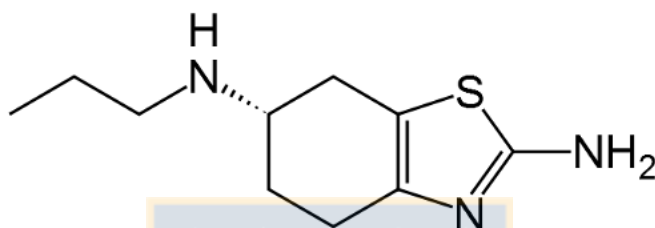


Figura 3: Estructura química del pramipexol.

Fuente: medicalcheatsheets.blogspot.com

Es un polvo cristalino, blanco, muy soluble en agua independiente del pH. También es soluble en solventes como metanol, ligeramente soluble en etanol e insoluble en diclorometano. Su peso molecular es de 211,3 g/mol, mientras que su sal, diclorhidrato de pramipexol monohidratado tiene un peso molecular de 302,3 g/mol, manteniendo características fisicoquímicas similares a la de su base [52].

El pramipexol se absorbe de forma completa tras su administración oral, alcanzando la concentración plasmática máxima ($T_{m\acute{a}x}$) en 1 - 3 horas, con una semivida biológica de 8 -12 h. Los alimentos no afectan la absorción del fármaco, sin embargo el tiempo para alcanzar $T_{m\acute{a}x}$ aumenta en aproximadamente 1 a 2 horas cuando el medicamento se toma junto con las comidas. Se distribuye ampliamente, con un volumen de distribución aproximado de 500 L (con un coeficiente de variación [CV] = 20 %). Su unión a proteínas plasmáticas bordea el 15 % y su metabolización en el organismo es menor al 10 %, sin identificarse

metabolitos activos en plasma u orina. La principal vía de excreción es la renal (>90 %) en la cual se encuentra el fármaco en su mayoría inalterado. Es importante recalcar que el pramipexol casi no es metabolizado por el sistema citocromo P450, lo cual minimiza la posibilidad de interacciones fármaco-fármaco en poblaciones de adultos mayores con polifarmacia.

La dosis de inicio recomendada es de 0,264 mg al día, (equivalentes a 0,375 mg de las sal diclorhidrato monohidratada), con aumentos progresivos hasta una dosis máxima de 3,3 mg al día, repartida en tres tomas. Esto puede ser una dificultad para este tipo de pacientes, especialmente con el tratamiento crónico [53].

En el mercado chileno, se cuenta con dos tipos de formulaciones de pramipexol: comprimidos de liberación inmediata (los cuales deben administrarse dos o tres veces al día) en dosis de 0,25 y 1,0 mg, y de liberación prolongada (LP). Esta última se encuentra en nuestro país bajo el nombre comercial de Sifrol ER[®] de Laboratorios Boehringer Ingelheim, en presentaciones que contienen 0,375; 0,75 y 1,5 mg y bajo el nombre de Biopsol ER[®] de Laboratorios Drugtech Recalcine.

A pesar de las ventajas que ofrece la formulación LP, entre las cuales destaca el régimen de dosificación una vez al día y niveles plasmáticos más estables por más de 24 horas [54], deben considerarse los efectos adversos a nivel gastrointestinal, que consisten principalmente en náuseas, estreñimiento y vómitos [43]. Esto, sumado a la disfunción motora del enfermo, puede llevar a problemas de adherencia al tratamiento.

Tomando en cuenta estos inconvenientes, más el hecho de que la estimulación dopaminérgica continua es la estrategia terapéutica más eficaz para prevenir o retrasar la aparición de disquinesia en la EP [55], se considera que una buena alternativa de tratamiento son los sistemas de liberación controlada de fármacos administrados vía parenteral, ya que tienen la ventaja de evitar los inconvenientes que presentan las formulaciones orales combinadas con los beneficios que provee

para el tratamiento de la enfermedad una liberación uniforme y más prolongada del principio activo en el tiempo [56].

Estimulación dopaminérgica continua

Además de los efectos adversos observados con los diferentes medicamentos disponibles para el tratamiento de la EP, ya sean agudos o debido a su uso crónico, existen evidencias de que una terapia farmacológica puede tener una mejor respuesta de acuerdo a cómo estos son administrados.

La estimulación dopaminérgica continua (EDC) es la estrategia terapéutica que se basa en estimular continuamente los receptores estriatales de dopamina, tal como ocurre en un cerebro normal [57]. Este tipo de estimulación es difícil de lograr con la dosificación periódica y la corta vida media de los fármacos antiparkinsonianos, lo cual conduce a una estimulación más intermitente y, por lo tanto, a las ya mencionadas complicaciones motoras [58]. Por ello, últimamente se ha intentado con otras vías de administración de levodopa diferentes a la oral y con el uso de fármacos dopaminérgicos con una vida media más larga, incluyéndolos en formulaciones que retardan y prolongan su liberación [59].

Diversos estudios han demostrado los beneficios que otorga la EDC en las complicaciones motoras, tanto en modelos animales como en estudios clínicos [60, 61], por lo que cada vez se ha visto más aceptada como terapia para la EP.

Sistemas de liberación controlada para la administración de fármacos

Hoy en día existe una gran variedad de sistemas y métodos desarrollados para lograr liberación controlada de fármacos, entre los cuales se encuentran sistemas poliméricos obtenidos mediante la microtecnología, dentro de las cuales destacan las micropartículas. Estos son capaces de mantener el fármaco encapsulado y

modificar el tiempo de su liberación con respecto a las formulaciones convencionales. Su uso, principalmente destinado a su administración parenteral, incluyendo la vía intraocular, intraarticular e incluso intratecal, posee diversas ventajas, dentro de las cuales destacan [62] :

- La protección del principio activo encapsulado frente a agentes externos que puedan degradarlo (ej: enzimas).
- Su vía de administración puede evitar el paso del principio activo por el sistema gastrointestinal y su paso por el hígado, evitando su metabolización o su baja absorción. Este es el caso de la vía intramuscular o subcutánea.
- Las partículas son lo suficientemente pequeñas para ser administradas por medio de una inyección y se biodegradan en el organismo sin causar ningún efecto indeseable en el sitio de inyección o implantación.
- Disminuyen la frecuencia de administración, minimizando además los efectos adversos ya que la cantidad liberada del fármaco se puede mantener dentro del rango terapéutico, evitando consecuencias tanto de su exceso como también su déficit, lo cual se traduce en una mejoría en la adherencia al tratamiento.

Microencapsulación

La microencapsulación en el área farmacéutica es la técnica que se utiliza para incorporar un fármaco en el interior de materiales de distinta naturaleza para obtener partículas de tamaño micrométrico.

Las micropartículas de interés en nuestra área son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250 μm , y pueden clasificarse como microcápsulas o microesferas (Figura 4), las cuales se diferencian principalmente por su morfología y por su estructura interna. Las microcápsulas se caracterizan por tener un centro de naturaleza sólida, líquida o gaseosa cubierta por una capa

polimérica, mientras que las microesferas corresponden a sistemas matriciales sólidos, donde el fármaco se entremezcla de manera homogénea [63, 64].

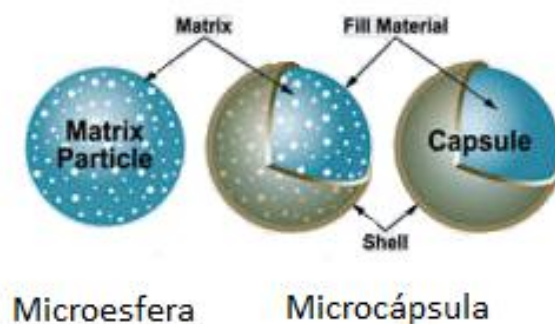


Figura 4: Esquema representativo de las diferencias morfológicas y estructurales de las micropartículas. Fuente: Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. IGJPS, 2012; 2(1): 1-20.

Para poder obtener uno de los dos tipos de estructura se debe tener en cuenta el método por el cual se elaboran, que a su vez también depende de la naturaleza del polímero a utilizar, de las características fisicoquímicas del principio activo que se desea encapsular y del tamaño de micropartícula deseado [65]. Dentro de los métodos empleados para ello, se encuentran: coacervación, polimerización interfacial, secado por atomización o *spray drying*, emulsión/evaporación de solvente, entre otras [66]. De estos, el método de emulsión/evaporación de solvente y coacervación simple tienen la ventaja de ser sencillos en cuanto a su procedimiento experimental y equipamiento, por lo que son algunos de los más utilizados para elaborar la mayoría de los productos que hoy se comercializan [64, 67, 68].

Existen diversos materiales con los que es posible elaborar micropartículas. Dentro de ellos, se encuentran los polímeros, que corresponden a estructuras macromoleculares en las que se diferencian una o varias unidades estructurales, llamados monómeros, que se repiten originando cadenas. Estos polímeros pueden estar constituidos por un solo tipo de monómero, los cuales se denominan

homopolímeros (ej: ácido poliláctico: PLA) o pueden estar formado por 2 monómeros diferentes, denominándose co-polimero (ej: poliláctico-policaprolactona PLA-PCL). También existen los que combinan 3 tipos de monómero: los terpolímeros.

No obstante, para la elaboración de micropartículas cuya vía de administración pretende ser parenteral, es fundamental que estos sean biocompatibles, lo que significa que no deben causar una respuesta adversa significativa en el medio fisiológico; tras la interacción con los tejidos y fluidos corporales, teniendo una degradación controlada.

Los polímeros biodegradables son ideales para este propósito, ya que son eliminados por el organismo a través de productos de degradación biocompatibles. Pueden ser de origen natural, semisintético o sintético (Tabla 1) [69] , destacando en esta última clase el co-polímero del ácido láctico y ácido glicólico (PLGA).

Tabla 1: Polímeros biodegradables utilizados en la elaboración de micropartículas

Naturales	Semisintéticos	Sintéticos
Proteínas: colágeno, albúmina, gelatina Carbohidratos: dextrano, ácido hialurónico, alginato, quitosano	Derivados de celulosa	Poli(ésteres): copolímero del ácido láctico y glicólico (PLGA) polímero del ácido láctico (PLA), poli-ε-caprolactona (PCL) Poli(ortoésteres) Poli(anhídridos) Poli(fosfazenos) Poli(acrilamidas) Poli(alquilcianoacrilatos)

Fuente: Elaboración propia

El PLGA, como se señala anteriormente, está formado por monómeros del ácido láctico y ácido glicólico, los cuales pueden variar su proporción (Figura 5). Es biocompatible y biodegradable, destacándose su ausencia de toxicidad [70], ya que en el organismo sufre la hidrólisis de sus enlaces éster y mediante metabolismo se generan dióxido de carbono y agua, los cuales son excretados normalmente por el cuerpo.

A consecuencia de ello, otra de las ventajas de este polímero es que está aprobado por la FDA para ser utilizado en la industria farmacéutica. Consta de una vasta experiencia clínica y actualmente se encuentran en el mercado varias formulaciones elaboradas con este material.

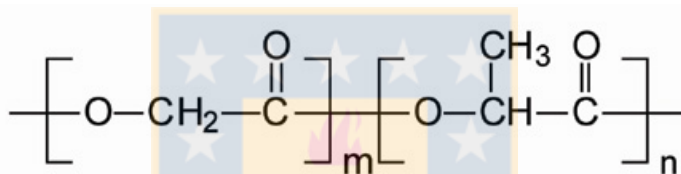


Figura 5: Estructura química representativa del PLGA. Fuente: PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations, Drug Development & Delivery, 3(2).

Existen diferentes tipos de PLGA, diferenciándose en la proporción de los monómeros que la conforman, peso molecular y el grupo terminal de su cadena pudiendo ser éster o ácido carboxílico. En conjunto, estos factores influyen en gran medida en su hidrofobicidad y su cinética de degradación, y a su vez, en la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada [71].

Esta última propiedad y el perfil con el cual se libera el principio activo, como se mencionó anteriormente, dependen de numerosos parámetros. No obstante, es frecuente observar que la salida del fármaco y la velocidad inicial de este proceso son elevadas y que, posteriormente, alcanzan valores constantes.

Dentro de las numerosas investigaciones publicadas sobre los mecanismos mediante los cuales se produce la liberación del fármaco desde este tipo de sistemas, se describen principalmente las fases de difusión y de erosión. La primera fase se rige por la entrada del medio (generalmente acuoso) al interior del sistema, disolviendo al principio activo y luego difundiendo a través de la matriz polimérica, generando con frecuencia poros o canales que facilitan la liberación del resto del fármaco contenido en el sistema microparticulado. Luego, en la fase de erosión, se produce una cierta relajación de las cadenas poliméricas que permiten la liberación del resto del fármaco. Esta fase se ve determinada en gran parte por la biodegradabilidad de cada polímero y por las características del medio en el que se encuentra inmerso, ocurriendo un cambio morfológico importante de las partículas y, finalmente, su degradación completa. Así, se puede resumir el proceso de degradación de las micropartículas poliméricas en tres etapas [72]:

- 1) Una etapa preliminar en la que inicialmente se liberan moléculas del principio activo que se encuentran enlazadas a la superficie de las partículas.
- 2) Etapa de difusión, en la que el fármaco se libera difundiendo a través de la matriz polimérica.
- 3) Etapa de erosión, en la cual el principio activo es liberado gracias a la desintegración y posterior degradación de la matriz, generando cadenas de tamaño tal que permitan ser solubilizadas.

El PLGA se presenta en estado cristalino y amorfo, prefiriéndose este último estado para el diseño de formulaciones de liberación controlada [72]. El mecanismo de liberación de fármacos en sistemas elaborados con este polímero generalmente se comportan de manera bifásica (difusional / erosional).

Debido a que el PLGA es soluble en solventes orgánicos, como el diclorometano, cloroformo, acetona, etc, este polímero se utiliza extensamente para elaborar micropartículas mediante el método de emulsión/evaporación de solvente,

generalmente a partir de una emulsión simple aceite/agua (O/W). Esta técnica posee variantes que se seleccionan principalmente de acuerdo a las características hidrofílicas o hidrofóbicas del fármaco, sin embargo el método consiste en cuatro etapas (Figura 6):

- 1) Disolución o suspensión del principio en una solución de polímero en solvente orgánico.
- 2) Emulsificación de la fase orgánica (fase dispersa), en una fase acuosa (que constituye la fase continua).
- 3) Extracción del solvente desde la fase dispersa por evaporación del solvente, transformando las gotas de fase dispersa en partículas sólidas.
- 4) Recuperación y secado de las micropartículas, eliminando el solvente residual.

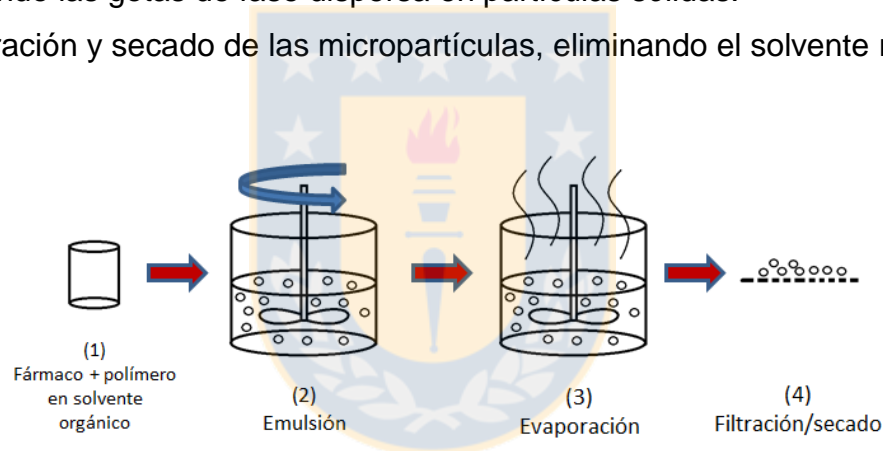


Figura 6: Elaboración de microesferas por emulsión/evaporación de solvente.

Fuente: Elaboración propia

En el caso de la incorporación de principios activos hidrosolubles, se pueden utilizar cuatro variantes de esta técnica:

- Método de doble emulsión (W/O/W): en la cual se elabora una solución acuosa del fármaco hidrofílico que se emulsifica con la fase orgánica para formar una emulsión W/O. Esta a su vez es dispersada en una segunda solución acuosa, formando la segunda emulsión W/O/W.

- Método del co-solvente O/W: se utiliza cuando el principio activo no es soluble en el solvente orgánico. En este caso, se utiliza otro solvente en el que el fármaco se disuelve, incorporándose esta solución al solvente orgánico.
- Método no-acuoso O/O: la fase acuosa se reemplaza por un aceite. Se utiliza cuando el principio activo no es hidrosoluble.
- Método de dispersión O/W: el fármaco, de características hidrosolubles, se dispersa en forma de polvo sólido en la solución orgánica que contiene el polímero. Luego, esta suspensión es emulsificada con una fase acuosa.

Diseño de experimento en el desarrollo de micropartículas

Es importante considerar al momento de elaborar las micropartículas la eficacia del método y sus características fisicoquímicas, para lo cual se suelen modificar diversos factores que se sabe influyen directamente en esta, como: el porcentaje de fármaco o de otros componentes de matriz, el porcentaje de tensioactivo en la fase acuosa, el volumen de las fases orgánica y acuosa, entre otras.

Durante mucho tiempo, los sistemas microparticulados han sido elaborados a través de metodologías en las que se cambia una variable a la vez, manteniendo las otras constantes. Mediante esta, se puede lograr una característica específica de la formulación, sin embargo, esto no asegura la obtención de la composición o proceso óptimo. Debido a que resulta compleja la evaluación de la influencia de cada una de las variables individualmente o combinadas, se recurre a modelos matemáticos que logran establecer de forma cuantitativa la relación entre estas para obtener una formulación óptima [73].

Los diseños de experimentos (DDE), abarcan la aplicación de diseños experimentales adecuados, junto con la generación de ecuaciones matemáticas y

resultados gráficos, logran representar un panorama completo de la variación de la(s) respuesta(s) en función del factor o factores. Entre todas, las técnicas de DDE proporcionan la mejor solución y requieren menos experimentos para lograr una formulación óptima, ya que pueden rastrear y rectificar el problema de una manera mucho más sencilla.

Otra ventaja de los DDE son las técnicas de cribado, que ayudan a encontrar las variables de entrada "importantes" y "sin importancia" en la respuesta buscada: se puede simular el comportamiento de la formulación o del proceso usando la ecuación modelo, lo cual permite ahorrar recursos, tiempo, esfuerzo, materiales, y costos. Incluso, el DDE puede predecir el rendimiento de las formulaciones sin prepararlas, detectando y estimando las posibles interacciones y sinergias entre las variables [74].

Existen numerosos tipos de diseños experimentales para elegir, por lo que la elección de un diseño entre los diversos tipos de opciones disponibles depende de la cantidad de recursos disponibles y del grado de control que el experimentador desea. Algunos diseños de baja resolución pueden ser suficientes para el propósito de una selección más sencilla de un gran número de parámetros experimentales, por otro lado, los diseños de cribado sólo admiten las respuestas lineales. En caso de que se observe una respuesta no lineal o se necesita una imagen más precisa de la superficie de respuesta, se usan diseños más complejos. Por ejemplo, cuando el investigador está interesado en estimar la interacción e incluso efectos cuadráticos, se utilizan los diseños de superficie de respuesta.

Es tal la utilidad de los DDE, que se ha estado utilizando regularmente en el área farmacéutica, no sólo en el diseño y desarrollo de nuevas formas de dosificación, sino también para modificar las existentes. De hecho, en literatura se puede encontrar variados informes sobre la formulación de micropartículas, microcápsulas y microesferas [74].

Es por ello que, en vista de las necesidades y carencias expuestas, resulta interesante desarrollar y optimizar una nueva formulación para el tratamiento de la EP que consiste en microesferas de pramipexol de aplicación parenteral. Estas, estarán enfocadas a conseguir la liberación del principio activo a una velocidad suficiente para mantener niveles terapéuticos de este durante el mayor tiempo posible tras la administración de la mínima cantidad de microesferas. Esto se traduce en una disminución en la frecuencia de administración y en la incidencia de efectos adversos, convirtiéndola en una buena alternativa de tratamiento.



HIPÓTESIS

El desarrollo de microesferas biodegradables de pramipexol para su administración por vía parenteral, permite obtener una forma farmacéutica de liberación controlada capaz de liberar el principio activo en forma constante y durante un tiempo prolongado, mejorando la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Parkinson.



OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y evaluar un sistema de liberación controlada, microesferas biodegradables de pramipexol, para su administración parenteral.

Objetivos específicos

- 1) Optimizar la elaboración de microesferas de diclorhidrato de pramipexol por medio del método de emulsión evaporación de solvente, modificando parámetros que permitan su obtención con las características apropiadas para la administración parenteral.
- 2) Caracterizar y evaluar *in vitro* las microesferas de diclorhidrato de pramipexol.
- 3) Esterilizar la formulación optimizada mediante radiación gamma. Caracterizar la formulación tras el proceso de esterilización.
- 4) Evaluar la eficacia *in vivo* de la formulación optimizada en un modelo animal de Parkinson.

MATERIALES Y REACTIVOS

Principios activos y reactivos

- Aceite de maravilla comercial.
- Cloruro de sodio para análisis, Merck, Alemania.
- Copolímero del ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) Resomer® RG 502, Evonik Industries, Alemania.
- Diclorometano para análisis, Merck, Alemania.
- Dihidrógenofosfato de sodio anhidro para análisis, Merck, Alemania.
- Dimetilsulfóxido, Merck, Alemania.
- Fosfato de potasio monobásico, 98,00 - 100,5 % pureza, Merck, Alemania.
- Ketamina clorhidrato, solución inyectable al 10 %, DragPharma, Chile.
- Poli(vinilalcohol) hidrolizado 87 – 90 %, Sigma - Aldrich, Alemania.
- Pramipexol diclorhidrato monohidratado, USP reference standard, USA.
- Pramipexol dihidroclorhidrato, 99,95 % pureza, WaterstoneTech, USA.
- Rotenona, Sigma- Aldrich, Alemania.
- Suero fisiológico, Difem Pharma, Chile.

Materiales y equipos

- Agitador orbital OS- 20, Boeco, Alemania.
- Agujas hipodérmicas 21G y 25G, Nipro Corporation, Japón.
- Analizador de tamaño de partícula de difracción láser Microtrac modelo S3550, Microtrac Inc, USA.
- Balanza analítica AB204-S ,Metler Toledo, Alemania.
- Calorímetro Diferencial de Barrido modelo 822^e, Mettler Toledo, Alemania.
- Centrífuga 5702, Eppendorf, Alemania.
- Espectrofotómetro UV-visible Cary 50 conc, Varian, Australia.
- Espectrómetro de Rayos X modelo AXS D4 ENDEAVOR, Brüker, Suiza.
- Estufa de laboratorio Venticell 111- Komfort, MMM Group, Alemania.

- Filtros de membrana Durapore® 0,45 µm, Millipore, Irlanda.
- Homogenizador Ultraturrax® T18D, Alemania.
- Jeringas desechables de 1 y 5 mL, Nipro Corporation, Japón.
- Liofilizador Freezone 4.5, Labconco, USA..
- Material de vidrio.
- Membrana de nylon para jeringa 0,45 µm, Replibio Bioscience, USA.
- Micropipeta 1000 – 5000 µL, Sci-Logex, USA.
- Micropipeta Biopette 100 – 1000 µL, Labnet, USA.
- Micropipeta Biopette 20 – 200 µL, Labnet, USA.
- Microscopio electrónico de barrido, JEOL, modelo JSM-6380 LV, USA.
- pH-metro VWR Scientific, modelo 8005, VWR International Inc., USA.
- Placa de agitación magnética individual MagneticStirrer 2ML, REMI, India.
- Placa de agitación magnética MultiStirrer 6 Velp Scientifica, Italia.
- Placa de agitación magnética WiseStir MS-MP4, Wisd Laboratory Instruments, Alemania.
- Purificador de agua Purelab Classic UVF MK2, ELGA, Reino Unido.
- Sonda homogenizadora S18N-19G, IKA®, USA.
- Sonda ultrasonido, Vibracell, modelo VCX130, Sonics&Materials. Inc, USA.
- Tubos de Plástico de 15 mL,
- Tubos de Plástico de 50 mL.
- Tubos Eppendorf 1,5 mL.
- Vórtex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA.
- Vórtex multitubo MultiReax, Heidolph, Alemania.

METODOLOGÍA

1.- Elaboración y optimización del método de microencapsulación de diclorhidrato de pramipexol

1.1.- Elaboración de las microesferas

Se prepararon microesferas de PLGA (RG 502) 50:50 cargadas con diclorhidrato de pramipexol (DPMX) mediante la técnica de emulsión/evaporación del solvente, de acuerdo a metodología desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación [75]. A continuación se detalla la técnica de elaboración de microesferas:

La fase orgánica se preparó disolviendo 400 mg de polímero PLGA 50:50 (Resomer® RG 502) en 1,0 mL de diclorometano (DCM). Luego, se dispersó el DPMX en la fase orgánica con la ayuda de un vórtex a 1.000 rpm durante 60 segundos y luego sometiéndolo a ultrasonido mediante una sonda a 80 % de amplitud por 60 segundos en hielo.

La fase acuosa consistió en 5,0 mL de una solución del tensioactivo poli(vinilalcohol) (PVA) al 0,5 % p/v.

Ambas fases fueron emulsificadas con un homogenizador a 8.000 rpm por 30 segundos. La emulsión O/W así obtenida fue adicionada a 100 mL de una solución de PVA al 0,1% p/v y NaCl 5% p/v, y dejada en agitación magnética a 600 rpm bajo campana por un periodo de 3 horas, para la evaporación de la totalidad del solvente.

Finalmente, las microesferas fueron recuperadas por filtración al vacío por filtros de membrana de 0,45 µm, lavadas con agua nanopura y liofilizadas (-40 °C y

133x10⁻³ mBar) durante al menos 12 horas (Figura 7). Las microesferas liofilizadas fueron refrigeradas a 4 °C y mantenidas en un desecador hasta su uso.

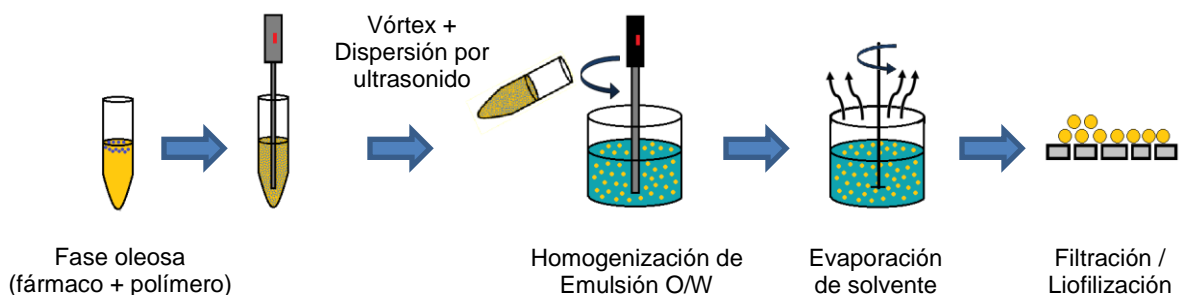


Figura 7: Esquema de elaboración de microesferas de PLGA cargadas con DPMX.

Fuente: Elaboración propia.

1.2.- Diseño experimental

Para optimizar la formulación, se realizó un diseño de experimentos en Statgraphics Centurion XV versión 15.2.05, que correspondió a un diseño central compuesto rotatable 2² + estrella, con 5 niveles para cada variable. Se especificaron como variables experimentales:

- Cantidad de DPMX utilizado en la preparación de las microesferas (mg).
- Velocidad de homogenización de la emulsión (rpm).

A continuación se encuentran los niveles codificados y reales de las variables utilizadas en el diseño experimental (Tabla 2). La cantidad de DPMX ensayada varió entre 9,9 y 80,1 mg y la velocidad de agitación osciló entre 3.095 y 7.904 rpm. En todos los casos la cantidad de PLGA utilizada se mantuvo constante (400 mg).

Tabla 2 : Variables del diseño central compuesto para la elaboración de microesferas de DPMX

Niveles de variación	DPMX (mg)	Velocidad de homogenización (rpm)
-1,414	9,9	3.095
-1	20,2	3.800
0	45,0	5.500
1	69,8	7.200
1,414	80,1	7.904

Fuente: Elaboración propia.

Las respuestas a evaluar en el diseño experimental fueron: eficacia de encapsulación (EE) (Y_1), efecto burst (%) (Y_2) y tamaño promedio de las microesferas (μm) (Y_3). A partir de estas condiciones se obtuvo un diseño con un total de 10 experimentos, los cuales se realizaron por duplicado y se midieron las respuestas a cada uno de ellos.

Además, las formulaciones fueron analizadas preliminarmente, evaluando la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas, se establecieron metas para cada una de las respuestas: se maximizó la respuesta EE, se minimizó el efecto burst y se mantuvo un valor fijo de $50 \mu\text{m}$ para el tamaño promedio de las microesferas. Además, se realizaron diagramas de Pareto para cada respuesta, con el fin de determinar qué factor o factores influyen significativamente en ellas. De acuerdo a estas respuestas, se puede obtener la combinación de factores que permitan la obtención de una formulación con características teóricas óptimas, según lo especificado inicialmente en el software.

2.- Caracterización de las microesferas de PLGA

Las microesferas obtenidas fueron caracterizadas en cuanto a su capacidad para encapsular DPMX, tamaño y distribución de tamaños, morfología e interacción entre el polímero y el principio activo.

2.1.- Determinación del rendimiento del proceso

El rendimiento del proceso determina la relación entre los sólidos totales utilizados y las microesferas recuperadas. Se determinó por gravimetría y se calculó de acuerdo a la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg microesferas recuperadas}}{\text{mg de sólidos totales}} \times 100$$

Ecuación 1: Cálculo del rendimiento del proceso de elaboración de microesferas de PLGA

2.2.- Determinación de la eficacia de encapsulación y carga

La cantidad de fármaco encapsulado se expresa como eficacia de encapsulación (EE) y carga. Para poder determinar esto, el fármaco fue extraído desde las microesferas (ver punto 2.3.1) y luego cuantificado por espectrofotometría UV (ver punto 2.3.2). La EE y carga fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Eficacia de encapsulación (EE \%)} = \frac{\text{mg DPMX encapsulado}}{\text{mg DPMX utilizado}} \times 100$$

Ecuación 2: Cálculo de eficacia de encapsulación de DPMX en microesferas de PLGA

$$Carga (\%) = \frac{mg \text{ DPMX encapsulado}}{mg \text{ sólidos utilizados}} \times 100$$

Ecuación 3: Cálculo de carga de DPMX en microesferas de PLGA

2.3.- Método para la cuantificación de DPMX desde microesferas de PLGA

2.3.1.- Extracción del principio activo encapsulado desde las microesferas de PLGA

Para cuantificar la cantidad de fármaco encapsulado en cada lote de microesferas se procedió a extraer el principio activo desde la matriz polimérica. Para ello se pesaron aproximadamente 20,0 mg de microesferas liofilizadas, las que fueron transferidas a un tubo plástico de 15 mL. A estas se les agregó 3,0 mL de diclorometano, con el objetivo de disolver el polímero y se agitó en vórtex a 1.000 rpm durante un tiempo de 2 minutos. Luego, a este mismo tubo se le agregó 3 mL de buffer fosfato a pH 7,4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 9,464 \text{ g/L}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 9,073\text{g/L}$ en proporciones 4:1), y se agitó en vórtex a 1000 rpm por 2 minutos, para extraer el fármaco desde la fase orgánica. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 3.000 rpm por un periodo de 5 minutos, para separar nuevamente ambas fases. La fase acuosa, ubicada sobre la fase orgánica, fue extraída con micropipeta y transferida a un matraz aforado de 25 mL. Este procedimiento fue repetido tres veces y, finalmente, fue completado a volumen con buffer fosfato a pH 7,4 para su cuantificación por espectrofotometría UV.

2.3.2.- Metodología analítica para la cuantificación de DPMX desde microesferas de PLGA

La cuantificación del principio activo en las formulaciones obtenidas desde los experimentos realizados así como en buffer fosfato se realizó mediante

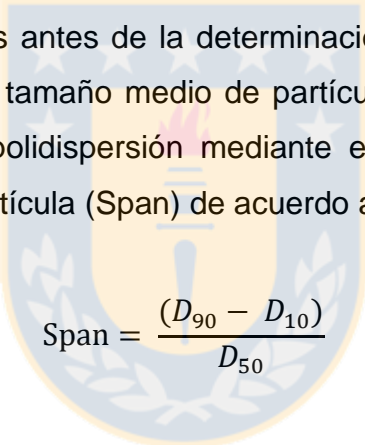
espectrofotometría UV a 262 nm, método previamente desarrollado y validado [76].

2.4.- Caracterización morfológica y distribución de tamaño de partícula

Las formulaciones desarrolladas fueron caracterizadas por tamaño de partícula, distribución de tamaño y morfología, las que se determinaron mediante las siguientes técnicas:

2.4.1.- Difracción láser: Tamaño y distribución de tamaño de partícula

Las microesferas liofilizadas fueron suspendidas en agua nanopura y sometidas a ultrasonido por 30 segundos antes de la determinación para prevenir agregación de partículas. Se analizó el tamaño medio de partícula así como su distribución. Además, se determinó la polidispersión mediante el cálculo del coeficiente de dispersión de tamaño de partícula (Span) de acuerdo a la ecuación 4.


$$\text{Span} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}}$$

Ecuación 4: Cálculo de índice Span.

Donde D_n ($n = 10, 50, 90$) expresa el diámetro de partícula a 10%, 50% y 90% del volumen de distribución. Un valor de Span alto es indicativo de una distribución de tamaños heterogénea, mientras que un valor cercano a 1 indica una distribución de tamaño monodispersa.

2.4.2.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): morfología y tamaño

Las muestras de microesferas liofilizadas fueron recubiertas por con una fina capa de oro antes de ser observadas a 20 kV. Luego fueron montadas en el

microscopio de barrido (JEOL JMS-6380 LV), el que entregó una aproximación del tamaño e imágenes que mostraron detalles de la morfología y superficie de las microesferas (presencia de poros, cristales, etc.).

2.5.- Determinación de la interacción entre principio activo y polímero

2.5.1.- Difracción de rayos X (XRD)

El objetivo de esta determinación es el análisis cualitativo de materiales, el estudio de transformaciones de fase y la determinación de la estructura cristalina. Los difractogramas se obtuvieron desde un difractómetro XRD que utilizó radiación de Cu-Ká, con filtro de Ni. Las microesferas se analizaron con un barrido entre 5 a 50° 2 θ , con un ancho de paso de 0,04°/segundo. Bajo estas condiciones se analizaron las siguientes muestras: PLGA, DPMX, microesferas cargadas con DPMX y microesferas blanco.

2.5.2.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se aplicó un circuito térmico desde 10 °C hasta 250 °C a una velocidad de 10 °C/min a las siguientes muestras: PLGA, DPMX, microesferas cargadas con DPMX y microesferas blanco. Las modificaciones en las propiedades térmicas de la formulación proporcionan información sobre el estado en que se encuentra el principio activo o si se producen interacciones entre los componentes de la formulación.

2.5.3.- Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT- IR)

Los espectros de FT-IR se obtuvieron desde un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum BX, cada espectro se registró en el rango de 4000 a 400 cm⁻¹ (4 cm⁻¹ de resolución), con un escaneo de 32 veces en modo transmitancia (% T). La

preparación de las muestras se realizó de manera cuantitativa en tabletas de KBr, mezclando 1 mg de muestra por cada 100 mg de KBr, aproximadamente.

2.6.- Evaluación de la cinética de liberación *in vitro* del principio activo desde las microesferas de PLGA

Los estudios de liberación *in vitro* del principio activo permiten evaluar el comportamiento de las microesferas como sistemas de liberación controlada.

El estudio fue realizado bajo condiciones sink, es decir, en caso que todo el principio activo encapsulado se haya liberado, la concentración de este en el medio debe ser a lo menos 10 veces inferior que la concentración máxima de solubilidad en dicho medio. Como medio de liberación se utilizó buffer fosfato pH 7,4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 9,464 \text{ g/L}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 9,073 \text{ g/L}$ en proporciones 4:1).

Se suspendieron 30 mg de microesferas liofilizadas estériles y no estériles en 5 mL de medio de liberación. Para cada tipo de formulación se seleccionaron 5 lotes diferentes, tomando muestras por duplicado de cada uno. Los tubos se dispusieron en un baño termostatzado a una temperatura de 37 °C con agitación a 100 rpm durante todo el estudio.

Se tomaron muestras a intervalos de tiempo preestablecidos durante un período de 30 días. Para tomar la muestra del medio de liberación, se procedió a centrifugar los tubos que contenían las microesferas para evitar la extracción de alguna microesfera que haya estado suspendida en el medio de liberación. Se centrifugaron a 3.000 rpm por un periodo de 5 minutos y luego se extrajo con micropipeta 4 mL de medio de liberación sobrenadante, reponiendo al tubo la misma cantidad de volumen. Luego, cada muestra se filtró mediante filtros de 0,45 nm y fueron leídas directamente por espectrofotometría UV utilizando el método especificado en el punto 2.3.2.

3.- Esterilización de la formulación optimizada

Los productos farmacéuticos destinados a la administración parenteral deben cumplir requisitos de esterilidad [77, 78], por esta razón la formulación optimizada (8 lotes diferentes) fue enviada a la Comisión Chilena de Energía Nuclear para someterla a un proceso de esterilización por rayos gamma. Para esto, la formulación fue acondicionada introduciendo una cantidad determinada de muestra (100 mg aprox.) en viales de vidrio ámbar de 5 mL que fueron posteriormente sellados. Los viales fueron etiquetados y empacados con hielo seco en un contenedor de poliestireno expandido (plumavit), con el fin de evitar la influencia que tiene la temperatura en la aceleración del proceso hidrolítico de degradación del PLGA [79]. Para la irradiación se utilizó una fuente radiactiva Co^{60} aplicando una dosis de 25 kGy, tanto para las formulaciones como también para los componentes puros (PLGA y DPMX) y microesferas blancas. Para evaluar el efecto de la radiación, las formulaciones fueron caracterizadas y se evaluó la liberación del DPMX desde las microesferas.

4.- Evaluación de la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson

Dentro de los modelos utilizados para estudiar la EP en animales están los que consisten en la inducción de alteraciones tanto en la estructura o funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas en el circuito nigroestriado. La mayoría de estos consisten en la administración de sustancias exógenas neurotóxicas, entre las cuales se encuentra la rotenona, un pesticida de origen natural que inhibe selectivamente el complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, cuyo efecto en el organismo muestra similitudes a la progresión de la EP [80].

4.1.- Tratamientos administrados

Rotenona: esta fue disuelta en 2 mL de dimetilsulfóxido y luego emulsionada con aceite de maravilla hasta lograr una concentración de 1,5 mg/mL. La dosis administrada fue de 1,5 mg/kg/día vía intraperitoneal.

DPMX: se preparó una solución del fármaco en suero fisiológico (0,9 % NaCl) a una concentración de 1,0 mg/mL. La dosis administrada fue de 1,0 mg/kg/día vía subcutánea.

Microesferas: Se prepararon dos suspensiones de microesferas en 2,5 mL de suero fisiológico utilizando una cantidad de microesferas suficiente para lograr una concentración equivalente a 0,8 mg/mL de DPMX. Se administraron dosis equivalentes a 0,5 y 1,0 mg DPMX/kg cada 15 días vía subcutánea. En el caso de las microesferas blancas, se preparó una suspensión con una cantidad de formulación similar a la utilizada para obtener la concentración equivalente a 0,8 mg/mL de DPMX (aprox. 30 mg microesferas/mL).

4.2.- Diseño experimental de estudios *in vivo*

Para evaluar la eficacia de la formulación obtenida, se utilizó un modelo animal en ratas Wistar macho de aproximadamente 2 meses de edad y cuyo peso se encontraba entre 200 y 260 g. Las ratas se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, bajo condiciones estandarizadas de ciclos de luz/oscuridad 12/12 a 20° a 22°C y a una humedad relativa entre 40-60 %. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a guías bioéticas internacionales para el manejo de animales [81, 82].

Para llevar a cabo el estudio, los animales se dispusieron en 6 grupos de 10 ratas cada uno (Tabla 3). El grupo 1 (G1) fue dividido en 2 subgrupos de 5 ratas, a uno

de los cuales se le administró el vehículo en el que se dispersó la rotenona (dimetilsulfóxido/aceite de maravilla) y al otro, el vehículo donde se dispersó la formulación de microesferas (suero fisiológico). Al segundo grupo (G2) se le administró rotenona (1,5 mg/kg/día) por 45 días. Los grupos 3, 4, 5 y 6 también recibieron una dosis diaria de rotenona por 45 días (1,5 mg/kg/día). Además, al grupo 3 (G3) se le administró microesferas blancas; al grupo 4 (G4), microesferas cargadas con DPMX (cantidad de microesferas equivalente a un dosis 1,0 mg DPMX/kg) inyectada cada 15 días y al grupo 5 (G5), microesferas cargadas con DPMX (cantidad de microesferas equivalente a 0,5 mg DPMX/kg) inyectada cada 15 días. Al grupo 6 (G6) se le administró diariamente por vía subcutánea una solución de DPMX en suero fisiológico en una dosis de 1 mg/kg/día.

Tabla 3: Distribución de grupos de animales y tratamientos administrados

Grupo	N° de individuos		Tratamiento	Frecuencia
G1	10	5	Aceite de maravilla /dimetilsulfóxido	Diaria
		5	Suero fisiológico	
G2	10		Rotenona (1,5 mg/kg)	Diaria
G3	10	1)	Rotenona (1,5 mg/kg)	1) Diaria
		2)	Microesferas blancas	2) Cada 15 días
G4	10	1)	Rotenona (1,5 mg/kg)	1) Diaria
		2)	Microesferas DPMX (d.eq. a 1,0 mg/kg)	2) Cada 15 días
G5	10	1)	Rotenona (1,5 mg/kg)	1) Diaria
		2)	Microesferas DPMX (d.eq. a 0,5 mg/kg)	2) Cada 15 días
G6	10	1)	Rotenona (1,5 mg/kg)	1) Diaria
		2)	Solución de DPMX (1 mg/kg)	2) Diaria

Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar la progresión de los síntomas parkinsonianos inducidos por rotenona, los animales fueron sometidos a control de peso semanal y a pruebas de comportamiento (test de aquinesia, catalepsia y natación), de acuerdo a

metodología descrita a continuación [83]. El día 46 los animales fueron sacrificados de acuerdo a protocolo previamente aprobado. Se extrajeron los cerebros, los que fueron inmediatamente fijados en paraformaldehído, para luego obtener cortes histológicos de la sustancia nigra (datos no reportados en esta Tesis).

4.2.1.- Evaluación del peso corporal

Durante el período de estudio, las ratas fueron pesadas cada 7 días para evaluar su evolución.

4.2.2.- Test de akinesia

En este test se evaluó la dificultad de los animales para iniciar movimientos. Para ello, cada uno de los animales fue aclimatado en una superficie lisa de madera, elevada a 100 cm del piso por 1 minuto. Luego, con el uso de un cronómetro, se midió y registró el tiempo de latencia en el cual el animal tardó en mover sus cuatro extremidades sobre la superficie, estableciendo como un tiempo máximo de 180 segundos. El test se aplicó por triplicado para cada rata en los días 15, 30 y 45 del período de estudio.

4.2.3.- Test de catalepsia

La catalepsia, definida en animales como la incapacidad de estos para corregir una postura impuesta externamente, fue evaluada de dos formas: la primera consistió en colocar a cada animal sujeto de sus cuatro patas en una grilla dispuesta en forma vertical (25 cm de ancho x 44 cm de largo y 1 cm de espacio entre cada alambre). Se midió con cronómetro el tiempo desde que el animal fue dejado sobre la grilla hasta el momento en que este comenzó a mover sus patas o mostró algún movimiento (tiempo de latencia).

El segundo test consistió en disponer a cada animal apoyado con sus dos patas delanteras sobre una barra situada paralelamente sobre 10 cm de la superficie, quedando en una posición de media elevación. Se registró con cronómetro el tiempo de latencia cuando el animal removía sus patas.

Los tests de catalepsia se realizaron los días 15, 30 y 45 del estudio y se aplicaron por triplicado en cada rata con un período de descanso de 1 minuto entre cada repetición. Se determinó un tiempo máximo de latencia de 180 segundos para ambos tests.

4.2.4.- Test de natación

Para evaluar de manera global el deterioro motor de los animales, se realizó el test de natación. Este se llevó a cabo en un recipiente de 40 cm de ancho, 70 cm de largo y 50 cm de profundidad, el cual fue llenado con agua a 30 cm de profundidad a 27 ± 2 °C. Cada una de las ratas fue sometida a nado libre por un tiempo máximo de 1 minuto 30 segundos, durante los cuales se observó la forma y el rendimiento del animal al nadar. Estas observaciones fueron registradas de acuerdo a una escala de 0 a 3 en la cual: 0 = la parte posterior del animal se hundió y la cabeza flota; 1 = el animal nada ocasionalmente utilizando sus extremidades posteriores y mantiene flotando la parte anterior del cuerpo; 2 = el animal flota/nada ocasionalmente; 3 = el animal nada de manera continua. Inmediatamente después del test, cada animal fue secado con una toalla. El test de natación fue realizado los días 15, 30 y 45 del periodo de estudio.

5.- **Análisis estadístico**

Los resultados para los datos de Rendimiento (%), EE(%) y Carga (%) fueron expresados como promedio \pm desviación estándar y fueron comparados pre y post irradiación mediante el Test de Wilcoxon para muestras pareadas utilizando para ello el software GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad Software Inc., 2009)

considerando un valor $P < 0,05$ como significativo, con un nivel de confianza del 95 %.

Los perfiles de liberación fueron comparados mediante los factores de diferencia y similitud (f_1 y f_2 respectivamente), para el cual se utilizó el complemento para Microsoft Excel Ddsolver [84], además de un análisis de varianza ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad Software Inc., 2009), considerando valores $P < 0,05$ como datos estadísticamente significativos.

Los resultados de los tests de comportamiento fueron analizados mediante el software GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad Software Inc., 2009), realizando análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post test Bonferroni, tomando valores $P < 0,05$ como datos estadísticamente significativos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Elaboración y optimización del método de microencapsulación de diclorhidrato de pramipexol

De acuerdo a resultados preliminares, se obtuvieron formulaciones muy diferentes en cuanto a parámetros de encapsulación, tamaño, morfología y cinética de liberación al variar diferentes factores experimentales. Los parámetros considerados fueron: cantidad de fármaco, cantidad de PLGA, tiempo de homogenización, concentración de PVA y concentración de NaCl en la fase acuosa [75]. Según esos resultados, se seleccionaron las cantidades de reactivos y tiempos de proceso que se aplicaron en la elaboración del método de microencapsulación señalados en el punto 1.1, los cuales se mantuvieron constantes.

No obstante, al observar que la cantidad de fármaco es un factor que influye en los parámetros de encapsulación y al contar con un nuevo equipo que permite la variación de la velocidad de homogenización, se decidió evaluar la incidencia de ambos factores de forma combinada para optimizar las respuestas de interés de forma simultánea, utilizando para eso el diseño de experimentos.

A partir del diseño central compuesto descrito en el punto 1.2, se obtuvo un total de 10 experimentos (Tabla 3) en los cuales los factores experimentales fueron, como se señaló anteriormente, la cantidad de fármaco y la velocidad de homogenización de la emulsión. A estas formulaciones, cada una de ellas elaboradas por duplicado, se les evaluaron sus EE (Y_1), el efecto burst (Y_2) y el tamaño promedio de las microesferas (Y_3).

Tabla 4: Valores medios y desviaciones estándar de las respuestas evaluadas en el diseño experimental

Formulación	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1 (-1; -1)	78,0 ± 17,6	20,1 ± 1,5	123,5 ± 49,9
2 (1; -1)	46,0 ± 10,5	27,9 ± 0,6	74,8 ± 32,3
3 (-1; 1)	64,2 ± 5,1	9,6 ± 0,9	37,1 ± 13,6
4 (1; 1)	53,3 ± 1,2	63,3 ± 8,4	44,9 ± 15,9
5 (-1,4; 0)	58,1 ± 1,8	29,4 ± 29,4	39,9 ± 8,06
6 (1,4; 0)	47,3 ± 5,0	68,3 ± 8,2	52,9 ± 21,9
7 (0; -1,4)	59,6 ± 1,7	31,8 ± 5,1	101,5 ± 59,9
8 (0; 1,4)	50,3 ± 8,6	50,6 ± 19,1	34,0 ± 13,3
9 (0; 0)	65,9 ± 6,0	41,3 ± 5,5	51,3 ± 20,4
10 (0; 0)	70,1 ± 1,5	54,1 ± 7,7	49,2 ± 20,4

Fuente: Elaboración propia

En primer lugar, mediante SEM se realizó un análisis de la morfología de las microesferas, que reveló la presencia de muchos poros en la superficie y matriz de las formulaciones del diseño experimental elaboradas con las cantidades más altas de fármaco, mientras que las formulaciones elaboradas con las menores concentraciones de fármaco presentaron superficies más lisas y regulares (Figura 8).

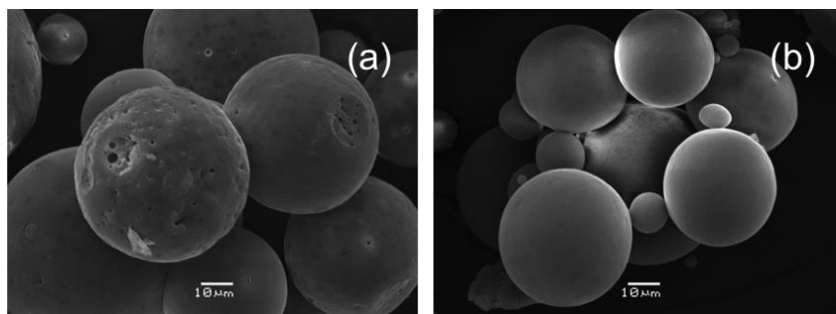


Figura 8: Imágenes SEM de formulaciones (a) F6 elaborada con 80,1 mg de DPMX (b) F3 con 20,2 mg de DPMX. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se obtuvieron diagramas de Pareto para cada respuesta, los cuales permitieron visualizar los factores y la combinación de estos que incidieron significativamente en estas.

Para la respuesta Y_1 (EE), se observa que solo el factor cantidad de fármaco tiene un efecto significativo y este es inversamente proporcional (Figura 9). Es decir, que a menor cantidad de DPMX, mayor será la EE de este, lo cual puede deberse a que el principio activo, al poseer una solubilidad muy alta en agua, tiende a difundir fácilmente hacia la fase acuosa de la emulsión, efecto que se acentúa al aumentar la cantidad de fármaco presente en la fase oleosa.

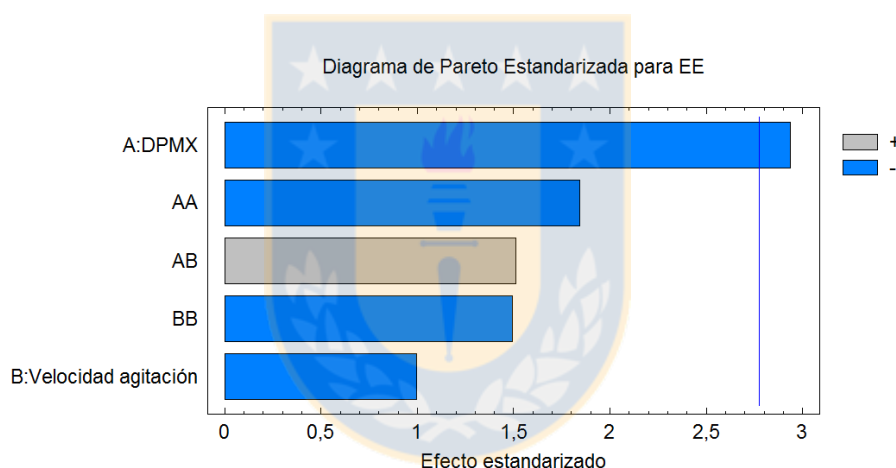


Figura 9: Diagrama de Pareto para la eficacia de encapsulación.

Fuente: Elaboración propia.

El caso de la respuesta Y_2 (efecto burst), se observa que la cantidad de fármaco influye significativamente en la liberación de este (Figura 10). Una mayor cantidad de fármaco implicó un mayor porcentaje de liberación a la primera hora de cinética. Esto puede deberse a la alta solubilidad del principio activo en agua (solubilidad en agua: 200 mg/mL), haciendo que difunda fácilmente hacia el medio acuoso, efecto que se acentúa al aumentar la cantidad de fármaco en la matriz polimérica.

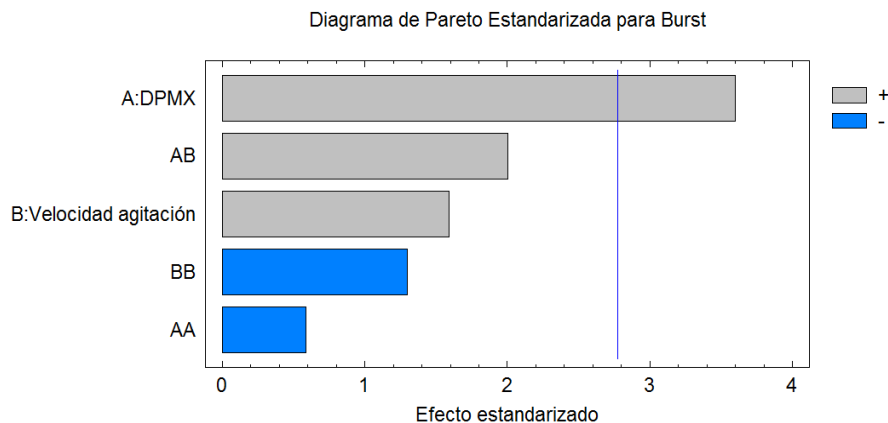


Figura 10: Diagrama de Pareto para efecto burst. Fuente: Elaboración propia.

Otra propiedad especialmente importante de las microesferas destinadas para administración parenteral, es el tamaño de partícula. En este caso, el tamaño medio de las microesferas preparadas con el diseño experimental y determinado por difracción láser, varió entre $34,0 \pm 13,3 \mu\text{m}$ y $123,5 \pm 49,9 \mu\text{m}$, lo que se considera adecuado para su administración parenteral. Para dichas formulaciones, se observó que para la respuesta Y_3 (tamaño), la velocidad de agitación es el factor que incide de manera significativa e inversamente proporcional (Figura 11).

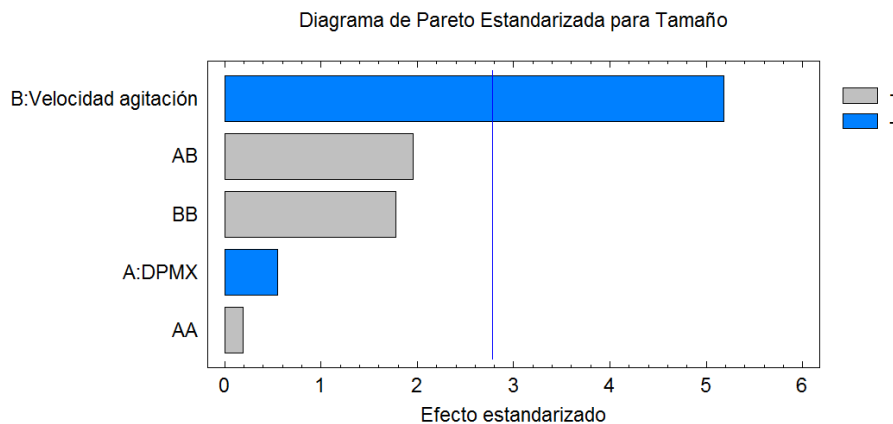


Figura 11: Diagrama de Pareto para el tamaño de partícula. Fuente: Elaboración propia.

Se sabe que la velocidad de homogenización de la emulsión es uno de los parámetros más importantes en el proceso de formación del glóbulo ya que cuando se aplican velocidades elevadas, se forman glóbulos de menor tamaño, llevando a la obtención de microesferas de pequeño tamaño [85].

También se obtuvo el gráfico de superficie de respuesta, en el cual se muestra con color el área de trabajo en función de la deseabilidad de los resultados que se espera obtener (Figura 12). Según este gráfico, los valores óptimos de cada factor para obtener la formulación deseada fueron:

- Cantidad de principio activo (DPMX) : 11,2 mg
- Velocidad de homogenización : 5.753 rpm

Estos valores se encuentran en la zona amarilla del gráfico, cuyo valor de deseabilidad fue de 0,7972; el cual es cercano a 1,0; por lo que constituye un buen indicador. Para esta formulación, según lo estimado por el diseño de experimentos, la EE que se obtendría sería de 65,2%, efecto burst de 20,5% y un tamaño de partícula promedio de 50 μm .

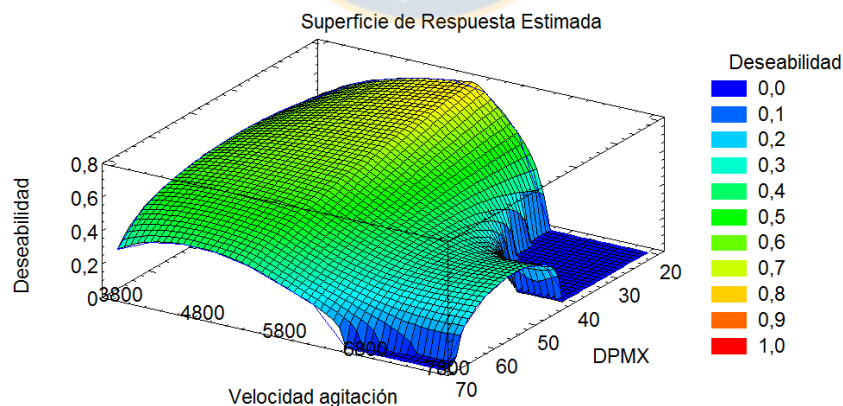


Figura 12: Gráfico de Superficie de Respuesta del diseño experimental. Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a lo obtenido, se determinaron los factores experimentales a utilizar y se elaboraron nuevamente lotes de microesferas, evaluando también las respuestas señaladas anteriormente para comprobar si estas poseían lo predicho teóricamente. Cabe señalar que los valores de los factores teóricos fueron ajustados de acuerdo a lo que los instrumentos empleados podían medir, por lo que se elaboraron 10 nuevos lotes utilizando una cantidad de 11,2 mg de DPMX y una velocidad de agitación para formar la emulsión de 5.800 rpm.



2.- Caracterización de la formulación optimizada

Las formulaciones optimizadas fueron caracterizadas de acuerdo a parámetros de encapsulación y tamaño (Tabla 4) para corroborar si son cercanos a lo predicho por el diseño experimental.

Tabla 5: Rendimiento, parámetros de encapsulación y tamaño de formulación optimizada

Rendimiento (%)	EE (% \pm DE)	Carga (% \pm DE)	Tamaño medio (μm \pm DE)	Span
73,4 \pm 4,5	63,1 \pm 7,7	2,4 \pm 0,3	41,1 \pm 16,2	0,89

Fuente: Elaboración propia.

De los resultados obtenidos para la formulación se puede confirmar que la EE y el tamaño medio fueron muy cercanos a los valores predichos, al igual que el tamaño. El índice Span obtenido también corresponde a un valor cercano a 1, por lo que se infiere una distribución homogénea del tamaño de las microesferas. El efecto burst a primera hora será discutido en el punto 3.4.

La morfología, evaluación de la interacción entre principio activo y polímero y el comportamiento de la formulación como reservorio (es decir, la cinética de liberación del fármaco *in vitro*) fueron comparados con los resultados obtenidos de las microesferas tras el proceso de radiación gamma (ver puntos 3.2, 3.3 y 3.4).

3.- Esterilización de la formulación optimizada

Las microesferas de PLGA destinadas a la administración parenteral deben cumplir con requisitos de esterilidad de Farmacopea [77, 78, 86]. En la actualidad existen varias técnicas mediante las cuales se puede realizar la esterilización de

este tipo de formulaciones. Las técnicas convencionales como el calor húmedo o calor seco tienen la desventaja de elevar la temperatura del envase y de la formulación que contiene, lo cual no es recomendable para principios activos o excipientes termolábiles, mientras que el uso de gases como el óxido de etileno, conlleva el riesgo de formar productos secundarios, además de ser un proceso lento [86].

La esterilización por radiación en cambio, posee la ventaja de evitar una elevación importante de temperatura, posee baja reactividad química y de residuos y además un alto poder de penetración. Por ello, la radiación gamma es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para esterilizar productos farmacéuticos terminados, de hecho, ha sido utilizada exitosamente en esterilización de microesferas de PLGA y otros sistemas poliméricos elaborados para administración parenteral [87]. No obstante, esta técnica puede presentar algunos problemas, ya que la energía irradiada puede llevar a la fragmentación de enlaces covalentes y producir radicales libres que pueden dañar al material sometido a radiación. Además, se ha visto que puede afectar al principio activo y/o a excipientes de la formulación mediante procesos de radiólisis, lo cual puede tener consecuencias desfavorables en la liberación del fármaco o en la estabilidad de la molécula, pudiendo comprometer su eficacia terapéutica [88-90].

Por ello, tanto las muestras esterilizadas como las no esterilizadas fueron caracterizadas en cuanto a su morfología, tamaño, parámetros de encapsulación y propiedades físicoquímicas; para evaluar posibles cambios inducidos por la radiación en la formulación diseñada.

3.1. Efecto de la irradiación gamma en la EE

Para evaluar posibles efectos del proceso de irradiación en la formulación optimizada, se midieron los parámetros de encapsulación (EE y carga de DPMX)

en las microesferas sometidas a radiación gamma y se compararon con los resultados previos a la esterilización (Tabla 5).

Tabla 6: Comparación de parámetros de encapsulación de microesferas estériles y no estériles

Formulación	Rendimiento (%)± DE	EE (%) ± DE	Carga (%)± DE
No Estéril	73,4 ± 4,5	63,1 ± 7,7	2,36 ± 0,31
Estéril	--	55,5 ± 3,3	2,06 ± 0,16

Fuente: Elaboración propia.

El hecho de que la carga y EE de las microesferas sometidas a la radiación gamma haya disminuido significativamente ($P < 0,05$) no es común, por lo que se evaluaron además los posibles efectos en la morfología y en las propiedades fisicoquímicas tanto de los componentes de la formulación puros como la formulación final. Cabe señalar que la disminución en la cantidad de DPMX contenida en las microesferas irradiadas, puede deberse a una degradación fotoquímica de este [91], producto que no pudo ser detectado mediante la técnica analítica utilizada en este trabajo, por lo que se sugiere un posterior análisis que permita dilucidar el proceso ocurrido tras la esterilización.

3.2. Efecto de la irradiación en la morfología y tamaño de las microesferas

En la Figura 13 se puede observar que se obtuvieron microesferas de forma esférica y con una superficie lisa, sin irregularidades evidentes ni presencia de cristales del fármaco.

Las imágenes son muy similares en cuanto a tamaño y características de superficie, sin embargo cuando se utilizan aumentos mayores, la temperatura de la muestra se eleva, produciendo la fusión del polímero y la consecuente

desintegración de la matriz polimérica. Esta resistencia al proceso de fusión fue mayor en el caso de las microesferas sin irradiar, mientras que las irradiadas parecieron tener una menor resistencia al aumento de la temperatura.

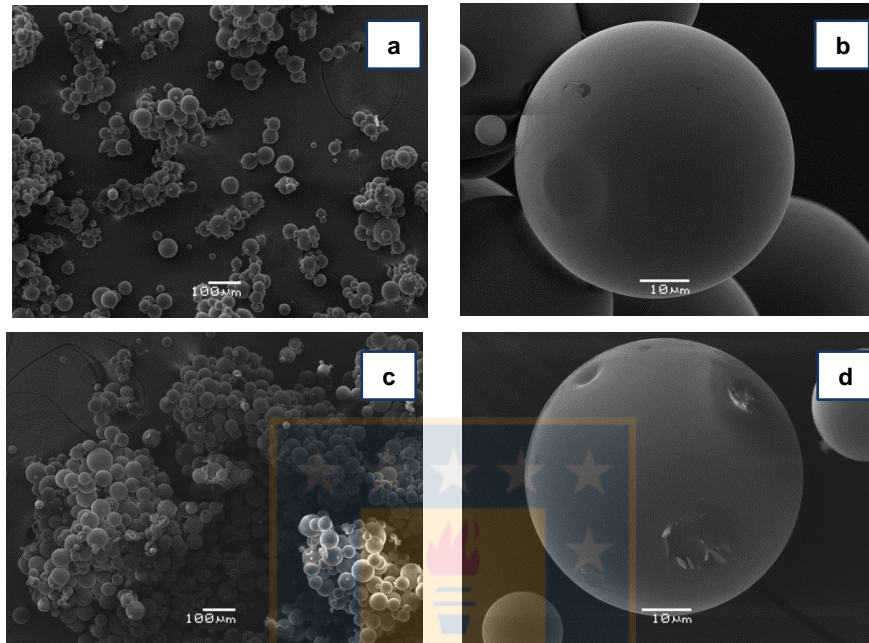


Figura 13: Imágenes SEM de microesferas no estériles a)100X, b) 1500X; microesferas estériles c) 100X , d)1500X. Fuente: Elaboración propia.

Es importante tener conocimiento de la superficie de las microesferas, debido a que si esta es lisa o rugosa, varía la superficie total que se encuentra en contacto con el medio de liberación utilizado para el estudio *in vitro* o con los fluidos biológicos que se utilizan en un estudio *in vivo*. La morfología afecta directamente el perfil de liberación, ya que si la microesfera presenta una superficie rugosa o con poros profundos, se facilitaría la difusión del principio activo hacia el medio de liberación. A esto se suma la exposición de una mayor superficie total de las microesferas, lo cual puede generar un aumento en la velocidad de liberación en comparación a microesferas que poseen una superficie lisa.

De acuerdo a lo visto, las microesferas presentaron tamaños similares a los obtenidos por difracción láser, menores a los 125 μm de referencia para formulaciones cuya vía de administración es parenteral (Tabla 6).

Tabla 7: Comparación de tamaños e Índice Span entre microesferas pre y post irradiación gamma

Formulación	Tamaño (μm)	D.E (μm)	Span
Lotes no irradiados	41,1	16,2	0,89
Lotes irradiados	42,2	17,1	0,86

Fuente: Elaboración propia.

3.3.- Determinación de la interacción entre principio activo y polímero

3.3.1.- Difracción de rayos X (XRD)

Mediante los difractogramas que a continuación se muestran, se puede observar de forma cualitativa si el proceso de esterilización influyó en las características cristalinas de los materiales que constituyen la formulación.

En el caso del principio activo puro (sin encapsular), no se observan diferencias apreciables en los máximos de absorción del DPMX tras el proceso de irradiación con rayos gamma (Figura 14). En ambos difractogramas, se aprecian varios máximos de intensidad: 6,79°; 20,82°; 21,34°; 23,66°; 24,18°; 24,73°; 25,78°, 26,54°; 26,86°; 27,21°; 28,45°; 33,73°; 35,01° y 36,05°; los cuales confirman el estado cristalino y casi inalterado de ambas muestras.

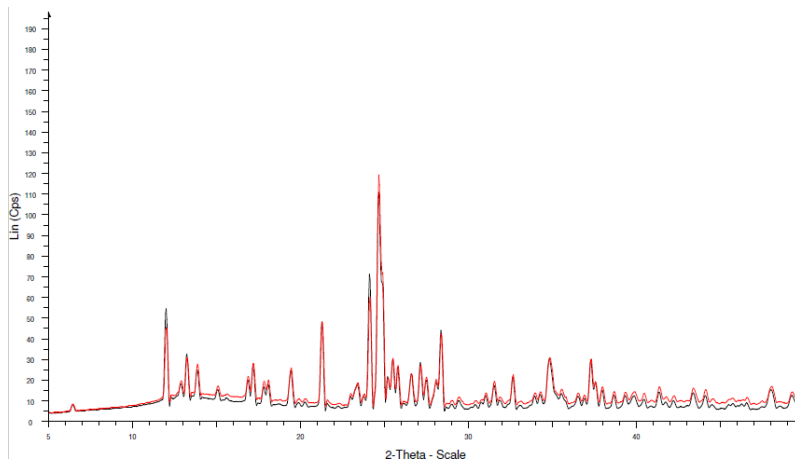


Figura 14: Difractograma de PLGA irradiado (rojo) y PLGA no irradiado (negro).

Fuente: Elaboración propia.

En el caso del PLGA, tampoco se observan diferencias sustanciales en los difractogramas tanto antes como después de la irradiación gamma. En ambos casos, se observan difractogramas con un comportamiento característico de compuestos en estado amorfo (Figura 15).

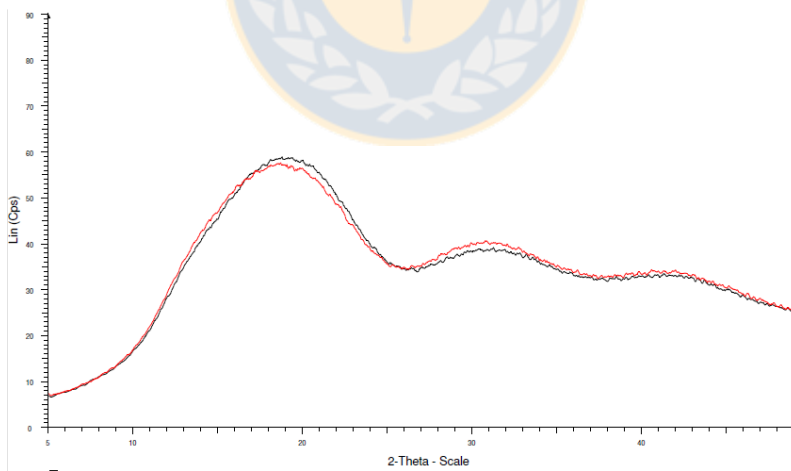


Figura 15: Difractogramas de PLGA irradiado (rojo) y PLGA no irradiado (negro).

Fuente: Elaboración propia.

Esto también se pudo observar en las microesferas blancas (Figura 16), en las cuales los difractogramas no presentan picos agudos como el observado con el

fármaco puro. En este caso, se observaron leves diferencias entre ambos patrones, sin embargo, se conserva la forma del espectro del polímero amorfo.

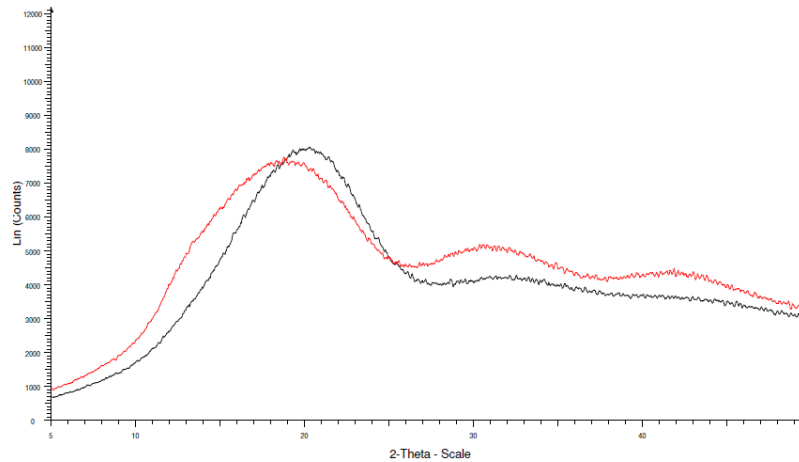


Figura 16: Diffractogramas de microesferas blancas irradiadas (rojo) y microesferas blancas no irradiadas (negro). Fuente: Elaboración propia.

Al analizar las microesferas cargadas con principio activo, se ve la predominancia de las características amorfas del polímero, sin embargo, se puede apreciar una leve aparición de los máximos del principio activo (Figura 17). Pese a ello, ambos espectros son similares, por lo que no se observó un cambio debido a la irradiación.

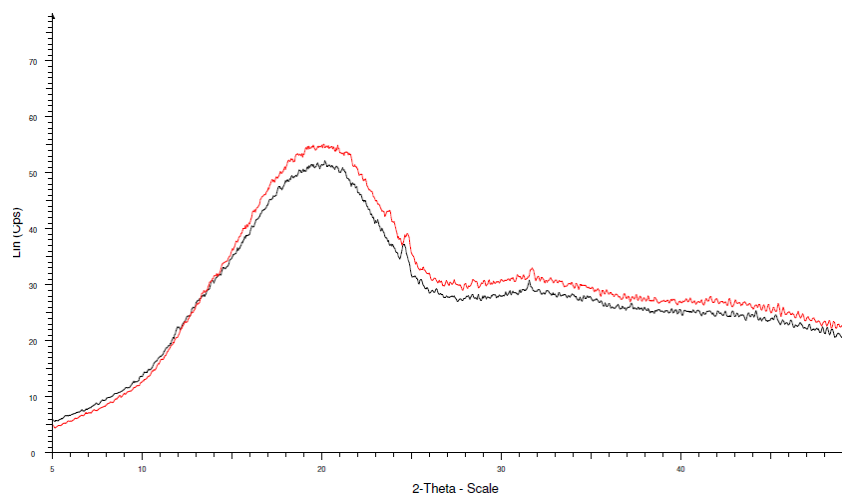


Figura 17: Diffractogramas de microesferas cargadas irradiadas (rojo) y microesferas cargadas no irradiadas (negro). Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a esto y a pruebas realizadas mezclando físicamente el DPMX y PLGA en diferentes proporciones [76], se puede inferir que el fármaco se encuentra disperso en las microsferas y que probablemente la baja señal en las microsferas cargadas con DPMX se deba a la baja concentración de este en la formulación, ya que al analizar mezclas físicas con una proporción elevada de DPMX/PLGA, se observan claramente los máximos del principio activo cristalino; en cambio, cuando se analiza la mezcla física de DPMX/PLGA en una proporción equivalente a la existente en la microsferas cargadas, se obtiene un difractograma muy similar al de la Figura 17.

3.3.2.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para complementar la información otorgada por los análisis de XRD, se realizaron análisis de DSC a las muestras señaladas anteriormente (ver punto 3.3.1). En la figura 18 se comparan los termogramas de varias muestras, entre las que encontramos DPMX puro pre y post irradiación gamma (termogramas a y b, respectivamente). En esta se observa un pico endotérmico agudo, propio de compuestos con naturaleza cristalina, a los 138,72°C y 139,11°C, respectivamente. Se puede percibir una diferencia en las intensidades de ambos picos, además de la presencia de un segundo pico endotérmico aproximadamente a los 160 °C en ambas muestras. La temperatura de fusión para ambas muestras fue de 269,77 °C y 269,81 °C, por lo que el proceso de irradiación no implicó un cambio significativo en esta característica.

En el caso del PLGA, se presenta tanto en la muestra irradiada como en la no irradiada (termogramas c y d) un pico endotérmico alrededor de los 65°C, el cual se atribuye a la relajación de las cadenas poliméricas. La temperatura de transición vítrea (Tg) correspondió a 42,1° C, lo que coincide con la Tg obtenida desde el fabricante del polímero (42,0 a 46,0 °C). Cabe señalar que el PLGA no muestra una temperatura de fusión, debido a su naturaleza amorfa.

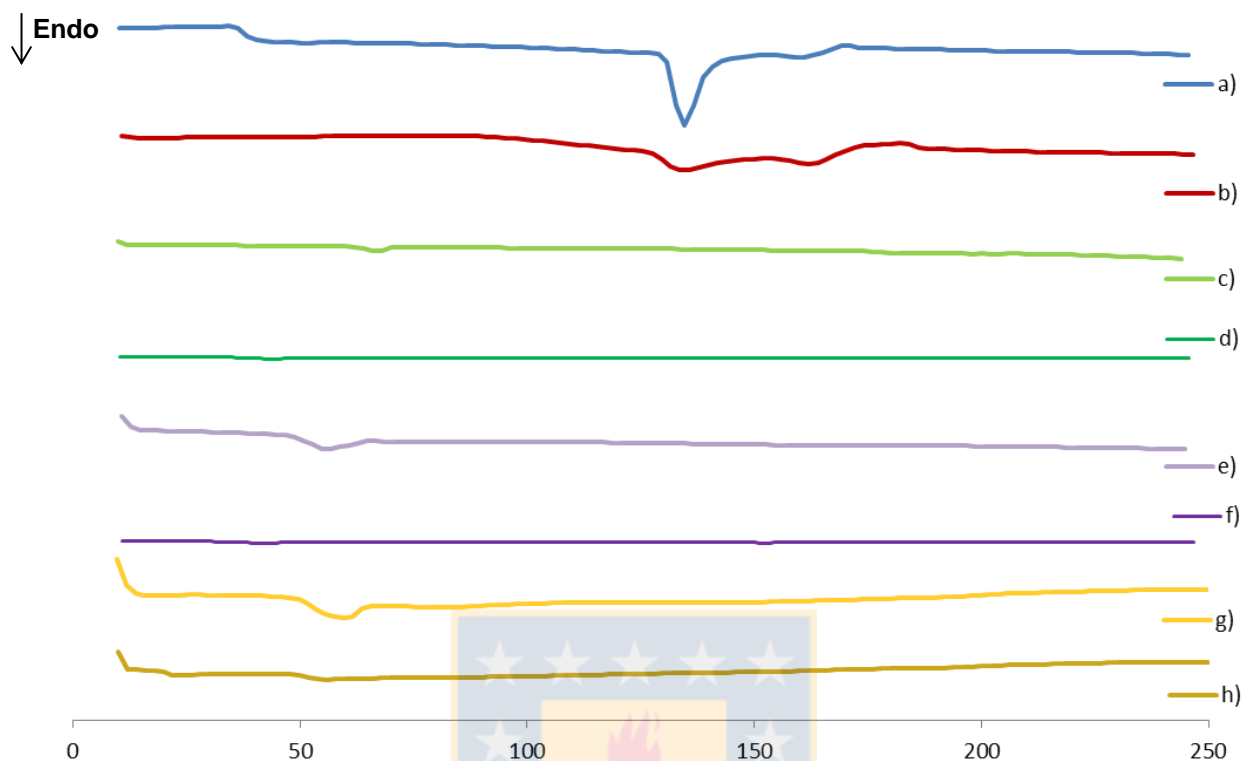


Figura 18: Termogramas de a) DPMX; b) DPMX irradiado; c) PLGA 50:50; d) PLGA 50:50 irradiado; e) Microesferas blancas; f) Microesferas blancas irradiadas; g) Microesferas cargadas con DPMX; h) Microesferas cargadas con DPMX irradiadas. Fuente: Elaboración propia.

En el caso de las micropartículas blancas, se observa un corrimiento de este pico (atribuido a la relajación de las cadenas poliméricas) hacia los 55,9 °C en el caso de las no irradiadas (termograma e); mientras que las irradiadas, a los 57,9°C y mucho menos notoria que las anteriores (termograma f). La Tg igualmente disminuyó hacia los 33,8 °C. La disminución de esta temperatura entre el polímero puro y las microesferas blancas, independientemente de la irradiación, se puede atribuir a una probable escisión radiolítica de las cadenas del polímero [92].

Un comportamiento similar observamos en las microesferas cargadas con DPMX. Tanto en las microesferas cargadas con DPMX irradiadas como en las no

irradiadas (termogramas h y g, respectivamente), es posible notar la ausencia del pico endotérmico del DPMX, lo cual puede deberse a la incorporación de fármaco cristalino en baja proporción en la matriz polimérica amorfa. Las T_g de ambas muestras también se encuentran por debajo de la del polímero puro, al igual que lo observado en las microesferas blancas y también se observa el proceso endotérmico de relajación de cadenas poliméricas, en temperaturas más bajas que las del PLGA puro. Tanto las microesferas blancas como las cargadas con DPMX muestran perfiles muy similares, confirmando el hecho de que el fármaco está incluido dentro de la matriz y que sus propiedades térmicas no se observan debido a una baja proporción de fármaco respecto a la masa de polímero. No obstante, la baja de la intensidad de los picos endotérmicos de relajación en las formulaciones irradiadas (microesferas blancas y cargadas) puede influir en la cinética de liberación del principio activo, por lo que se justifica la determinación de perfiles de liberación tanto pre como post irradiación.

3.3.3.- Espectroscopía Infrarroja

Al comparar el espectro infrarrojo de la muestra de PLGA, pre y post irradiación gamma, se puede observar que no hubo diferencias evidentes entre ambos (Figura 19). Se pueden observar las principales bandas, características del polímero, correspondientes a señales tipo estiramiento de grupos $-\text{CH}=\text{}$, $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$ entre los 3000 y 2700 cm^{-1} ; una gran banda de absorción del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de tipo estiramiento a los 1761,9 cm^{-1} ; luego entre los 1500 y 1250 cm^{-1} , varias bandas pequeñas y agudas de deformación de grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$, seguidas de bandas de aleteo entre los 1350 y 1150 cm^{-1} de $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}=\text{}$, mientras que dentro de esos mismos números de onda (1300 - 1150 cm^{-1}) se presentan bandas de estiramiento del C-O del éster formado entre las unidades glicólica y láctica [93, 94].

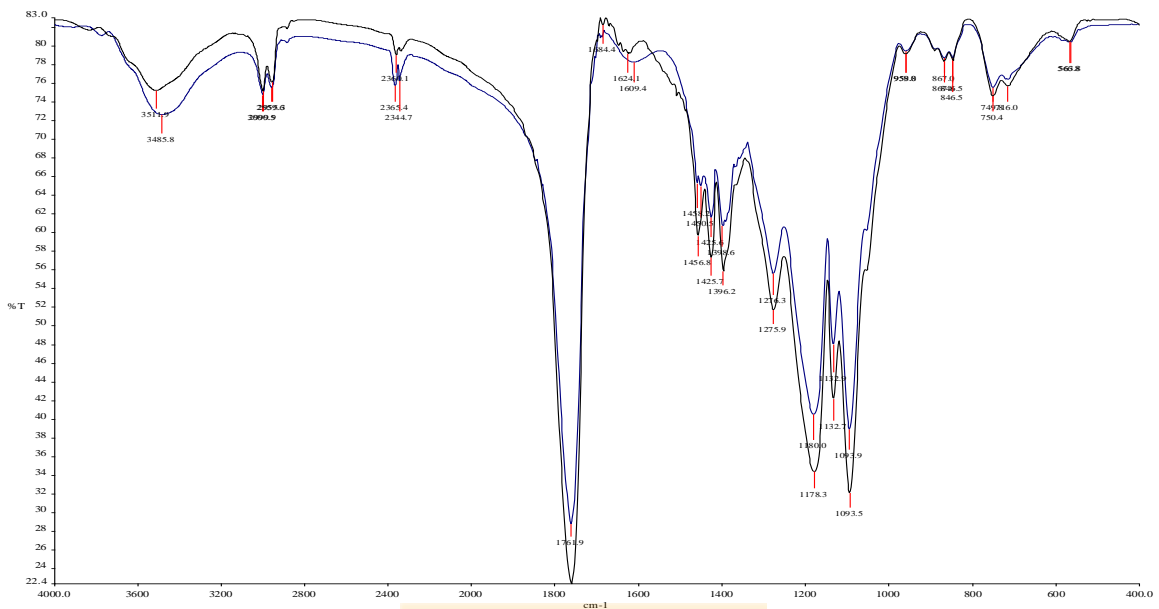


Figura 19: FT-IR de PLGA irradiado (azul) y PLGA no irradiado (negro)

Fuente: Elaboración propia.

En el caso del fármaco puro, tampoco hubo diferencias notables en cuanto a las bandas características de este luego de ser sometido a radiación gamma (Figura 20). En ambos espectros se observan las bandas principales de este compuesto: a los $3410,6 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a una vibración de estiramiento del grupo amino primario y junto a este, a los 3200 cm^{-1} . A los 2962 cm^{-1} se observa un pico correspondiente a un estiramiento de los grupos CH aromáticos y posteriormente se muestra un pico a los 1627 cm^{-1} que puede corresponder a flexión de amina primaria y otro a los 1592 cm^{-1} que se atribuyen a enlaces C=C. A los 1438 cm^{-1} se aprecia una banda de flexión de grupos $-\text{CH}_2$.

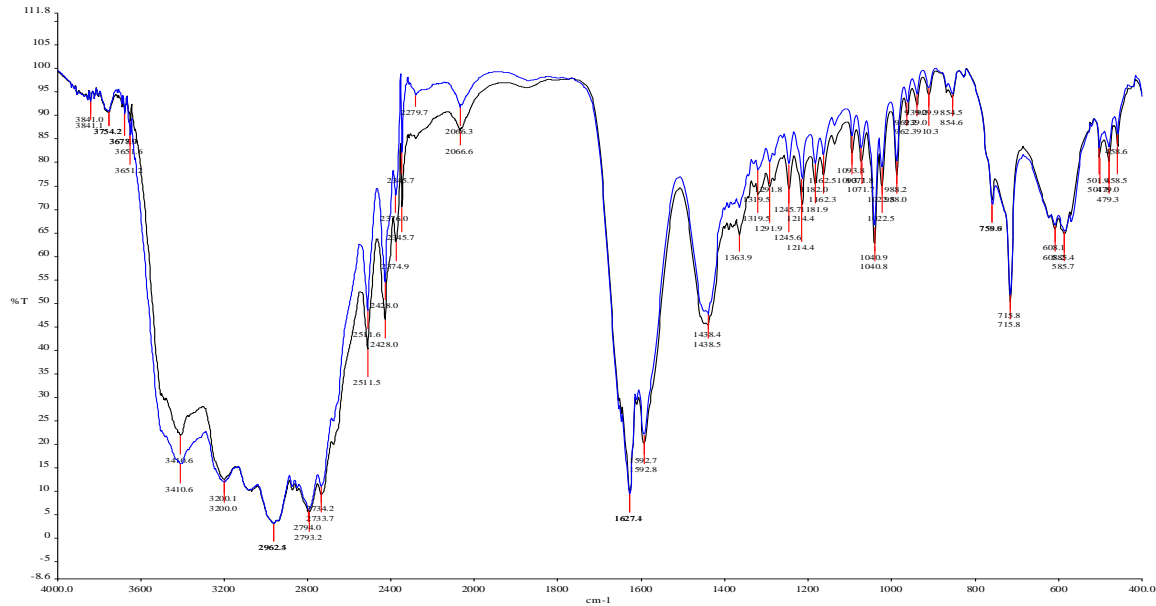


Figura 20: FT-IR: de DPMX irradiado (azul) y DPMX no irradiado (negro)

Fuente: Elaboración propia.

En el caso de los espectros observados en las muestras de microesferas blancas, tanto irradiadas como no irradiadas, se ve un ensanchamiento de la banda del grupo carbonilo a los 1760 cm^{-1} (Figura 21), manteniendo la mayoría de las bandas del polímero puro. Como estas muestras no contienen fármaco, se infiere que el PLGA puede haber sufrido algún tipo de modificación durante el proceso de formación de las microesferas. Una probable interacción con el surfactante (PVA) puede ocurrir a través de sus numerosos grupos -OH , los cuales pueden formar de manera parcial un enlace entre el H y el enlace éster del PLGA. La presencia del surfactante también puede reflejarse en otras regiones del espectro de las microesferas en la cuales también se ven diferencias respecto al polímero, por ejemplo, con el aumento de la intensidad de las bandas de flexión de -CH_2 , las cuales son muy abundantes en el PVA.

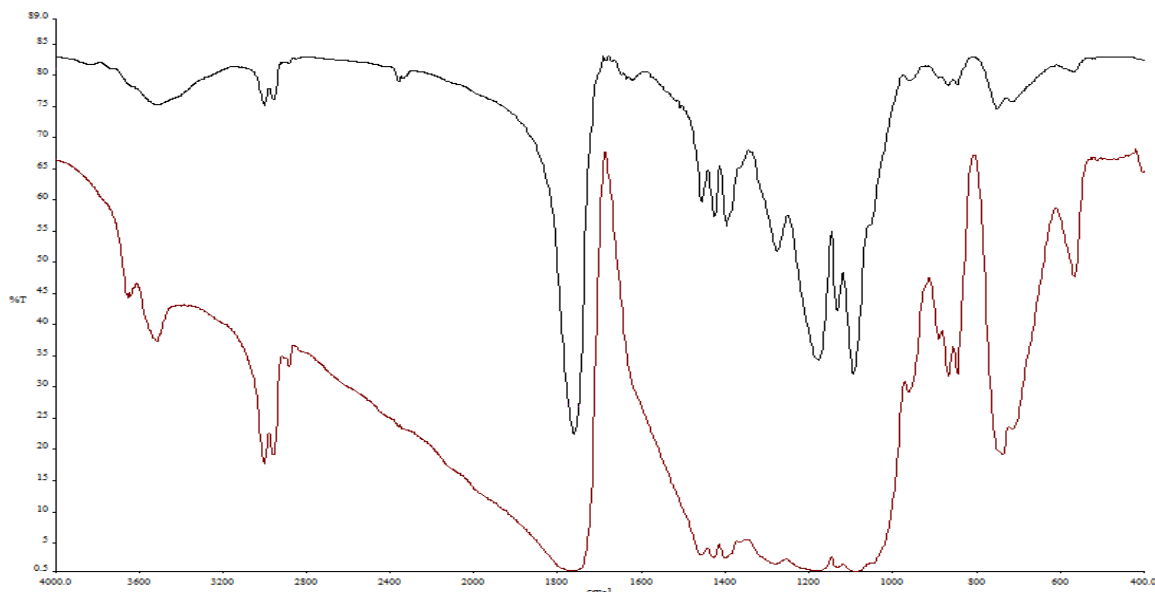


Figura 21: Comparación de espectros FTIR de PLGA puro irradiado (negro) y microesferas blancas irradiadas (rojo). Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, los espectros de las microesferas cargadas con DPMX tanto irradiadas como no irradiadas (Figura 22) no muestran una diferencia significativa entre ellas y respecto a las microesferas blancas. Tampoco destacan bandas características del fármaco, lo cual puede deberse a la baja proporción de fármaco encapsulado respecto del total de masa de polímero en las microesferas (carga ~ 2 %) y el DPMX, al estar incluido en la matriz polimérica, apantallaría el espectro del fármaco.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que las microesferas resultantes del proceso de microencapsulación emulsión/evaporación de solvente, quedan con residuos de PVA, sin embargo, la información no es suficiente para determinar si existe una real interacción química entre el polímero y el fármaco.

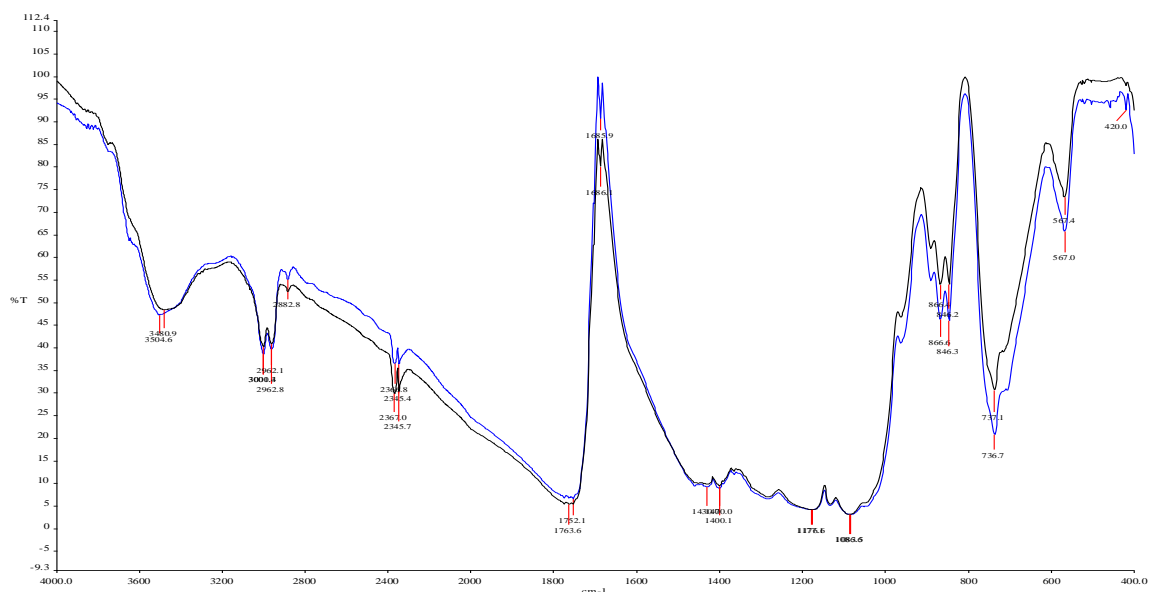


Figura 22: FT-IR de microesferas cargadas con DPMX irradiadas (negro) y microesferas cargadas con DPMX no irradiadas (azul).

Fuente: Elaboración propia.

3.4.- Evaluación de la cinética de liberación *in vitro*

Al comparar la cinética de liberación de las microesferas irradiadas con las no irradiadas ($n = 5$), se puede observar que a la primera hora de iniciado el estudio se produjo una liberación de un 39,5 % y un 32,8 %; respectivamente (Figura 23). Aunque no existe una diferencia significativa ($P > 0,05$) entre estos valores, sí se considera que el efecto burst es bastante alto en ambas muestras. Esto puede deberse a la presencia de poros en la superficie de las microesferas desarrolladas, los que pueden facilitar la difusión del fármaco encapsulado hacia el medio de liberación debido a sus características de solubilidad, afectando principalmente al principio activo ubicado cerca de la superficie [95].

Durante los días siguientes, se pudo observar una diferencia entre ambos perfiles, haciéndose notoria la liberación más rápida de las microesferas irradiadas, las cuales cedieron casi la totalidad del fármaco encapsulado (98,1 %) a los 14 días de iniciado el estudio.

En el caso de las microesferas no irradiadas, la cantidad de fármaco liberado a las dos semanas llegó a un 79,9%, liberando al día 30 un 95,0 %.

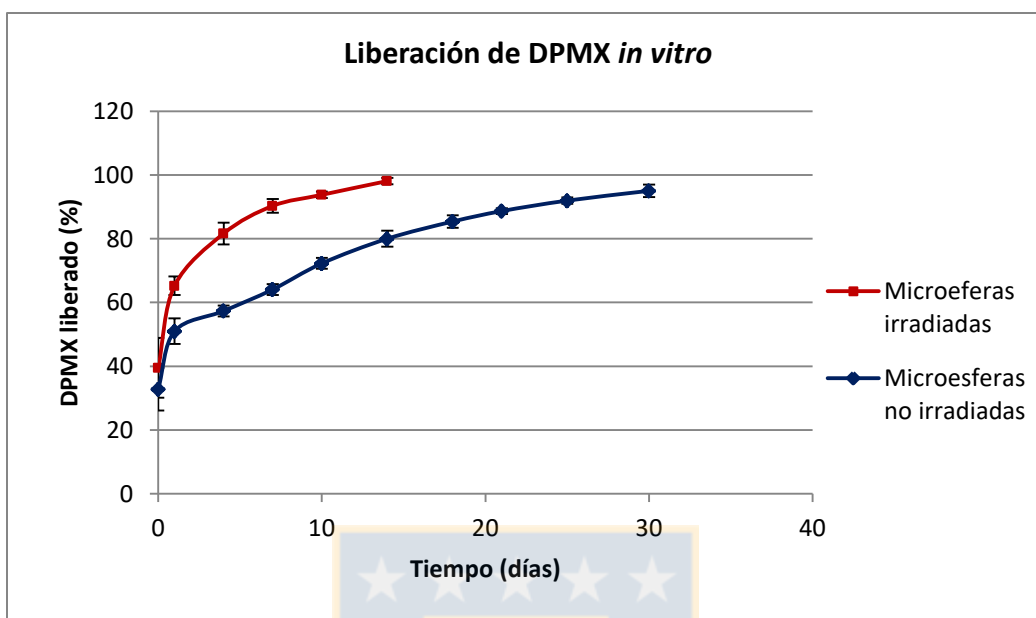


Figura 23: Perfil de liberación de DPMX desde las microesferas.

Fuente: Elaboración propia.

Ambos perfiles fueron comparados a través de los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) y además por un ANOVA de dos vías, obteniendo valores que comprueban estadísticamente que ambos perfiles son significativamente diferentes (Tabla 7).

Tabla 8: Comparación de los perfiles de liberación de las formulaciones

Parámetro	Valor obtenido	Valor de similitud
Factor de diferencia (f_1)	17	$f_1 \in [0,15]$
Factor de similitud(f_2)	45	$f_2 \in [50,100]$
ANOVA dos vías	$P < 0,0001$	$P > 0,05$

Fuente: Elaboración propia.

La diferencia en la liberación del principio activo en las microesferas post irradiación es un tema ampliamente discutido, ya que para sistemas de liberación controlada de administración parenteral, la radiación gamma es uno de los principales métodos de esterilización.

Existen estudios donde se señala que no se observan efectos significativos en la liberación *in vitro* del principio activo desde la matriz polimérica tras ser sometidas a la radiación gamma [96, 97]. Por otro lado, existen estudios que han señalado un efecto negativo de este tipo de radiación en la liberación, morfología y otras características relevantes de las formulaciones de liberación prolongada [89, 98, 99]. Se sabe que la radiación gamma puede causar una degradación radiolítica del polímero, la cual induce una división de las cadenas poliméricas dependiente de la dosis administrada, llevando finalmente a una disminución del peso molecular del PLGA [100]. Además, debido a la alta penetración de la radiación, esta puede incluso afectar al fármaco incluido en las microesferas, causando su degradación parcial.

En este caso, se observa que la irradiación gamma de las microesferas de DPMX modifica de forma significativa la encapsulación y la liberación *in vitro* del principio activo, por lo tanto, este procedimiento de esterilización no puede ser utilizado para su esterilización final. Por ello, es necesario realizar una esterilización previa de los componentes de la formulación o realizar el proceso de elaboración en condiciones asépticas.

4.- Evaluación de la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson

4.1.- Evaluación de peso corporal

En pacientes con EP, es muy frecuente observar pérdida de peso a medida que la enfermedad progresa. Esto se ha relacionado tanto con los síntomas motores, no motores y psicológicos (como cambios de ánimo, depresión y apatía) y directamente con la degeneración de nervios entéricos. Estos síntomas pueden, tanto de manera individual o en combinación, llevar a una disminución de la ingesta de alimentos o a un aumento del gasto energético, conduciendo finalmente a una pérdida de peso [101].

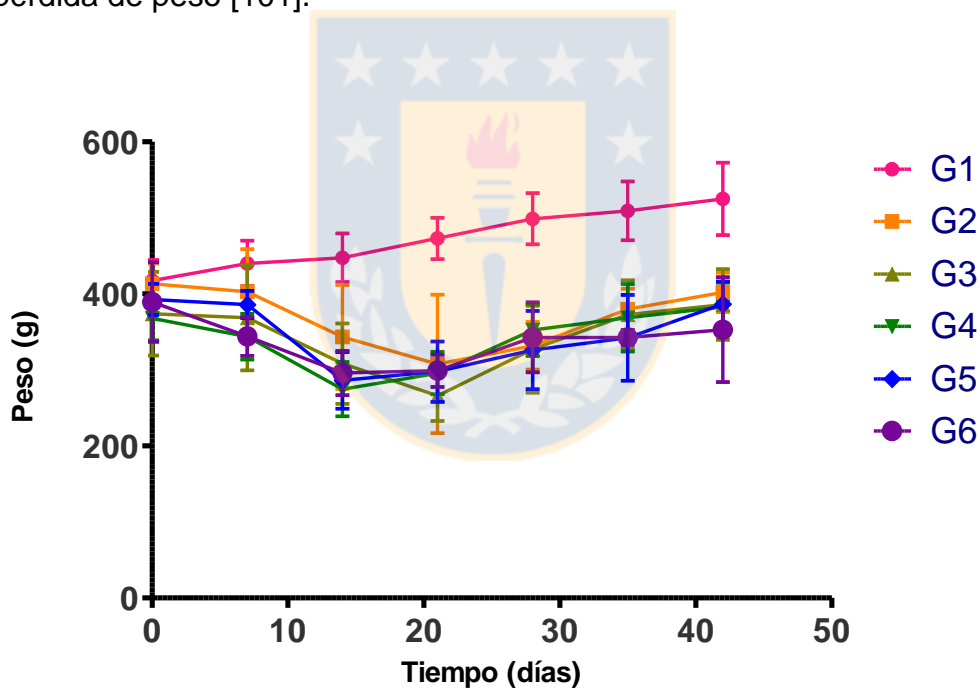


Figura 24: Evolución del peso corporal de los diferentes grupos de ratas Wistar

Fuente: Elaboración propia.

En el caso de las ratas estudiadas, se observó que en los grupos tratados con rotenona (G2 al G6) hubo una diferencia significativa ($P < 0,0001$) respecto al peso promedio del grupo tratado sólo con vehículo (G1) (Figura 24). Cualitativamente, se observó que a los 7 días de iniciado el tratamiento en las ratas Wistar comenzó a notarse la disminución de la velocidad de movimiento (hipokinesia) y una menor ingesta de alimento y agua en los grupos tratados con rotenona. Además, en los grupos G2 y G3, se observaron cambios físicos como inestabilidad postural, secreciones oculares y/o nasales y apariencia del pelo (color y textura), comparado con las ratas del grupo control G1 y las tratadas con la formulación diseñada (G4 y G5). La pérdida de peso en modelos murinos tratados con rotenona se ha observado en algunos estudios [102, 103], mientras que en otros se indica que no existe una pérdida de peso significativa. Esto puede deberse a la vía de administración y a la forma farmacéutica en la que se aplicó la rotenona, ya que suele ser a la forma de solución vía intraperitoneal donde sí se observa la disminución de peso, mientras que en los que no, se encuentran estudios en los que se utilizaron microesferas de rotenona [104] y otros en los que también se utilizó el compuesto en solución [105] por lo que otro factor a considerar puede ser el tipo de rata (línea), que pueden tener una mayor o menor susceptibilidad a efectos adversos de la rotenona.

4.2.-Test de akinesia

A partir de los primeros siete días de estudio, se observó una marcada akinesia (es decir, dificultad de movimiento) en los animales tratados con administración crónica de rotenona (grupos G2 y G3). Esto se comprobó a los 15 días, ya que el tiempo de latencia aumentó, especialmente en el grupo G3, comparados con los animales control (G1) (Figura 25).

Comparando la evolución de los diferentes grupos a lo largo del estudio, se pudo observar que durante los primeros días la diferencia entre los tiempos de latencia

entre el grupo control G1 y el resto de los grupos fue mucho más notoria a los primero 15 días, y luego al día 30 y 45 esta diferencia aparentemente se atenuó.

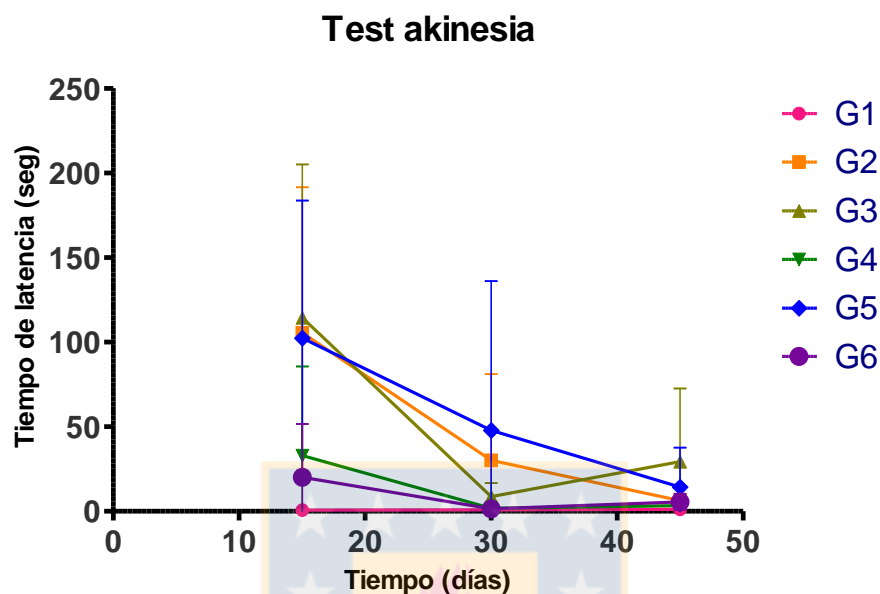


Figura 25: Evolución de tiempos de latencia de ratas en test de akinesia

Fuente: Elaboración propia.

Con respecto al último día de estudio (día 45), se pudo observar que la administración de DPMX encapsulado a la dosis más alta ensayada (1,0 mg/kg/día cada 15 días, G4) originó una disminución en el tiempo de latencia con respecto a los animales tratados con rotenona (G2) y microesferas no cargadas (G3). Para los otros dos grupos que también recibieron DPMX (G5 y G6), los tiempos de latencia fueron diferentes a los obtenidos en el grupo control (G1), siendo la disminución del tiempo de latencia menos marcada en el grupo G5. Estos resultados permiten señalar que la administración de microesferas de DPMX a la dosis más alta ensayada (1,0 mg/kg cada 15 días, G4) produjo una disminución moderada de la aquinesia, sin embargo, esta fue mayor que la lograda con la misma dosis de DPMX cuando esta es administrada en solución (Figura 26).

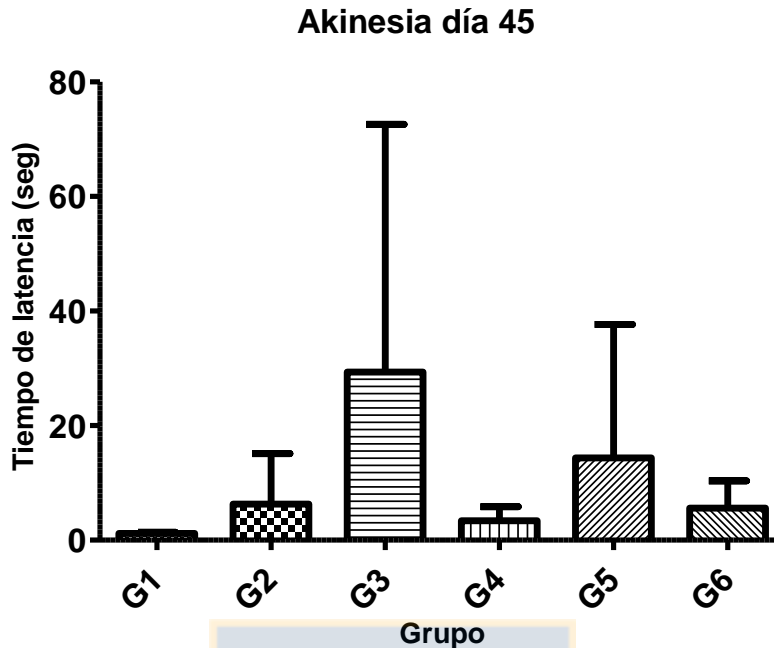


Figura 26: Comparación tiempo de latencia de ratas en test de akinesia día 45.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.- Test de Catalepsia

Al analizar la evolución de la catalepsia en el tiempo (Figura 27), se pudo observar que los grupos G1, G4 y G6 mantuvieron tiempos de latencia bastante similares y constantes durante los 45 días de estudio. Las diferencias entre los grupos señalados con los grupos G2, G3 y G5 se ven de manera más clara en este test en comparación al de akinesia. En el test de catalepsia en grilla, el grupo G5 mostró una disminución paulatina del tiempo de latencia, al igual que el grupo G2, siendo aun así, tiempos mayores a los de los grupos control (G1), G4 y G6.

Test catalepsia grilla

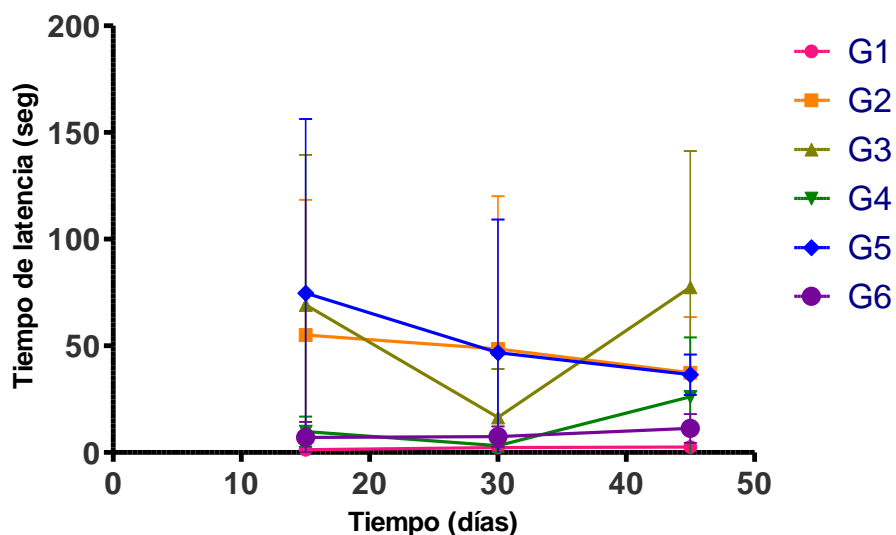


Figura 27: Evolución de tiempo de latencia en test de catalepsia en grilla.

Fuente: Elaboración propia.

En el caso del test de catalepsia en barra, se pudo observar una evolución similar entre el grupo control G1 y G4, presentándose una ligera diferencia respecto al grupo G6 en el test en grilla (Figura 28). Sin embargo, en esta variante del test de catalepsia, se observan mayores tiempos de latencia en el grupo G5, al cual se le administró la dosis baja de microesferas cargadas con DPMX.

La heterogenicidad y alta dispersión de los datos durante los 45 días de estudio sólo permite sacar una conclusión clara al término de este, donde se observó que la administración crónica de rotenona provocó al final del ensayo (catalepsia en grilla) un aumento significativo del tiempo de latencia del grupo G3 en comparación con el grupo control tratado únicamente con el vehículo ($P < 0,05$) (Figura 29). Los resultados de catalepsia en barra muestran también diferencias significativas ($P < 0,05$) cuando se compara el tiempo de latencia del grupo control (G1) con el obtenido en los animales tratados con rotenona (G2) (Figura 30).

Test catalepsia barra

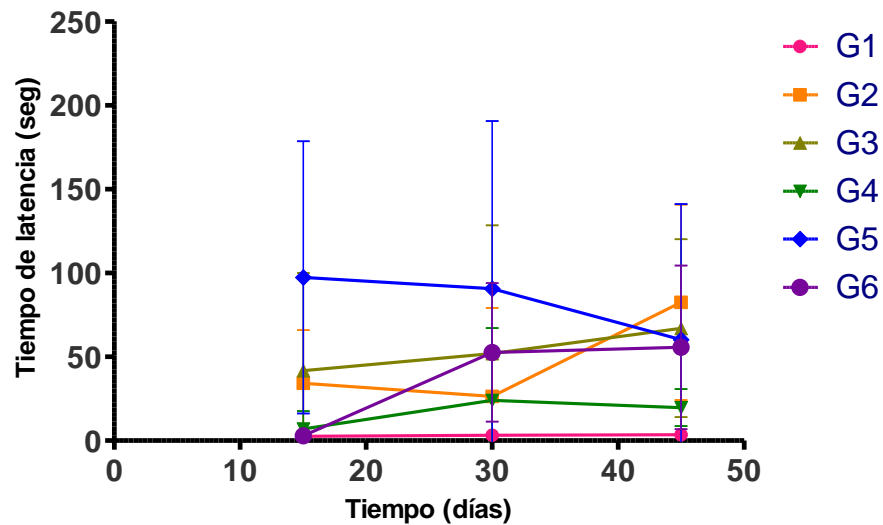


Figura 28: Evolución de tiempo de latencia en ratas en test de catalepsia en barra.

Fuente: Elaboración propia.

Todos los animales que recibieron DPMX, ya sea en microesferas de PLGA o en solución (G4, G5 y G6), presentaron una disminución del tiempo de latencia con respecto al grupo tratado solo con rotenona (G2). Esta disminución fue especialmente marcada en el grupo G4, en el test de grilla, se redujo fuertemente el tiempo de latencia en comparación con el grupo G2. Además, cabe señalar que el tiempo de latencia obtenido en el grupo G4 no difiere significativamente del valor obtenido en el grupo control (G1).

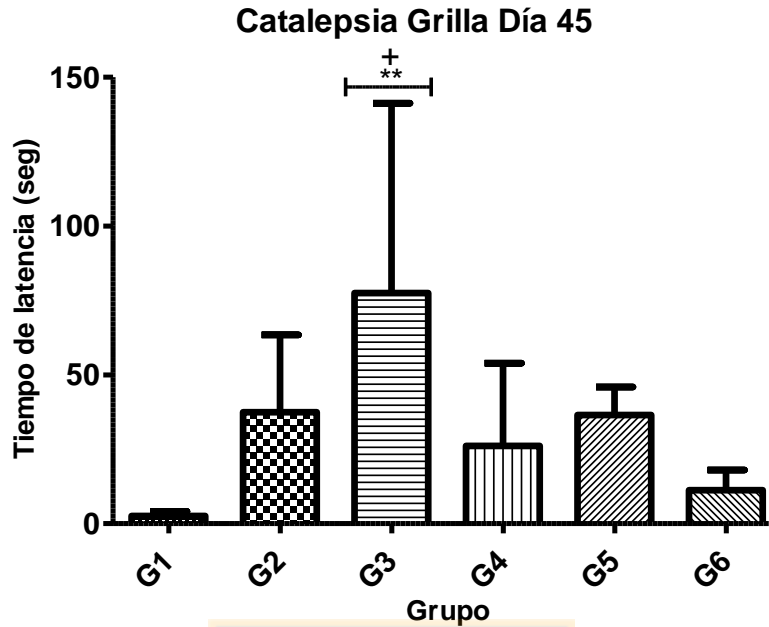


Figura 29: Comparación de tiempo de latencia en test de catalepsia grilla al día 45 de estudio (** diferencia muy significativa respecto a G1, + diferencia significativa frente a G6). Fuente: Elaboración propia.

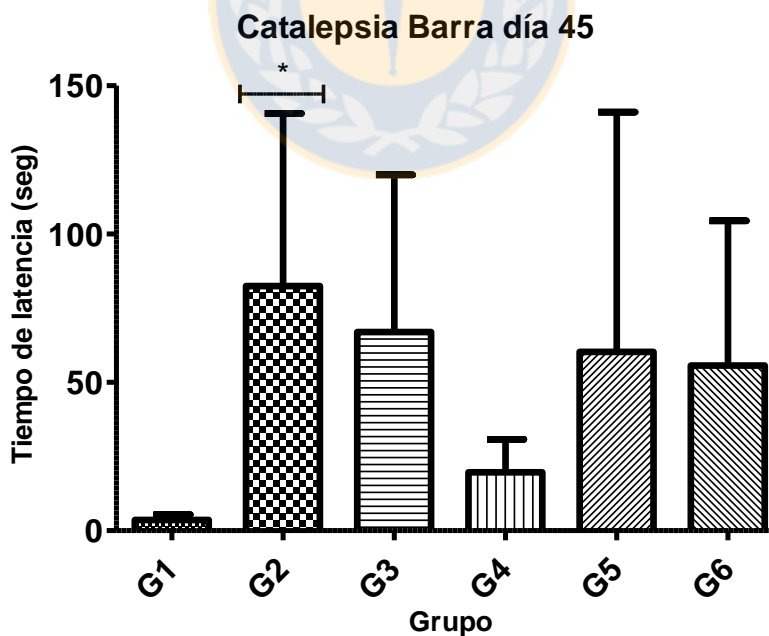


Figura 30: Comparación de tiempo de latencia en test de catalepsia barra al día 45 de estudio (* diferencia significativa $P < 0,05$ versus G1) Fuente: Elaboración propia

4.4.- Test de natación

Debido a que la capacidad para nadar de los animales tratados con rotenona (1,5 mg/kg/día, G2 y G3) se redujo de forma marcada en comparación con los animales del grupo control (G1) ($P < 0,05$), solo fue posible llevar a cabo el experimento durante 1,5 minutos. A pesar de ello, durante ese breve lapso fue posible observar que la habilidad de las ratas de los grupos G2 y G3 para moverse dentro del agua disminuyó de forma muy notoria con respecto al grupo control, alcanzando puntuaciones de 1,0 o inferiores, frente a los 3 puntos alcanzados por el grupo control (Figura 31). Cuando los animales recibieron el tratamiento con DPMX encapsulado en microesferas de PLGA o en solución, se observó una marcada mejoría en las puntuaciones del test de natación a lo largo del periodo de estudio.

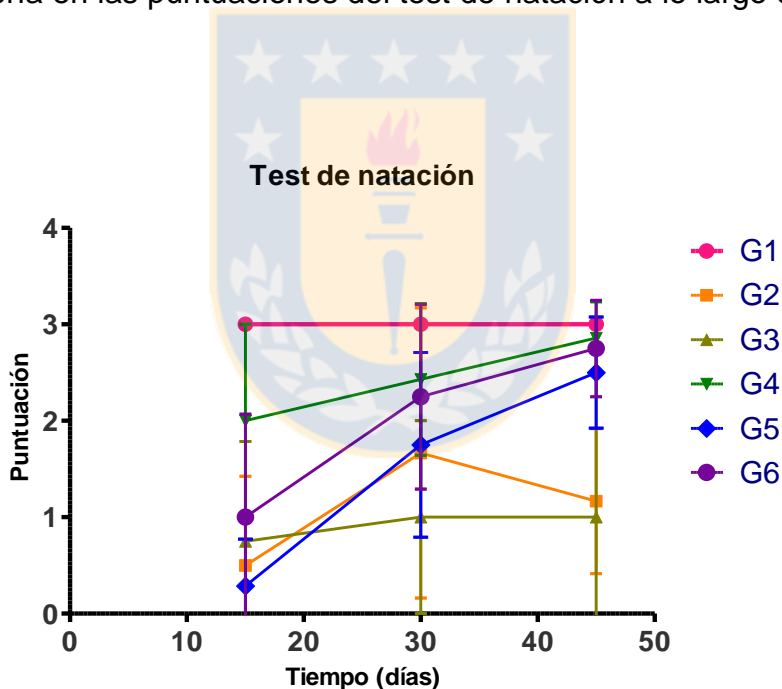


Figura 31: Evolución de puntuaciones en test de natación

Fuente: Elaboración propia.

Así, a los 45 días las puntuaciones medias del test de natación fueron $\geq 2,0$ para todos los animales que recibieron DPMX (Figura 32), donde además de observarse las diferencias altamente significativas entre los grupos G2 y G3 respecto al grupo control, también se observaron diferencias significativas entre

estos mismos grupos respecto al grupo G4, el cual recibió la dosis más alta de microesferas de DPMX y también respecto del grupo G6.

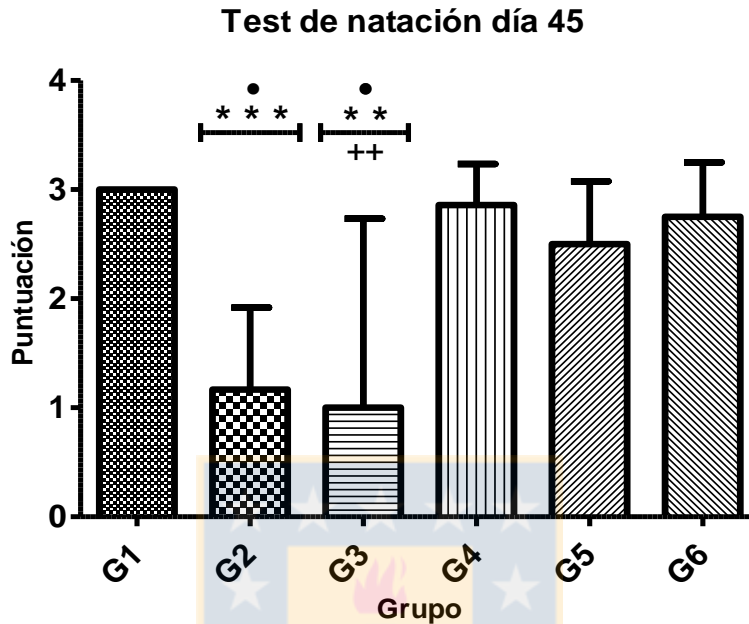


Figura 32: Comparación de puntuaciones en test de natación en día 45 de estudio. (** diferencia muy significativa frente a G1, *** diferencia altamente significativa frente a G1; ++ diferencia muy significativa frente a G4; • diferencia significativa frente a G6). Fuente: Elaboración propia.

Como fue señalado anteriormente, los modelos animales con rotenona tiene como principal ventaja la similitud con la patogénesis y patología de la EP idiopática, además de ser considerados como ideales para probar nuevas terapias contra la enfermedad debido al curso crónico de esta.

La rotenona tiene la capacidad de inhibir el complejo I de la cadena de electrones mitocondrial, bloqueando la transferencia de electrones en la nicotinamida adenina dinucleótido diaforasa-quinona (NADH-Q) reductasa, evitando la utilización de nicotinamida adenina dinucleotide diaphorase (NADH) como sustrato en fosforilación oxidativa. Esto se traduce en un bloqueo de la respiración celular, un

consecuente estrés oxidativo y finalmente la muerte celular [106]. La relación de la rotenona con la EP se debe a que las neuronas dopaminérgicas son especialmente vulnerables al inhibidores del complejo I y se ha observado que el deterioro de la producción de ATP debido a tal inhibición, interrumpe los gradientes iónicos requeridos para la el transporte de neurotransmisores transmembrana [107]. A causa de ello, se pueden observar los efectos motores causados por la disminución de la actividad dopaminérgica en las ratas tratadas únicamente con rotenona (G2), evidenciados en los tests de akinesia y catalepsia.

Es necesario señalar que las pruebas realizadas *in vivo* para evaluar los síntomas motores inducidos por rotenona difieren, además de la metodología, en la interpretación que se da a los resultados [83]. La akinesia es considerada un síntoma que se presenta de forma aguda en el animal, es decir, que se presentan en un corto plazo. En el caso del test de natación, se puede considerar que los posibles efectos en el desempeño del animal al nadar son más bien crónicos, ya que pueden aparecer de forma más lenta ya que se relaciona con la depleción de dopamina estriatal [108]. Así, el test de natación se puede utilizar tanto para evaluar la eficacia neuroprotectora o restauradora de las neuronas dopaminérgicas y su función, como también pueden relacionarse con síntomas no motores, en este caso particular, la depresión ya que existe evidencia de que los agonistas dopaminérgicos D₂/D₃ tienen efectos antidepresivos [109, 110].

A pesar de ello, el efecto del pramipexol en este estudio fue evidente al comparar el comportamiento de las ratas tratadas con las formulaciones de DPMX con las ratas que no recibieron este tratamiento. Las ratas tratadas con la formulación de DPMX con la dosis más elevada mejoraron sus tiempos de latencia y puntuaciones en el test de natación. El efecto del fármaco en el desempeño motor de los animales en estudio se puede atribuir a su acción directa en los receptores dopaminérgicos post sinápticos, sin embargo, también sugieren un posible rol neuroprotector [111] e incluso neuroregenerador, el cual ha sido materia de estudio por diversos investigadores [112].

CONCLUSIONES

Se elaboraron microesferas biodegradables de PLGA cargadas con DPMX por la técnica de emulsión / evaporación del solvente, a partir de una emulsión O/W. Dichas microesferas presentaron características de composición y tamaño adecuados para su uso parenteral. Estas liberaron casi el 100% del fármaco en forma constante durante 30 días, por lo que se puede decir que la formulación diseñada se comportó como un sistema reservorio de liberación controlada de fármaco.

Mediante la herramienta del diseño de experimentos fue posible optimizar la formulación de microesferas de PLGA cargadas con DPMX, obteniendo las mejores características de tamaño, EE y liberación del principio activo.

La esterilización de las microesferas de PLGA cargadas con DPMX mediante su exposición a una dosis de radiación gamma de 25 KGy, produjo cambios significativos en el perfil de liberación del fármaco desde las microesferas. En consecuencia, el proceso de irradiación gamma no es adecuado para llevar a cabo la esterilización final de la formulación.

Se logró desarrollar un modelo animal de Parkinson mediante la administración de 1,5 mg/kg/día de rotenona por vía intraperitoneal durante 45 días. El modelo resultó adecuado para evaluar la eficacia de la formulación de microesferas de DPMX optimizada.

Los resultados obtenidos en las pruebas de catalepsia, akinesia y natación demuestran la eficacia del DPMX en el retraso de la sintomatología de la enfermedad inducida. Esto fue observado principalmente con la dosis más alta de la formulación seleccionada (cantidad equivalente a 1 mg/kg/día de DPMX administrada por vía intraperitoneal cada 15 días durante 45 días), la cual mostró

ser igual de eficaz que la administración de la misma dosis administrada diariamente en solución salina.

Las características de este nuevo sistema de microesferas biodegradables de PLGA hacen viable la realización de nuevos ensayos, para el estudio de una eventual administración parenteral de DPMX en la enfermedad de Parkinson en humanos, ya que estas formulaciones de liberación sostenida pueden promover la adherencia del paciente al tratamiento. Por ello, constituyen una buena alternativa a la farmacoterapia que se utiliza actualmente para combatir esta patología



BIBLIOGRAFÍA

1. Braak, H. and K. Del Tredici, *Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Parkinson's Disease*. 2009. 1.
2. García, S., et al., *Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson*. Med Int Mex, 2008. 24: p. 28-37.
3. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. 5(6): p. 525-35.
4. Nussbaum, R.L. and C.E. Ellis, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2003. 348(14): p. 1356-64.
5. Aminoff, M.J. and R.B. Daroff, *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 2003: Elsevier Science Inc.
6. *Parkinson's prevalence in the United Kingdom*. 2009 [Acceso el 18/01/2013]; Disponible en: http://www.parkinsons.org.uk/sites/default/files/parkinsonsprevalenceuk_0.pdf.
7. Hauser, S., A. Fauci, and D. Kasper, *Harrison's Neurology in Clinical Medicine*. Segunda edición ed. 2010: McGraw-Hill Medical.
8. Baker, M.G. and L. Graham, *The journey: Parkinson's disease*. BMJ, 2004. 329(7466): p. 611-614.
9. Dorsey, E.R., et al., *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. Neurology, 2007. 68(5): p. 384-6.
10. Kowal, S.L., et al., *The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States*. Mov Disord, 2013. 28(3): p. 311-8.
11. Gustavsson, A., et al., *Cost of disorders of the brain in Europe 2010*. Eur Neuropsychopharmacol, 2011. 21(10): p. 718-79.
12. Nicholson, G., A.C. Pereira, and G.M. Hall, *Parkinson's disease and anaesthesia*. Br J Anaesth, 2002. 89(6): p. 904-16.
13. Brunton, L., J. Lazo, and K. Parker, *Goodman&Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Undécima edición ed. 2007: McGraw-Hill.
14. Dunnett, S.B. and A. Bjorklund, *Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease*. Nature, 1999. 399(6738 Suppl): p. A32-9.
15. Gerfen, C.R., *Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways*. Trends Neurosci, 2000. 23(10 Suppl): p. S64-70.
16. Spillantini, M., et al., *alpha-Synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. 388: p. 839 - 840.
17. Parkkinen, L., et al., *Disentangling the Relationship between Lewy Bodies and Nigral Neuronal Loss in Parkinson's Disease*. J Parkinsons Dis, 2011. 1(3): p. 277-286.

18. Rodriguez, M.C., J.A. Obeso, and C.W. Olanow, *Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection*. *Ann Neurol*, 1998. 44(3 Suppl 1): p. S175-88.
19. Plaitakis, A. and P. Shashidharan, *Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J Neurol*, 2000. 247 Suppl 2: p. II25-35.
20. Vaarmann, A., et al., *Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity*. *Cell Death Dis*, 2013. 4: p. e455.
21. Zhou, C., Y. Huang, and S. Przedborski, *Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: p. 93-104.
22. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2003. 53(S3): p. S26-S38.
23. Hwang, O., *Role of oxidative stress in Parkinson's disease*. *Exp Neurobiol*, 2013. 22(1): p. 11-7.
24. Cory-Slechta, D.A., et al., *Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype*. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(9): p. 1263-70.
25. Santner, A. and V.N. Uversky, *Metalloproteomics and metal toxicology of [small alpha]-synuclein*. *Metallomics*, 2010. 2(6): p. 378-392.
26. Meiser, J., D. Weindl, and K. Hiller, *Complexity of dopamine metabolism*. *Cell Commun Signal*, 2013. 11(1): p. 1-18.
27. Schulz, J.B., *Update on the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J Neurol*, 2008. 255 Suppl 5: p. 3-7.
28. Trinh, K., et al., *Decaffeinated coffee and nicotine-free tobacco provide neuroprotection in Drosophila models of Parkinson's disease through an NRF2-dependent mechanism*. *J Neurosci*, 2010. 30(16): p. 5525-32.
29. Ritz, B., et al., *Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2007. 64(7): p. 990-7.
30. Hoehn, M. and M. Yahr, *Parkinsonism: onset, progression and mortality*. *Neurology*, 1967. 17(5): p. 427-442.
31. Lees, A.J., J. Hardy, and T. Revesz, *Parkinson's disease*. *Lancet*, 2009. 373(9680): p. 2055-66.
32. Marjama-Lyons, J. and W. Koller, *Tremor-predominant Parkinson's disease. Approaches to treatment*. *Drugs Aging*, 2000. 16(4): p. 273-8.
33. Muslimovic, D., et al., *Determinants of disability and quality of life in mild to moderate Parkinson disease*. *Neurology*, 2008. 70(23): p. 2241-7.
34. Lang, A.E. and A.M. Lozano, *Parkinson's Disease*. *N Engl J Med*, 1998. 339(15): p. 1044-1053.
35. Chou, K.L., et al., *Sialorrhea in Parkinson's disease: a review*. *Mov Disord*, 2007. 22(16): p. 2306-13.
36. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. *Lancet Neurol*, 2006. 5(3): p. 235-45.
37. Rajput, A.H., et al., *Timely levodopa (LD) administration prolongs survival in Parkinson's disease*. *Park Relat Dis*, 1997. 3(3): p. 159-165.
38. Stroke, N.I.o.N.D.a. *Enfermedad de Parkinson: Esperanza en la Investigación*. [Acceso el 24/01/2013]; Disponible en:

http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm#farmacologicos.

39. Cao, X.B., et al., *Mechanism of over-activation in direct pathway mediated by dopamine D(1) receptor in rats with levodopa-induced dyskinesia*. *Neurosci Bull*, 2006. 22: p. 159–164.
40. Antonini, A., et al., *Duodenal levodopa infusion for advanced Parkinson's disease: 12-month treatment outcome*. *Mov Disord*, 2007. 22(8): p. 1145-9.
41. Holloway, R.G., et al., *Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial*. *Arch Neurol*, 2004. 61(7): p. 1044-53.
42. Moller, J.C., et al., *Long-term efficacy and safety of pramipexole in advanced Parkinson's disease: results from a European multicenter trial*. *Mov Disord*, 2005. 20(5): p. 602-10.
43. Zanettini, R., et al., *Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease*. *N Engl J Med*, 2007. 356(1): p. 39-46.
44. ParkinsonStudy, GroupCALM, and CohortInvestigators, *Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2009. 66(5): p. 563-70.
45. Fedorova, N.V. and I.P. Chigir, *Use of the dopamine receptor agonist Mirapex in the treatment of Parkinson's disease*. *Neurosci Behav Physiol*, 2007. 37(6): p. 539-46.
46. Alonso Cánovas, A., et al., *Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson*. *Neurología*, 2011(0).
47. Le, W.D., et al., *Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection*. *J Neural Transm*, 2000. 107(10): p. 1165-73.
48. Abramova, N.A., et al., *Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma*. *J Neurosci Res*, 2002. 67(4): p. 494-500.
49. Izumi, Y., et al., *Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity*. *Eur J Pharmacol*, 2007. 557(2-3): p. 132-40.
50. Chau, K.-Y., J.M. Cooper, and A.H.V. Schapira, *Pramipexole Reduces Phosphorylation of α -Synuclein at Serine-129*. *J Mol Neurosci*, 2013. 51(2): p. 573-580.
51. Antonini, A., et al., *Role of pramipexole in the management of Parkinson's disease*. *CNS Drugs*, 2010. 24(10): p. 829-41.
52. Moffat, A., M. Osselton, and B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Forth edition ed. 2011: Pharmaceutical Press.
53. Eisenreich, W., et al., *Pramipexole extended release: a novel treatment option in Parkinson's disease*. *Parkinsons Dis*, 2010. 2010: p. 612–619.
54. Hametner, E.M., K. Seppi, and W. Poewe, *Role and clinical utility of pramipexole extended release in the treatment of early Parkinson's disease*. *Clin Interv Aging*, 2012. 7: p. 83-8.

55. Olanow, C.W., J.A. Obeso, and F. Stocchi, *Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications*. *Lancet Neurol*, 2006. 5(8): p. 677-87.
56. Román, M., J. Castillo, and V. Picciteli, *Caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y fluorescencia láser confocal*. *Rev. Iberoamer. Polím*, 2008. 9: p. 526-537.
57. Sujith, O.K. and C. Lane, *Therapeutic Options for Continuous Dopaminergic Stimulation in Parkinson's Disease*. *Ther Adv Neurol Disord.*, 2009. 2(2): p. 105-113.
58. Olanow, C.W., J.A. Obeso, and F. Stocchi, *Drug insight: Continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease*. *Nat Clin Pract Neurol.*, 2006. 2(7): p. 382-392.
59. Timpka, J., U. Mundt-Petersen, and P. Odin, *Continuous dopaminergic stimulation therapy for Parkinson's disease recent advances*. *Curr Opin Neurol*, 2016. 29(4): p. 474-479.
60. Xie, C., et al., *Continuous dopaminergic stimulation (CDS)-based treatment in Parkinson's disease patients with motor complications: A systematic review and meta-analysis*. *Sci Rep*, 2014. 4: p. 2-9.
61. Lv, Q. and B. Zhang, *Application of the concept of continuous dopaminergic stimulation for the management of Parkinson's disease* *Neurosci Bull*, 2013. 29(5): p. 661–669.
62. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream*. *Science*, 2004. 303(5665): p. 1818-22.
63. Singh, M., et al., *Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery*. *Res Pharm Sci*, 2010. 5(2): p. 65- 77.
64. Sáez, V., et al., *Liberación controlada de fármacos: Micropartículas*. *Rev Iberoam Polím*, 2004. 5(2): p. 87-101.
65. Orriols, A., et al., *Microencapsulación: aplicaciones, métodos y caracterización*. *Ciencia Tecnol Pharm*, 2005. 15(4): p. 169-176.
66. Jyothi, N.V., et al., *Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency*. *J Microencapsul*, 2010. 27(3): p. 187-97.
67. Kiyoyama, S., et al., *Preparation of microcapsules and control of their morphology*. *J Microencapsul*, 2003. 20(4): p. 497-508.
68. Kumar, R. and M. Palmieri, *Points to consider when establishing drug product specification for parenteral microspheres*. *AAPS J*, 2010. 12: p. 27-32.
69. Park, J.H., M. Ye, and K. Park, *Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs*. *Molecules*, 2005. 10(1): p. 146-61.
70. Visscher, G.E., et al., *Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules*. *J Biomed Mater Res*, 1985. 19(3): p. 349-65.
71. Tamber, H., et al., *Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(3): p. 357-76.
72. Sáez, V., E. Hernández, and C. Peniche, *Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas*. *Biotechnol Apl*, 2007. 24: p. 98-107.

73. Singh, B., R. Kumar, and N. Ahuja, *Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I: fundamental aspects*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2005. 22(1): p. 27-105.
74. Singh, B., et al., *Developing micro-/nanoparticulate drug delivery systems using "design of experiments"*. Int J Pharm Investig, 2011. 1(2): p. 75-87.
75. Fuentes, C., C. Von Plessing, and M. Fernández, *Desarrollo y evaluación de microesferas biodegradables para la liberación prolongada de pramipexol*. Rev Farmacol Chile, 2014. 7(2): p. 25-32.
76. Fuentes, C., *Nueva formulación de pramipexol para el tratamiento del Parkinson*, Facultad de Farmacia, 2014, Universidad de Concepción.
77. Toguchi, H., *Sterility assurance of microspheres*. J Control Release, 1999. 62(1-2): p. 51-5.
78. Burgess, D., *Injectable dispersed systems: formulation, processing and performance*. 1° edición ed. 2007: Informa Healthcare USA Inc.
79. Agrawal, C.M., et al., *Elevated Temperature Degradation of a 50:50 Copolymer of PLA-PGA*. Tissue Eng., 2007. 3(4): p. 345-352.
80. Duty, S. and P. Jenner, *Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease*. Br J Pharmacol, 2011. 164(4): p. 1357-1391.
81. Buchanan, K., et al., *Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching*. Anim Behav, 2012. 83: p. 301-309.
82. ICLAS. *Harmonization of guidance on ethical review and training* [Acceso el 20-marzo-2017], Disponible en: <http://iclas.org/wp-content/uploads/2012/07/Ethical-review-training-article-for-Laboratory-Animals-Official-DOC-Juin-2010.pdf>.
83. Brooks, S.P. and S.B. Dunnett, *Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide*. Nat Rev Neurosci, 2009. 10(7): p. 519-29.
84. Zhang, Y., et al., *DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles*. AAPS J., 2010. 12(3): p. 263-271.
85. Rosca, I.D., F. Watari, and M. Uo, *Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation*. J Control Release, 2004. 99(2): p. 271-80.
86. Nema, S. and J. Ludwig, *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*. 3 ed. Vol. 3. 2010, London: London: Informa Healthcare.
87. Abuhanoglu, G. and A.Y. Ozer, *Radiation sterilization of new drug delivery systems*. Interv Med Appl Sci, 2014. 6(2): p. 51-60.
88. Rincón, A., et al., *Influencia de la radiación gamma como método de esterilización sobre el polímero poli VPAVG (Valina-Prolina-Alanina-Valina-Glicina)*. INHRR, 2009. 40(1).
89. Dorati, R., et al., *The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin*. J Control Rel, 2005. 107(1): p. 78-90.
90. Volland, C., M. Wolff, and T. Kissel, *The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres*. J Control Rel, 1994. 31(3): p. 293-305.
91. Pawar, S.M., et al., *Establishment of inherent stability of pramipexole and development of validated stability indicating LC–UV and LC–MS method*. J Pharm Anal, 2013. 3(2): p. 109-117.

92. Montanari, L., et al., *Gamma irradiation effects on poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres*. J. Contr. Rel., 2001. 75: p. 317.
93. Larkin, P., *IR and Raman Spectroscopy: Principles and Interpretation*. San Diego ed. 2011: Elsevier.
94. Avila Carvalho, C., et al., *Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer*. J Biomater Nanobiotechnol, 2012. 3(2): p. 208-225.
95. Yeo, Y. and K. Park, *Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems*. Arch Pharm Res, 2004. 27(1): p. 1-12.
96. Yang, Y., Y. Gao, and X. Mei, *Effects of gamma-irradiation on PLGA microspheres loaded with thienorphine*. Pharmazie, 2011. 66(9): p. 694-7.
97. Desai, K.-G.H., S. Kadous, and S.P. Schwendeman, *Gamma Irradiation of Active Self-healing PLGA Microspheres for Efficient Aqueous Encapsulation of Vaccine Antigens*. Pharm Res, 2013. 30(7): p. 1768-1778.
98. Carrascosa, C., et al., *Effect of gamma-sterilization process on PLGA microspheres loaded with insulin-like growth factor-I (IGF-I)*. J Biomater Appl, 2003. 18(2): p. 95-108.
99. Igartua, M., et al., *Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. 69(2): p. 519-26.
100. Hausberger, A.G., R. Kenley, and P. DeLuca, *Gamma Irradiation Effects on Molecular Weight and in Vitro Degradation of Poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) Microparticles*. Pharm. Res., 1995. 12(6): p. 851-856.
101. Akbar, U., et al., *Weight Loss and Impact on Quality of Life in Parkinson's Disease*. PLoS ONE, 2015. 10(5).
102. Cannon, J.R., et al., *A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2009. 34(2): p. 279-290.
103. Xiong, Z.-K., et al., *Excessive levels of nitric oxide in rat model of Parkinson's disease induced by rotenone*. Exp Ther Med, 2015. 9(2): p. 553-558.
104. Marella, M., et al., *Protection by the NDI1 Gene against Neurodegeneration in a Rotenone Rat Model of Parkinson's Disease*. PLoS ONE 2008. 3(1): p. e1433.
105. Sanchez-Reus, M.I., et al., *Standardized Hypericum perforatum reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats*. Neuropharmacol, 2007. 52(2): p. 606-16.
106. Saravanan, H.S., K.M. Sindhu, and K.P. Mohanakumar, *Intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease*. Brain Res. , 2005. 1049: p. 147-155.
107. Schmidt, W.J. and B.D. Kretschmer, *Behavioural pharmacology of glutamate neurons in the basal ganglia*. Neurosci. Biobehav. Rev., 1997. 21: p. 381-392.
108. Haobam, R., et al., *Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: A comparative study in two mouse strains*. Behav Brain Res, 2005. 163: p. 159-167.

109. Picillo, M., M. Rocco, and P. Barone, *Dopamine receptor agonists and depression in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009. 15 Suppl 4: p. S81-4.
110. Breuer, M.E., et al., *Antidepressant effects of pramipexole, a dopamine D3/D2 receptor agonist, and 7-OH-DPAT, a dopamine D3 receptor agonist, in olfactory bulbectomized rats*. *Eur J Pharmacol*, 2009. 616(1-3): p. 134-40.
111. ElHak, S.G., et al., *The role of pramipexole in a severe Parkinson's disease model in mice*. *Ther Adv Neurol Disord*, 2010. 3(6): p. 333-337.
112. Winner, B., et al., *Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model*. *Exp Neurol*, 2009. 219(2): p. 543-52.

