

NANOGELES PARA APLICACIONES OFTALMOLÓGICAS

(Resumen extenso)

Se parte desde la idea que en el suministro de fármacos en el ojo hay ciertas complicaciones cuando se trata de la vía tópica, ya que hay tanto procesos fisiológicos como barreras bioquímicas que impiden que los fármacos lleguen al tejido diana. La vía de administración que presenta más inconvenientes es la vía tópica, ya que la biodisponibilidad es muy baja si se quiere llegar más allá de las estructuras anteriores del ojo, aparte de eso, la eliminación de los agentes terapéuticos en esta vía es muy rápida debido a procesos como el parpadeo o el proceso de eliminación lacrimal.

En oftalmología es muy común que se administren fármacos en estado de gel, pero los genes a gran escala no son de interés en este trabajo, si no que se ha optado por desarrollar nanogeles a escala nanométrica, es decir, nanogeles. Estos nanogeles tendrán que ser capaces de encapsular agentes terapéuticos o fármacos para después transportarlos a un lugar en concreto. Dado que se trata de un compuesto que entrará en contacto directo con el ojo y sus estructuras se ha optado por escoger ácido hialurónico (HA) y dopamina (DOPA) como la base de la estructura del nanogel a sintetizar. Se ha escogido el ácido hialurónico porque es un compuesto que aporta humectabilidad al ojo y contribuye a la estabilidad de la película lagrimal, de ahí que sea uno de los principales compuestos en las lágrimas artificiales. Por otro lado, está la dopamina que aportará propiedades antioxidantes y otras propiedades curativas en procesos infecciosos de la cual hay evidencia científica (consultar bibliografía de la memoria escrita). A esto se le debe añadir el hecho de que la dopamina aportará también estabilidad a la estructura del nanogel mediante enlaces covalentes. Antes de sintetizar los nanogeles se deberá obtener el conjugado HA-DOPA, el cual se obtiene disolviendo 500 mg de HA de 60 kDa o 200 kDa en 50 ml de buffer de acetato de sodio de concentración 0,5 M y pH de 5,5. Luego, en intervalos de 15 minutos se añaden 288mg de EDC y 173mg de NHS sucesivamente. Para añadir el EDC y el NHS se opta por ponerlos en una disolución con buffer para así añadir siempre la misma cantidad de compuesto a la solución cada 15 minutos. Se dejan mezclando durante 4 horas a temperatura ambiente manteniendo en todo momento un pH de 5,5. Posteriormente, la solución cruda se purifica mediante diálisis durante 3 días usando primero agua acidificada (pH 5,5) y burbujeando nitrógeno gas para evitar la oxidación de los grupos fenólicos de la dopamina y después con agua neutra para ajustar el pH. Pasado este tiempo, se recoge la solución de la membrana de diálisis, se congela a -80 °C y se liofiliza durante 3 días. Finalmente, el HA modificado con dopamina de 60 y 200 kDa puro y seco de aspecto algodonoso se conserva en un recipiente cerrado con atmosfera de nitrógeno a -4 °C hasta su utilización en la síntesis de los nanogeles. Una vez hecho esto se puede proceder a la síntesis de los nanogeles. El método escogido para sintetizarlos ha sido el método de desolvatación, el cual consiste en añadir gota a gota un disolvente orgánico en un recipiente donde hay una solución acuosa con proteínas disueltas mientras la mezcla es agitada constantemente, esto hará que entre las proteínas en

forma de polímeros se produzcan el fenómeno "crosslinking" y así progresivamente unos con otros se irán enlazando mediante enlaces de hidrógenos u otro tipo de enlaces de manera que se forme una "capsula". Sin embargo, se ha modificado el protocolo, ya que este protocolo está inicialmente diseñado para proteínas, además que para estabilizar las nanopartículas se usa un reactivo químico. Por lo que en el caso del HA-DOPA se sigue el mismo protocolo con la diferencia que para estabilizar el nanogel se utilizará lacasa, una enzima que reaccionará con los grupos fenoles de la dopamina que hará que los fenoles creen entre sí enlaces covalentes, que serán más resistentes que los enlaces de hidrógeno creados durante el "crosslinking". Durante el proceso de síntesis se han ido teniendo en cuenta variables como la concentración de HA-DOPA, el peso molecular, la temperatura, la cantidad de lacasa añadida que han ido dando pistas de cuáles son las mejores condiciones para obtener los nanogeles más pequeños. Se quieren lo más pequeños posible porque así son más activos, eficaces y estables. Luego de sintetizar los nanogeles se procede a realizarles pruebas de caracterización como lo es la capacidad antioxidante, medir los tamaños de los nanogeles, sus potenciales eléctricos, la biocompatibilidad, el método de Folin-Ciocalteu el cual nos indicará el grado de concentración de dopamina que hay en el nanogel, etc.

Una vez realizadas las pruebas de caracterización se procede a encapsular los fármacos escogidos. En este caso se ha optado por encapsular fármacos que sean diferentes entre sí, de forma que los resultados abarquen varias posibilidades. Los fármacos escogidos han sido diclifenaco, que es un antiinflamatorio de tipo no esteroideo, quercetina, este compuesto es un flavonol natural y un antioxidante que se encuentra en varias fuentes vegetales y por último la gentamicina que es un compuesto bactericida. Para la encapsulación de los fármacos se deberá prestar atención a la solubilidad de cada uno. Los que sean hidrofílicos, como lo son la gentamicina y el diclofenaco se diluirán con el HA-DOPA en el agua, pero si son hidrofóbicos se tendrán que diluir con el disolvente orgánico, que en este caso es la acetona. Cuando se han sintetizado los nanogeles se les vuelve a realizar pruebas de caracterización, para confirmar la presencia de los fármacos y asegurarse que la encapsulación ha sido exitosa. Para ello se harán pruebas de biocompatibilidad con células de fibroblastos y queratinocitos. De esta forma se sabrá si los nanogeles no son agresivos con tejidos vivos. Por otra parte, se hará pruebas de actividad antimicrobiana, que permitirá saber si alguno de los nanogeles tiene propiedades antisépticas o bactericidas. También se repetirán las pruebas hechas con los nanogeles sin fármacos como por ejemplo el Folin-Ciocalteu o la actividad antioxidante, que se realiza mediante la reducción del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), si este se reduce el color de la solución pasa de ser violeta a ser amarillo.

En los resultados se ha encontrado que, primero que nada, se consiguió sintetizar el conjugado HA-DOPA, ya que el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante lo confirman. Dado que el reactivo del Folin-Ciocalteu se vuelve de un color azul oscuro, esto solo ocurre cuando hay grupos fenoles en la muestra, y en con la técnica con DPPH, todas aquellas muestras que contenían HA-DOPA se han vuelto de color amarillo. Esto

sería debido a la propiedad antioxidante que aporta la dopamina al compuesto, por lo que estos resultados confirman la presencia de la dopamina en el conjugado.

Luego, se ha comprobado que se pueden hacer nanogeles con el método de desolvatación y que con la optimización del proceso se llega a la conclusión de que para obtener nanogeles más pequeños se necesitan las siguientes condiciones: HA-DOPA de 60 kDa de peso molecular, concentración de HA-DOPA al 0,5%, velocidad de adición del disolvente orgánico (acetona) de 0,2 ml/min, es mejor como disolvente orgánico la acetona que el etanol, ya que con menor cantidad de acetona aparece la turbidez que indica la formación de los nanogeles, y no sólo eso, sino que aparece en sí más turbidez, la cantidad de lacasa es mejor poner 100 µl por cada mililitro de disolución, ya que si se pone menos los nanogeles serán menos estables. También se ha determinado que cuanto más baja es la temperatura, menor es el tamaño de los nanogeles.

En lo que respecta a las pruebas realizadas en los nanogeles que contenían fármacos se puede decir que en la prueba de actividad antioxidante todos muestran propiedades antioxidantes, dado que en la técnica con DPPH todos los nanogeles hicieron que la solución pasara de lila a amarillo. Por otra parte, si hablamos de las pruebas de biocompatibilidad se confirma que los nanogeles no fueron agresivos con los cultivos *in vivo* que se realizaron. Y por último la prueba de actividad antimicrobiana indica que los nanogeles que contenían gentamicina fueron los que más actividad antibacteriana presentaron delante de la *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que los nanogeles que no contenían ningún fármaco conseguían interactuar con las bacterias. Los nanogeles con quercetina también han presentado algo de actividad antibacteriana.

En conclusión, se concierta que al final se ha logrado sintetizar una plataforma muy versátil que es biocompatible con el ojo y con las propiedades antioxidantes que aporta la dopamina, a eso sumada la capacidad para encapsular y transportar fármacos, convierte los resultados de este proyecto con gran potencial. Los nanogeles son excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas, sobre todo en oftalmología.

La continuación de este trabajo debería de pasar por la caracterización de la eficiencia de encapsulación de los fármacos, de la liberación de estos, de la respuesta a estímulos como pH, temperaturas, enzimas presentes en el ojo, etc. así como su interacción con las mucosas y diferentes tejidos del ojo. La evolución de estos parámetros permitiría identificar las potenciales aplicaciones oftalmológicas. De igual manera, se cree que esta plataforma es muy versátil y podría ser utilizada como recubrimiento de lentillas, en gotas, pomadas, en hidrogeles inyectables, etc.