

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas

***“Formación in situ de plataforma biodegradable
para la liberación de drogas”***

Lic. Sonia Boimvaser

Directores:

Dr. Luna, Julio A.

Dr. Vaillard, Santiago E.

† Dr. Grau, Ricardo J.A.

† Dra. Cabrera, Ma. Inés

Laboratorio de Química Fina

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la industria Química

INTEC (CONICET-UNL)

-2013-

A mis padres y hermanos, por ser mí sostén, mi cable a tierra, mi realidad

A María Inés y Ricardo, por confiar en mí y abrirme sus puertas siempre

Agradecimientos

Durante la realización de esta tesis, estuvieron involucradas muchas personas e instituciones a las cuales hoy quiero agradecer.

A **Ricardo y María Inés**. Gracias por abrirme las puertas del Laboratorio de Química Fina, por dejarme llevar a cabo y dirigirme en este tema de tesis, que siempre fue un sueño para Uds., por creer en mí, por hacerme sentir sus colegas, por la palmada en el hombro y la mirada sincera. Ocuparán siempre un lugar especial en mi corazón.

Al **Dr. Julio Luna** y al **Dr. Santiago Vaillard**. Gracias por haber asumido el compromiso de la dirección en tiempos difíciles, por haberme ayudado a culminar este trabajo de tesis, por su compromiso y dedicación.

A mi familia: **Ma, Pa y Marta, Lucio, Lia y Marce, Gabo y Adrián**. Gracias, infinitamente gracias. Por no dejarme caer, por acompañarme siempre, por escucharme y mimarme.

A **Emi**. Gracias por todo tu amor, por darme otra mirada de las cosas, por enseñarme a rejalarme, por acompañarme siempre, por las risas, los abrazos, por la paz que me das día a día.

A mis amigos. **Fabi y Caro**, amigas de la vida, gracias por bancarme, por las charlas, por sus consejos “de afuera” y “de adentro”, por sus mimos, por acompañarme en este camino que elegí transitar. **Vero, Adri, Tama y Marisa**, gracias por quererme así como soy, por soportarme mis ausencias, y por seguir estando, ahí, siempre. **Nico y Lud**, gracias por su amistad incondicional, por estar siempre en todos los momentos que he tenido que transitar, por los mates y los consejos. Y gracias, también, por ser mis compañeros del club de liberación controlada, por el apoyo profesional, las horas de discusión, y el aporte continuo que han hecho en esta tesis, y en mi carrera. Mis amigos de carrera **Aye, Negro y Vicky**, gracias por su amistad, por su apoyo y las largas charlas, han sido una linda suerte que la vida nos haya reencontrado. **Mary**, creo que no necesitamos palabras, simplemente gracias por tu amistad de siempre, por tu compañía y tus mimos. **Jesi, Fer y Lore**, gracias por los consejos, las charlas entre mate y mate, por las risas, y los buenos momentos compartidos. **Gaspar y Walter**, gracias por ser parte de mi escape, por las juntadas, las charlas y las salsas.

A mis **compañeros de Química Fina: Luciano, Andrea, Mario, Patricia, Susana**. Gracias por la ayuda brindada, de la más variada índole, por las charlas, los consejos, y por haber hecho del laboratorio un lugar ameno.

Al **Grupo de Polímeros** del Intec, especialmente al **Dr. Jorge Vega** y a **José Luis Castañeda**. Gracias por brindarme un espacio para trabajar, por confiar en mis capacidades, y por el aporte que tuvieron en este trabajo de tesis.

Al **Intec** y a todo su personal, gracias por haberme abrigado durante todos estos años de tesis. Y especialmente a la gente del **Secegrin**, por el apoyo brindado en SEM.

A la **Cátedra de Química Biológica** de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, especialmente a la **Dra. Yolanda Lombardo** y a la **Dra. Adriana Chicco**. Gracias por haberme permitido formar parte de la cátedra, y confiar en mí para el desarrollo de tareas de docencia e investigación, y por la ayuda brindada en estos años de tesis.

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional del Litoral, y a todo su personal, gracias por haberme aceptado como alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y haberme abrigado otros cuantos años más. Al Comité Académico del Doctorado, gracias por realizar el seguimiento académico de mi doctorado, y a las chicas de Posgrado, **Adriana, Ana y Gachi**, gracias por haberme brindado ayuda y solución a los inconvenientes que se me presentaron durante estos años de tesis.

A la **Facultad de Ciencias Veterinarias** de la Universidad Nacional del Litoral. Al **Dr. Hugo Ortega** y su grupo, al **Centro de experimentación Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio**, y a la **Cátedra de Práctica Hospitalaria de Pequeños Animales**, gracias por brindarme el espacio donde realizar las experiencias en animales y el apoyo técnico durante la realización de las mismas. Al **Laboratorio de Cito e Histopatología**, y en especial a la **Méd. Vet. Rocío Marini**, gracias por la ayuda brindada en la realización de los estudios histopatológicos y en la discusión de mis resultados, por la buena predisposición de siempre.

Al **Dr. Víctor Moles** y todo su equipo, por haberme brindado ayuda para la realización de las intervenciones angiográficas en animales de experimentación.

A la empresa **Carbonfé S.R.L.**, y a **Miguel Queglas**, gracias por confiar en mí y cofinanciar mi beca doctoral, por haberme brindado la posibilidad de llevar adelante, junto con Ricardo, este sueño, por el acompañamiento, y, por sobre todo, por enseñarme que siempre se puede, solo hay que querer poder.

A todos los organismos que participaron en el financiamiento de este trabajo. A la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica**, y a la **Universidad Nacional del Litoral** y, en especial, al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**, por cofinanciar mi beca doctoral.

Durante el transcurso de esta tesis se presentaron los siguientes trabajos en revistas internacionales y reuniones científicas:

Trabajos en revistas internacionales:

“Bulk / surface erosion of PLGA implants in a simulated physiological medium. Description of the degradation mechanism on the basis of two auxiliary PLGA microspheres systems”

Boimvaser, S.; Mariano, R.N.; Turino, L.N.; Vega, J.R. Enviado a: Polymer Bulletin.

“Degradation of porous implants formed in situ”

Boimvaser, S.; Cabrera, M.I.; Grau, R. Procedia Materials Science (Elsevier) ISSN: 2211-8128. 1: 454–460. 2012.

“In situ formed microparticles of PLGA from O/W emulsions stabilized with PVA: Encapsulation and controlled release of progesterone”

Turino L.N.; Mariano R.N.; **Boimvaser S.**; Luna J.A. Journal of Pharmaceutical Innovation (Springer) ISSN: 1872-5120. 9(2) 132-140. 2014.

“Metabolic level recognition of progesterone in dairy Holstein cows using probabilistic models”.

Turino, L.N.; Cristaldi, M.D.; Mariano, R.N.; **Boimvaser, S.**; Scándolo, D.E. Spanish Journal of Agricultural Research (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology) ISSN: 1695-971-X. 12(2) 396-404. 2014 (ref. SJAR 5271-912/13).

Trabajos en reuniones científicas:

“1º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos”. Rosario, Agosto de 2009.

“In situ formed biodegradable sponge for embolotherapy”

Boimvaser, S.; Cabrera, M.I.; Moles, V.; Grau, R. Biocell ISSN 0327 – 9545. 33(3): A271-A296. 2009.

“3er. Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales”. Concepción del Uruguay, Agosto de 2010.

“Optimización de formulación inyectable de polímero biodegradable para su uso parenteral”

Boimvaser S.; Grau R.; Cabrera M.I.

“11º Congreso Binacional de Metalurgia y Materiales SAM / CONAMET 2011”. Rosario, Octubre de 2011.

“Degradación de implantes porosos formados in situ”

Boimvaser, S.; Cabrera, M.I.; Grau, R.

Índice de Contenidos

Abreviaturas y símbolos	i
Resumen	iv
Abstract	vi
1 Introducción General	1
1.2 Polímeros biodegradables	3
1.3 Polímeros de ácido láctico, ácido glicólico y sus co-polímeros	4
1.4 Definición de algunas terminologías	8
1.5 Degradación y erosión de polímeros de ácido láctico y glicólico	9
1.6 Sistemas de liberación controlada de drogas basados en PLGA	13
1.7 Liberación controlada de drogas para el tratamiento del cáncer	17
2 Objetivos	23
2.1 Objetivos generales	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 Materiales y Métodos	26
3.1 Materiales	27
3.1.2 Solventes	27
3.1.3 Sales y otros excipientes	27
3.1.4 Medios de ensayo	27
3.1.5 Otros insumos	28
3.1.6 Insumos para el trabajo con animales	28
3.2 Métodos	29
1era parte: Caracterización de formulaciones para formación <i>in situ</i> de implantes. Elección de formulaciones de estudio	29
3.2.1 Preparación de formulaciones de PLGA	29
3.2.2 Caracterización de formulaciones de PLGA	30
3.2.2.1 Determinación de la densidad de las formulaciones	30
3.2.2.2 Determinación de la viscosidad de las formulaciones	30
3.2.3. Estudio del efecto de tantalio sobre la viscosidad de las formulaciones	30
3.2.4. Estudio del efecto de polivinilpirrolidona sobre la viscosidad de las formulaciones	31
3.2.5 Ensayo de liberación de solvente. Caracterización de la formación <i>in situ</i> de implantes de PLGA	31
2da parte: Caracterización de implantes formados <i>in situ</i> y su degradación <i>in vitro</i>	31
3.2.6 Formación <i>in vitro</i> de implantes	31
3.2.7 Ensayo de degradación <i>in vitro</i> de implantes formados <i>in situ</i>	31
3.2.8 Caracterización de la degradación <i>in vitro</i> de implantes formados <i>in situ</i>	32
3.2.9 Contenido de solvente remanente en los implantes	32
3.2.9.1 Preparación de muestras para GC	32
3.2.10 Monitoreo del pH	33
3.2.11 Caracterización morfológica de implantes formados <i>in situ</i> y su degradación	33
3.2.11.1 Microscopía electrónica de barrido	33
3.2.11.2 Análisis de imágenes	33
3.2.12 Determinación de masa remanente y fracción de agua	33
3.2.13 Corrección de la masa remanente de implantes	34
3.2.14 Determinación de monómeros solubles AL y AG en la masa remanente y en el medio de degradación	35
3.2.14.1 Tratamiento de las muestras	35

3.2.15	Determinación de la distribución de peso molecular y pesos moleculares	36
3.2.15.1	Preparación de muestras para SEC	36
3.2.15.2	Procesamiento de datos	36
3era parte:	Caracterización de implantes formados <i>in situ</i> y su degradación <i>in vivo</i>	38
3.2.16	Formación <i>in vivo</i> de implantes	38
3.2.17	Ensayo de degradación <i>in vivo</i> de implantes formados <i>in situ</i>	38
3.2.18	Caracterización de la degradación <i>in vivo</i> de implantes formados <i>in situ</i>	38
4ta parte:	Estudio de la degradación heterogénea de implantes a través de microesferas	39
3.2.19	Síntesis de microesferas preformadas de PLGA	39
3.2.20	Determinación del tamaño de las microesferas de PLGA	39
3.2.21	Ensayos de degradación <i>in vitro</i> de microesferas preformadas	39
3.2.22	Caracterización de la degradación <i>in vitro</i> de microesferas	40
5ta parte:	Liberación <i>in vitro</i> de paclitaxel a partir de implantes formados <i>in situ</i>	40
3.2.23	Solubilidad de paclitaxel en diferentes medios de liberación	40
3.2.24	Solubilidad de paclitaxel en diferentes solventes	41
3.2.25	Obtención de formulaciones basadas en PLGA y paclitaxel	41
3.2.26	Preparación de implantes formados <i>in situ</i>	41
3.2.27	Eficiencia de atrapamiento de paclitaxel	41
3.2.28	Liberación <i>in vitro</i> de paclitaxel	42
6ta parte:	Estudio en animales de formulaciones de PLGA de precipitación <i>in situ</i>	43
3.2.29	Estudio de la compatibilidad de implantes subcutáneos formados <i>in situ</i>	43
3.2.29.1	Preparación de tejidos para histopatología	43
3.2.29.2	Examen histopatológico de los tejidos	43
3.2.30	Estudio del efecto radiográfico de los solventes sobre la arteria femoral	43
3.2.31	Estudio de la recanalización de la arteria femoral	45
3.2.32	Estudio de formulaciones poliméricas de PLGA para uso endovascular. Pruebas de penetrabilidad de las formulaciones	45
3.2.32.1	Evaluación de órganos por radiografía de tejido blando	46
3.2.32.2	Evaluación de órganos por histopatología	47
3.2.33	Trabajo con animales de experimentación, normas éticas y de buenas prácticas de laboratorio	47
3.2.34	Análisis estadístico	47
4	Resultados y Discusión	49
4.1	Caracterización y selección de formulaciones inyectables para la formación <i>in situ</i> de implantes	50
4.1.1	Introducción y objetivos	50
4.1.2	Resultados y discusión	53
4.1.3	Conclusiones	65
4.2	Caracterización de los implantes formados <i>in situ</i> y de su degradación <i>in vitro</i>	66
4.2.1	Introducción y objetivos	66
4.2.2	Resultados y discusión	68
4.2.3	Conclusiones	92
4.3	Caracterización de los implantes formados <i>in situ</i> y de su degradación <i>in vivo</i>	93
4.3.1	Introducción y objetivos	93
4.3.2	Resultados y discusión	94
4.3.3	Conclusiones	103
4.4	Estudio de la degradación heterogénea de implantes a través de microesferas	104
4.4.1	Introducción y objetivos	104
4.4.2	Resultados y discusión	105

4.4.3. Conclusiones	117
4.5 Liberación <i>in vitro</i> de paclitaxel a partir de implantes formados <i>in situ</i>	118
4.5.1 Introducción y objetivos	118
4.5.2 Resultados y discusión	120
4.5.3 Conclusiones	129
4.6 Estudio en animales de formulaciones de PLGA de precipitación <i>in situ</i>	131
4.6.1 Introducción y objetivos	131
4.6.2 Resultados y discusión	132
4.6.3 Conclusiones	148
5 Conclusiones y Perspectivas Futuras	150
Anexos	156
Anexo 1. Cuantificación de DMSO, 2P Y TR por HPLC	157
Anexo 2. Cuantificación de DMSO, 2P Y TR por GC	159
Anexo 3. Cuantificación de AL y AG por HPLC	161
Anexo 4. Determinación la distribución de peso molecular y pesos moleculares por SEC	162
Anexo 5. Cuantificación de PTX por HPLC	163
Bibliografía	165

Abreviaturas y símbolos

ACN	Acetonitrilo
AG	Acido glicólico
agua-dd	Agua destilada y desionizada
AL	Acido láctico
ANOVA	Análisis de la variancia (del inglés, <i>analysis of the variance</i>)
AUC	Área bajo la curva (del inglés, <i>area under the curve</i>)
CC	Curva de calibrado
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPM	Distribución de peso molecular
DE	Desviación estándar
En	Porcentaje de entrapamiento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCC	Carcinoma hepatocelular (del inglés: <i>Hepatocellular Carcinoma</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance (del inglés: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Imp-PBS	Implantes formados <i>in situ</i> a partir de la formulación F1, degradado en medio PBS
FID	Detector de ionización de llama (del inglés: <i>Flame Ionization Detector</i>)
GC	Cromatografía gaseosa (del inglés: <i>Gas Chromathography</i>)
LCD	Liberación controlada de drogas
Ln	Logaritmo natural
Log	Logaritmo en base 10
Me-PBS	Microesferas degradadas en medio PBS
Me-SS	Microesferas degradadas en medio SS
M_n	Peso molecular promedio en número
M_w	Peso molecular promedio en peso
NaCl	Cloruro de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato de sodio dibásico
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio monobásico
NaN₃	Azida sódica
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
NaOH	Hidróxido de sodio
<i>o/w</i>	Emulsión aceite-en-agua (del inglés <i>oil-in-water</i>)
PBS	Solución buffer fosfato salina (del inglés: <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PBS-SDS	Solución buffer fosfato salina con dodecil sulfato de sodio al 0,3 % p/v
PGA	Ácido poliglicólico
pH	- logaritmo de la concentración de hidrogeniones ($[H^+]$)
PLA	Ácido poliláctico

PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PM	Peso molecular
PS	Poliestireno
PTX	Paclitaxel
PTX10	Carga de paclitaxel en la formulación de 10% p/p de PLGA
PTX40	Carga de paclitaxel en la formulación de 40% p/p de PLGA
PVA	Polivinil alcohol
PVP	Polivinilpirrolidona
2P	2-Pirrolidona
R	Coefficiente de correlación
R²	Cuadrado del coeficiente de correlación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés: <i>Scanning Electronic Microscopy</i>)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (del inglés: <i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SS	Solución salina
t	tiempo
Tg	Temperatura de transición vítrea
TFA	Ácido trifluoroacético (del inglés: <i>trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TR	Triacetina
UV	Ultravioleta
δ	Densidad (en g/mL)
η	viscosidad dinámica (en cP)
v	Viscosidad cinemática (en cSt)

Unidades

A	Ampere
° C	Grados Celcius
Da	Dalton
d	Día
h	Hora
F	French
g	Gramo
L	Litro
m	Metro
M	Molar (mol/L)
min	Minuto
mol	Mol, equivalente a 1.10^{-23} moléculas

P	Poise
ppm	Parte por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
St	Stokes
V	Voltio
"	Pulgadas

Prefijos multiplicadores

c(unidad)	Centi (factor multiplicador por 10^{-2})
k(unidad)	Kilo (factor multiplicador por 10^3)
m(unidad)	Mili (factor multiplicador por 10^{-3})
n(unidad)	Nano (factor multiplicador por 10^{-9})
μ(unidad)	Micro (factor multiplicador por 10^{-6})

Resumen

La tecnología de solidificación *in situ* a base de polímeros biodegradables en el desarrollo de dispositivos de liberación controlada de drogas (LCD) ha atraído un especial interés en el campo biomédico, ya que permite la colocación de dispositivos sólidos liberadores sin la necesidad de la realización de una cirugía, y sin la necesidad de extraer el dispositivo luego de la terapia. Dirigir la droga a su sitio de acción y liberarla de manera controlada, asegura un efecto farmacológico óptimo y al mismo tiempo, una disminución en los efectos adversos de la droga. En terapias contra el cáncer, esto tiene especial sentido, dado que las drogas antitumorogénicas ejercen su efecto carcinostático tanto sobre una célula tumoral como sobre una célula sana. Las terapias de LCD contra el cáncer pueden ser intratumorales, como implantes intratumorales, ó locorreregionales, tales como implantes formados en la región que contiene al tumor, en la zona de tejido conectivo que lo rodea, o directamente como un émbolo en las arterias que lo irrigan (quimioembolización). El desarrollo de dispositivos para este último tratamiento pero sin carga de droga (embolización) también es de interés, dado que la oclusión de la arteria genera isquemia y muerte de las células tumorales irrigadas por el vaso ocluido. Que el material embolizante sea degradable, y conocer los tiempos de recanalización de las vías embolizadas es de especial interés para la repetición de la terapia.

El polímero biodegradable utilizado en este trabajo de tesis, polímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), es uno de los polímeros más comúnmente utilizados en la tecnología de formación *in situ* de implantes, por su alta biocompatibilidad y nula toxicidad.

En la presente tesis, el Capítulo 4 de **Resultados y Discusión** se dividió en seis secciones, donde se estudió:

En la **Sección 4.1**, se definió un rango de viscosidades aceptable para soluciones poliméricas inyectables, teniendo en cuenta el posible uso de estas formulaciones a través de catéteres. A partir de este rango se seleccionaron cuatro formulaciones de estudio (F1-4) a base de PLGA y solventes biocompatibles dimetilsulfóxido, 2-pirrolidona y triacetina. Se investigaron los perfiles de liberación de los solventes, como una medida de la velocidad de precipitación de estas formulaciones.

En la **Sección 4.2**, se estudió la degradación/erosión de F1-4 en un modelo *in vitro*, monitoreando y manteniendo el pH del medio en 7,4. Se investigaron los perfiles de pH del medio; el contenido de solvente remanente en los implantes; los perfiles de pérdida de masa, como medida de la erosión de las matrices; los perfiles de fracción de agua, como medida del hinchamiento de las matrices; los perfiles de distribución de peso molecular (DPM), peso molecular promedio en peso (M_w), peso molecular promedio en número (M_n) e índice de polidispersidad (I_p), como medida del proceso de degradación; los perfiles de liberación de los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, para estudiar donde ocurría preferentemente la hidrólisis de las cadenas. Por último, se estudió la morfología de estos implantes, y la evolución a lo largo del ensayo de degradación.

En la **Sección 4.3**, se estudió la degradación/erosión de F1-4 en la subcutis de ratas como un modelo *in vivo* de degradación. Se investigó el contenido de solvente remanente en los implantes, los perfiles de pérdida de masa, la fracción de agua, y los perfiles de DPM, M_w , M_n e l_p . Por último, se estudió la morfología de estos implantes, y la evolución a lo largo del ensayo de degradación, y se realizó la comparación morfométrica de uno de los implantes degradados *in vivo* respecto a su par degradado *in vitro*.

En la **Sección 4.4**, se profundizó el estudio de la degradación de uno de los implantes que presentó una estructura típica centro/coraza, típica de una degradación heterogénea. Se utilizó para esto, un modelo sin problemas difusionales a base de microesferas degradado en dos medios diferentes: i) en un medio a pH no regulado, para imitar lo que ocurre en el centro del implante, y ii) en un medio estrictamente regulado a pH fisiológico, para imitar lo que ocurre en la superficie del implante. En todos los experimentos, los perfiles de DPM, M_w , y de masa remanente de los sistemas poliméricos se utilizaron como medida de los procesos de degradación/erosión a lo largo del tiempo, y sirvieron para proponer un modelo simple del mecanismo de degradación.

En la **Sección 4.5**, se estudiaron los perfiles de liberación de paclitaxel de F1-4, utilizando dos cargas de drogas diferentes en las formulaciones: 10 y 40% p/p en base PLGA. Se seleccionó el medio de liberación para los ensayos, se determinó el entrapamiento y la eficiencia de entrapamiento del fármaco, y se analizaron las áreas ocupadas por dichos implantes, como una medida de su erosión.

En la **Sección 4.6**, se estudió la biocompatibilidad de los implantes F1-4 en la subcutis de ratas. Luego, se escogió una de las formulaciones para estudiar la vía endovascular. Primero, se evaluó la respuesta del sistema solvente que compone dicha formulación en la arteria femoral de cerdos. Luego, el mismo modelo arterial se ocluyó para estudiar la recanalización de la vía y la respuesta inflamatoria. Finalmente se llevó a cabo un protocolo de embolización en riñón de conejo, donde se estudió la penetrabilidad de la formulación.

Abstract

In situ depot-forming system technology for development of controlled drug delivery (CDD) devices has attracted attention in the biomedical field, since it allows placing the device without surgery and requires no follow up surgical removal once the therapy is completed. The delivery of a drug locally to a specific site of the body, and its release in a controlled manner, assures an optimal pharmacologic effect and a reduction of adverse reactions. These issues acquired special sense in the treatment of cancer, where the anticancer drug acts on tumoral cells as well as on healthy ones. CDD anticancer therapies can be intratumoral, like intratumoral implants, or locoregional, like implants formed around the tumor, or directly as an embolus in the arteries that supplies it (chemoembolization). Moreover, as chemoembolization, embolization (the same therapy but without drug) is also of interest, since the occlusion of the tumoral artery causes ischemia and death of the cancer cells feeds by the vasculature occluded. The biodegradation of the embolization agent and the time the embolized artery take to recanalize, are important issues in the repetition of the treatment.

The biodegradable polymer used in this thesis, poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymer (PLGA), is one of the most commonly used polymers in the *in situ* depot-forming technology, because its high biocompatibility and null toxicity.

In the present thesis, Chapter 4 **Results and Discussions** has been divided into six sections, studying:

Section 4.1 includes the selection of a viscosity range acceptable for polymeric injection, taking into account the possible use of the formulations through catheters. This viscosity range was used to choose four polymeric formulations of study (F1-4) based on PLGA and biocompatible solvents dimethyl sulfoxide, 2-pyrrolidone and triacetin. The solvent release profiles were investigated, as a measure of the precipitation rates of these formulations.

In **Section 4.2**, the *in vitro* degradation and erosion processes of F1-4 were studied, monitoring and maintaining the pH medium in 7,4. During degradation, it was investigated: the pH profiles; the residual solvent content of the implants; the mass loss, as a measure of the erosion of the matrices; the water fraction profiles, as a measure of the swelling of the matrices; the evolution of the molecular weight distributions (MWD), the weight average molecular weight (M_w), the number average molecular weight (M_n) and the polydispersity index (I_p), as a measure of the degradation process; and the lactic and glycolic acid release profiles, to study the preferred site of hydrolysis of the polymeric chains. Last, implants morphologies and their evolution were studied during degradation.

In **Section 4.3**, the *in vivo* degradation and erosion processes of F1-4 were studied, in rats subcutaneously injected. During degradation, the implant residual solvent content, the mass loss profiles, the evolution of MWD, M_w , M_n and I_p , were investigated. Finally, implants morphologies

and their evolution were studied during degradation, and a morphometric comparison was made between one of the implants degraded *in vivo* and the *in vitro* degraded one.

In **Section 4.4**, the heterogeneous degradation of one of the implants, which presented a typical core/shell structure, was studied in depth. For this purpose, a model without diffusional problems based on small microspheres was degraded in two different media: i) in a non pH regulated medium, to simulate the degradation in the implant core, and ii) in a physiological pH strictly controlled medium, to simulate the degradation in the implant surface. In all experiments, the MWD, the M_w and the remaining mass of the polymeric systems were used as a measure of the degradation/erosion processes along the time, and served to propose a simple model of the degradation mechanism.

In **Section 4.5**, paclitaxel release profiles were studied in F1-4, using two different drug loading in the formulations: 10 y 40% p/p of PLGA. The medium for the release studies was selected, the entrapment and encapsulation efficiency of the drug was determined, and the areas of the implants were analyzed as a measure of the erosion process.

In **Section 4.6**, the biocompatibility of F1-4 subcutaneous implants was studied. Then, one formulation was chosen for studying the endovascular route. First, the response to the solvent system of this formulation was evaluated in the femoral artery of pigs. Then, the same artery model was occluded to study the recanalization of the vessel and the inflammatory response. Finally, an embolization protocol was carried out in rabbit kidney, where the penetrability of the formulation was investigated.

1 Introducción General

1.1 Sistemas de liberación controlada de drogas parenterales

Los sistemas convencionales de liberación de droga parenteral, comúnmente inyecciones intravenosas, eventualmente causan concentraciones plasmáticas elevadas de la droga, cercanas a la concentración tóxica mínima. A veces es requerida la administración repetitiva debido a la corta duración de acción de los sistemas convencionales (Edlund y Albertsson, 2002). Para evitar los problemas de estos sistemas, se han diseñado sistemas parenterales de liberación controlada de drogas (LCD) para obtener perfiles de liberación deseados, consistentes y predecibles. Usualmente, la administración parenteral de drogas se refiere a la inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular de un fármaco (Burgess y col., 2002; Shi y Li, 2005). Dentro de los sistemas de LCD se encuentran: emulsiones, liposomas, micropartículas e implantes (Burgess y col., 2004). Estos sistemas son de elección cuando la droga candidata tiene mala absorción por otras rutas de administración y tiempos de vida media cortos. Además, se pueden utilizar en pacientes con problemas con la administración oral de drogas o que están inconscientes.

Dentro de las ventajas de los sistemas de LCD sobre los sistemas de liberación de droga convencionales, se pueden enumerar: i) mantienen una alta concentración de droga en sangre o prolongan la duración de su acción, ii) mejoran la farmacocinética de la droga, iii) aumentan la estabilidad física de la droga, iv) reducen los efectos adversos al mantener un nivel de droga constante, v) aumentan la especificidad y reducen los efectos sistémicos adversos para la liberación de droga sitio-dirigida, vi) permiten obtener perfiles de liberación predecibles, y vii) mejoran la calidad de vida de los pacientes al disminuir la administración invasiva y la frecuencia de dosificación (Burgess y col., 2004; Burgess y col., 2002; Packhaeuser y col., 2004; Shi y Li, 2005; Siepmann y Siepmann, 2006).

Aunque las ventajas de los sistemas de LCD son evidentes, no se pueden ignorar algunos inconvenientes. En cuanto a la fabricación, estos sistemas requieren numerosos pasos, existen problemas de escalado, esterilización y estabilidad de la droga (Chaubal y Roseman, 2006). También son desventajas el vaciado de la dosis y la limitación de los sistemas no removibles (Burgess y col., 2002).

En la actualidad, numerosas empresas farmacéuticas se encuentran desarrollando tecnologías para la LCD parenteral, buscando mejorar los productos farmacéuticos y generar nuevos sistemas. El desarrollo de sistemas aprobados de LCD para uso parenteral y la introducción de una nueva tecnología por la comunidad científica farmacéutica están en progreso (Chaubal y Roseman, 2006).

Los sistemas de LCD requieren el uso de materiales que posean una alta biocompatibilidad. El empleo de estos materiales, generalmente polímeros naturales o sintéticos, busca la dosificación del fármaco a través de la matriz polimérica en flujos dentro de su ventana terapéutica (Ratner y Bryant, 2004; Rojas Cortés y col., 2008). Una de las áreas de mayor interés en esta tecnología es el desarrollo de sistemas de polímeros biodegradables. Tales polímeros tienen la ventaja de permitir la administración sistémica o sitio-específica de agentes farmacéuticos sin la necesidad de extraer posteriormente el sistema de liberación (Lewis, 1990).

1.2 Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables son utilizados cada vez más en aplicaciones farmacéuticas. Idealmente, un polímero biodegradable debe ser: i) metabolizado en el organismo y eliminado por las vías fisiológicas normales, ii) fabricado fácilmente en su forma final, iii) degradado a sustancias no-tóxicas, que son no-mutagénicas y no-citotóxicas, y iv) no producir proceso inflamatorio luego de su aplicación, inyección o inserción (Jain, 2000; Middleton y Tipton, 2000). Además, el producto final luego de su degradación aeróbica, debe ser dióxido de carbono, agua o minerales (Van der Zee, 2005).

Una gran variedad de polímeros han sido utilizados en el desarrollo de sistemas de LCD parenterales. Los polímeros biodegradables se pueden clasificar en función de su origen en naturales o sintéticos. Los polímeros naturales normalmente son biocompatibles y biodegradables (Pillai y Panchagnula, 2001). Dentro de aquellos utilizados en la fabricación de sistemas parenterales de LCD se encuentran: alginato, quitosano, colágeno y gelatina (O'Neil, 2010).

Los polímeros biodegradables sintéticos han recibido un creciente interés debido a la dificultad en la obtención de resultados reproducibles cuando se utilizan polímeros naturales (Angelova y Hunkeler, 1999). Al presente, existen disponibles en el mercado una variedad de polímeros biodegradables sintéticos, entre los que se encuentran: poliésteres lineales de ácido glicólico y de ácido láctico y sus co-polímeros; policaprolactonas; polihidroxitiratos, polihidroxi valeratos y sus co-polímeros; poliortoésteres; polianhídridos; y polifosfacenos (Lewis, 1990; Roskos y Maskiewicz, 2002). Dentro de estos polímeros, los poliésteres alifáticos basados en ácido glicólico (AG) y ácido láctico (AL) son los polímeros más ampliamente investigados y avanzados en lo que a datos toxicológicos y clínicos se refiere (Lewis, 1990), por lo que son adecuados para ser utilizados en sistemas de LCD.

1.3 Polímeros de ácido láctico, ácido glicólico y sus co-polímeros

Los polímeros ácido poliláctico (PLA, del inglés *polylactic acid*) (**1**), ácido poliglicólico (PGA, del inglés *polyglycolic acid*) (**2**) y sus co-polímeros ácido poli(láctico-co-glicólico) ó poli(lactida-co-glicólido) (PLGA, del inglés *poly(lactic-co-glycolic acid)*, **3**) (ver **Figura 1.1**) han sido aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *United States Food and Drug Administration*) para su uso parenteral en humanos (Alexis, 2005; Matschke y col., 2002; Roskos y Maskiewicz, 2002; Winzenburg y col., 2004). El creciente interés en el uso de estos polímeros en el campo farmacéutico y biomédico reside en sus características de i) biocompatibilidad y nula o baja toxicidad, ii) degradación hidrolítica a monómeros no-tóxicos, iii) amplia variación en la velocidad de degradación (puede variar de 1 mes a varios años) en función de su peso molecular, grado de cristalinidad y composición de sus co-monómeros y/o aditivos, iv) fabricación relativamente sencilla y v) cinéticas de degradación *in vivo* predecibles (Lewis, 1990; Roskos y Maskiewicz, 2002). Varias compañías farmacéuticas importantes, tanto de medicina veterinaria como humana, han desarrollado programas de investigación basados en estos polímeros, dedicados a la formulación de microesferas inyectables e implantes preformados y de formación *in situ* para la LCD (Lewis, 1990; Pillai y Panchagnula, 2001).

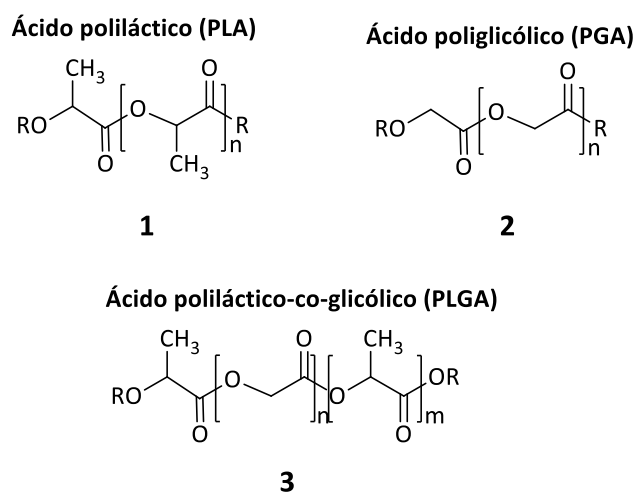


Figura 1.1. Polímero de ácido láctico, de ácido glicólico y de ácido láctico-co-glicólico

Los polímeros PGA, PLA y PLGA se encuentran en el grupo de los poliésteres alifáticos termoplásticos (Jain, 2000). Una propiedad importante de los polímeros termoplásticos es su comportamiento térmico, pudiendo ser capaz de ablandarse por calentamiento y endurecerse por enfriamiento repetidamente (*Encyclopedic dictionary of polymers*, 2010). La temperatura a la cual

el polímero pasa de manera reversible de un estado rígido vídrioso a un estado móvil gomoso se conoce como temperatura de transición vítrea (T_g). Este paso está vinculado a un cambio en la movilidad molecular y al volumen libre asociado al final de las cadenas poliméricas.

Estos polímeros están disponibles en el mercado en diferentes pesos moleculares, relación de co-monomeros y grupo químico terminal.

Los polímeros PGA, PLA y PLGA pueden ser obtenidos directamente por policondensación de AL y AG a temperaturas por encima de los 120 °C bajo condiciones de remoción de agua, resultando en polímeros de bajo peso molecular (Wang y col., 2006; Zhou y col., 2004). Para obtener el homo o co-polímero de peso molecular mayor que algunos miles de daltons, se utiliza lactida y glicólido como iniciadores en el proceso de polimerización por apertura del anillo. La lactida (3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona) (**6**) y el glicólido (1,4-dioxano-2,5-diona) (**7**) son los dímeros cíclicos de AL (**4**) y AG (**5**), respectivamente (**Figura 1.2**). Se sintetizan por policondensación con o sin catalizador (comúnmente octoato de estaño o cloruro de estaño II) seguido de una descomposición por calor a baja presión (De Vries, 1989; Middleton y Tipton, 2000).

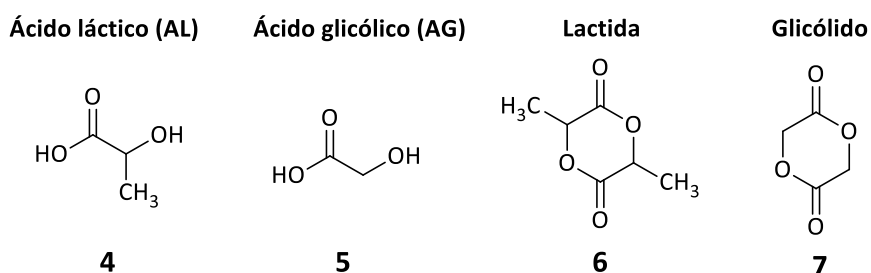


Figura 1.2. Ácido láctico, ácido glicólico, lactida y glicólido.

Debido a los dos átomos de carbono asimétricos en la molécula, la lactida existe en tres formas diferentes (**Figura 1.3**): la L-lactida (**8**), la D-lactida (**9**) y la meso ó DL-lactida (**10**) (Groot y col., 2010). La L- y la D- lactida son ópticamente activas, mientras que la DL-lactida es un compuesto ópticamente inactivo (Jacobsen y Fritz, 1999).

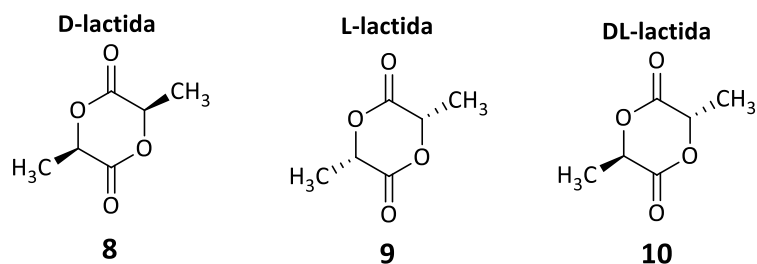


Figura 1.3. Isómeros de lactida. L-lactida, D-lactida y DL-lactida.

El PGA se obtiene por polimerización por apertura del anillo de glicólido (**Figura 1.4 a**). Este polímero es altamente cristalino (45-55%) debido a la falta de grupo metilo comparado con el PLA, y posee un alto punto de fusión (220-225 °C) (Jain, 2000; Lewis, 1990). La temperatura de transición vítrea (Tg) se encuentra en el rango 35-46 °C (Lewis, 1990; Middleton y Tipton, 2000). Dada su alta cristalinidad, este compuesto es prácticamente insoluble en la mayoría de los solventes empleados en formulaciones de liberación controlada. Es por este motivo que se lo suele co-polimerizar con otros monómeros, como AL, para alterar la regularidad de su estructura química.

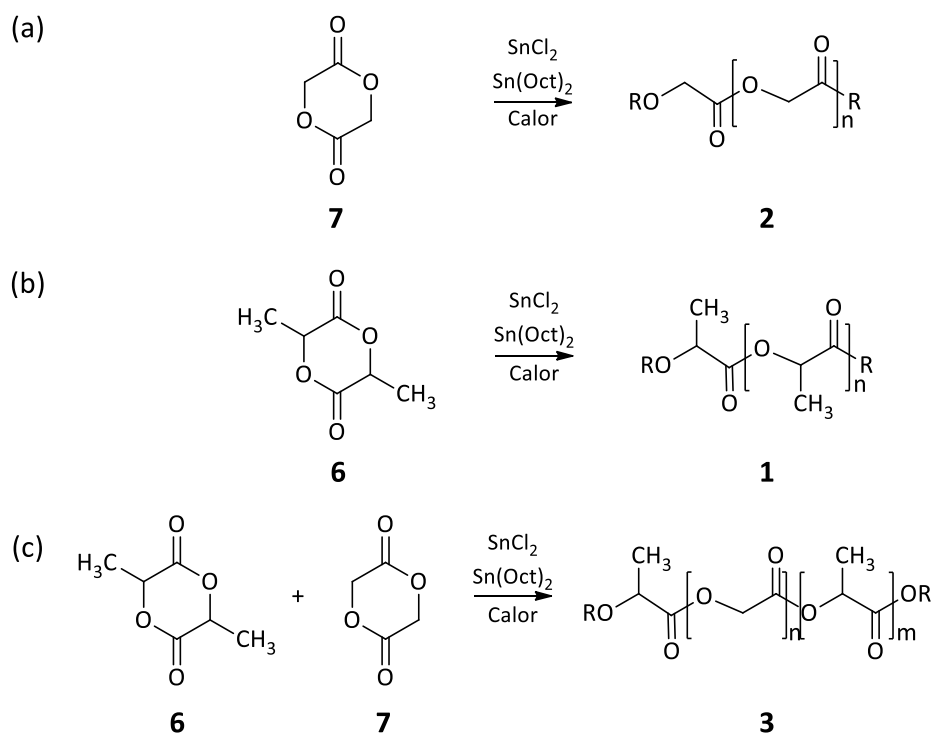


Figura 1.4. Síntesis de PGA, PLA y PLGA por polimerización por apertura del anillo.

De manera similar al PGA, el PLA es sintetizado por la misma reacción utilizando lactida como el material de partida (**Figura 1.4 b**). Debido a que la lactida presenta tres isómeros ópticos, D, L y DL, el tipo de PLA sintetizado va a depender de la lactida usada. De todos, los que presentan mayor interés son la poli(L-lactida) (L-PLA) y la poli(DL-lactida) (DL-PLA), polímeros que se obtienen a partir de L-lactida y DL-lactida, respectivamente (Jacobsen y Fritz, 1999; Sun y col., 2002). El homopolímero de L-lactida (L-PLA) es un polímero semicristalino relativamente rígido, con un punto de fusión entre 170-180 °C y una Tg que ronda los 60-67 °C. El DL-PLA es totalmente amorfo y presenta una Tg entre 50 y 60 °C, todavía por encima de la temperatura corporal, lo que le confiere cierta rigidez, poca elasticidad y fragilidad a temperatura ambiente. El DL-PLA es más flexible y más permeable que el L-PLA (Daniels y col., 1990; Gu y col., 2008; Zhou y col., 2004). Además, a diferencia de su par semicristalino, presenta buena solubilidad en solventes orgánicos comunes, convirtiéndolo en un buen candidato para formar parte de sistemas de administración de fármacos. (Edlund y Albertsson, 2002; Jain, 2000; Matschke y col., 2002; Middleton y Tipton, 2000).

El método más común para la preparación del PLGA es también la polimerización por apertura del anillo (**Figura 1.4 c**). El PLGA es sintetizado a partir de glicólido y L-lactida o DL-lactida. Manipulando la proporción y la estereoquímica de los monómeros, el peso molecular, como así también, el empleo o no de un terminador durante la síntesis, una amplia variedad de características pueden ser moduladas en el polímero resultante. A pesar de que el PGA es cristalino, el co-polímero de DL-lactida y glicólido, poli(D,L-lactida-co-glicólido) (DL-PLGA) con un contenido de glicólido de hasta un 85% es totalmente amorfo (Wang y col., 2006; Zhou y col., 2004). El PLGA resultante de la polimerización entre L-lactida y glicólido, poli(L-lactida-co-glicólido) (L-PLGA), con un contenido de glicólido en un rango de 25-70% también es un polímero amorfo. Esto es causado por la interrupción de la regularidad de la cadena polimérica por otros monómeros. Se ha reportado que el PLGA es semicristalino cuando la proporción de uno de los monómeros (glicólido o lactida) es mayor a 70 mol % (Middleton y Tipton, 2000).

El PLGA amorfo presenta una Tg que se encuentra entre 40 y 60 °C, por lo que a temperatura fisiológica presentan aún una buena rigidez y una aceptable resistencia mecánica para ser utilizados en formulaciones. Con la caída del peso molecular y el contenido de AL en el co-polímero, la Tg puede disminuir, provocando un aumento en la velocidad de degradación. El peso molecular y la relación AL/AG apropiados deben elegirse en base al tiempo de vida media que se desea tenga el polímero *in vivo*. Una explicación detallada se encuentra en la **Sección 1.5**.

1.4 Definición de algunas terminologías

Es importante definir algunas terminologías que se emplean en este trabajo de tesis al momento de referirse a matrices degradables. **Degradación** se refiere al proceso de ruptura de la cadena polimérica a oligómeros y monómeros. Durante la misma, se observa una disminución en el peso molecular. La **erosión** ocurre luego que el polímero ha comenzado a degradarse. Es el proceso de pérdida de material de la matriz polimérica, resultando comúnmente en una disminución en el peso o masa. Los fenómenos tales como ganancia de agua, transferencia de masa y degradación están involucrados en el proceso de erosión. Por lo tanto la degradación se define como una parte del proceso de erosión del polímero (Göpferich, 1996). En la **Figura 1.5** se intenta resumir estas definiciones.

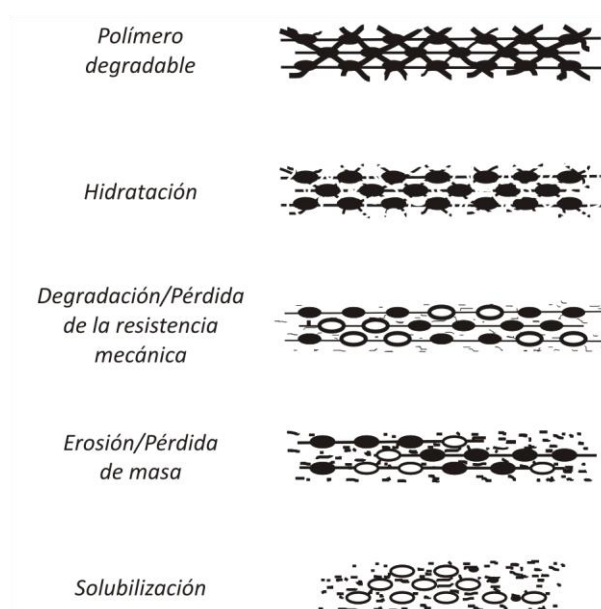


Figura 1.5. Procesos físico-químicos que modifican una matriz de polímero degradable.

En principio, la erosión del polímero se clasifica en erosión de superficie (del inglés *surface erosion*) y erosión de matriz (del inglés *bulk erosion*) (**Figura 1.6**). La **erosión de superficie o heterogénea**, ocurre cuando la degradación de la estructura polimérica es más rápida que la difusión de agua a través de la matriz polimérica. Así, la ruptura de las cadenas poliméricas ocurre sólo superficialmente y el tamaño de la matriz polimérica decrece en función del tiempo. Pero si la difusión del agua es más rápida que la degradación, el polímero se degradará en todo su volumen, sufriendo una **erosión de matriz u homogénea** (Alexis, 2005; Burkersroda y col., 2002; Winzenburg y col., 2004). Estos dos mecanismos de erosión son casos ideales en los que la

mayoría de los procesos de degradación de polímeros no pueden ser inequívocamente asignados (Göpferich, 1996). A partir de este momento llamaremos **degradación bulk**, a aquella degradación que ocurre en toda la matriz, dando lugar a una erosión homogénea de la matriz. Mientras que al decir **degradación superficial**, nos referiremos a la que da como resultado una erosión de superficie.

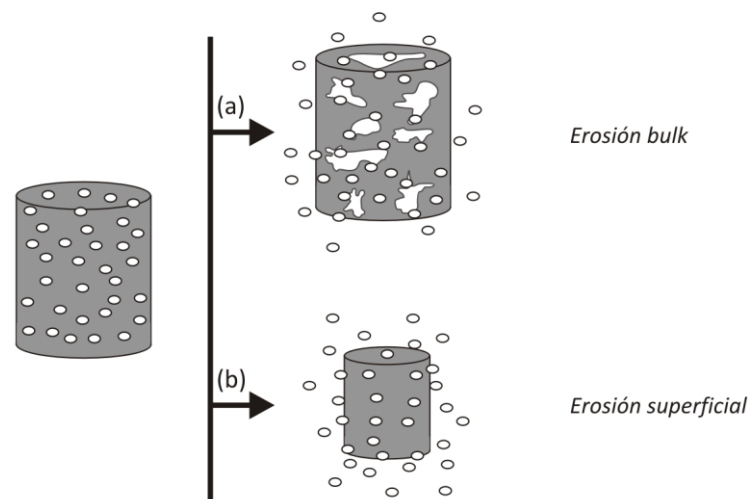


Figura 1.6. Visualización esquemática de un proceso de erosión a) de matriz (bulk) y b) de superficie.

Por último, la **biodegradación** y la **bioerosión** se refieren a la degradación y la erosión mediadas por un sistema biológico, es decir, el entorno biológico en el cual la matriz polimérica se encuentra, que contribuye a su degradación y erosión (Göpferich, 1997b; Göpferich y Tessmar, 2002).

1.5 Degradación y erosión de polímeros de ácido láctico y glicólico

En poliésteres biodegradables como PLA, PGA y PLGA, los monómeros están conectados entre sí por uniones éster. Luego del ingreso de agua dentro de la matriz polimérica, las uniones éster son clivadas aleatoriamente por hidrólisis. Eventualmente, la matriz es erosionada a través del mecanismo de erosión de matriz. La velocidad de degradación del PLA, PGA y PLGA puede estar influenciada por diversos factores, tales como el pH, el peso molecular, la temperatura, el tamaño, y el uso de aditivos, entre otros (Alexis, 2005; Winzenburg y col., 2004). La presencia de grupos metilos en la estructura del PLA (ver **Figura 1.1**) hace que la molécula sea más hidrofóbica que el PGA. Una mayor hidrofobicidad reduce la ganancia de agua por la estructura polimérica. Por esta razón, el PLA posee una velocidad de degradación más lenta que el PGA (Engelberg y Kohn, 1991). El co-polímero de AL y AG se degrada más rápido que los homopolímeros. La degradación del

PLGA está afectada por la relación de co-monómeros AL/AG, en relación a la hidrofobicidad y cristalinidad que le confieren uno u otro, respectivamente. Con pesos moleculares similares, una mayor proporción de glicólido en el PLGA lleva a una más rápida degradación del polímero. Ya que la degradación del PLGA se debe a la hidrólisis de las uniones éster, la mayor hidrofiliicidad del grupo glicólido resulta en una más fácil hidratación del co-polímero, permitiendo así que el agua alcance más fácilmente las uniones ésteres de la estructura polimérica (Lu y col., 1999; Wu y Wang, 2001). De la misma manera, la cristalinidad que le confiere el grupo glicólido a la estructura del PLGA vuelve al polímero más cristalino, llevando esta vez a una degradación más lenta.

El peso molecular del polímero también afecta la velocidad de degradación *in vitro* e *in vivo*. Polímeros de mayor peso molecular son degradados más lentamente que aquellos de menor peso molecular (Alexis, 2005). El peso molecular no solo influye en la degradación polimérica del PLGA, sino también en su Tg y en sus propiedades mecánicas. A medida que aumenta el peso molecular, aumenta la Tg y mejoran las propiedades mecánicas del polímero (Engelberg y Kohn, 1991; Kranz y col., 2000).

Resumiendo lo anteriormente expuesto, en la **Figura 1.7** se presenta la relación entre la proporción AL/AG, el peso molecular y el tiempo de degradación *in vivo*, reportada por Cleland y colaboradores (Cleland, 2002; Jain, 2000; Middleton y Tipton, 2000; Miller y col., 1977).

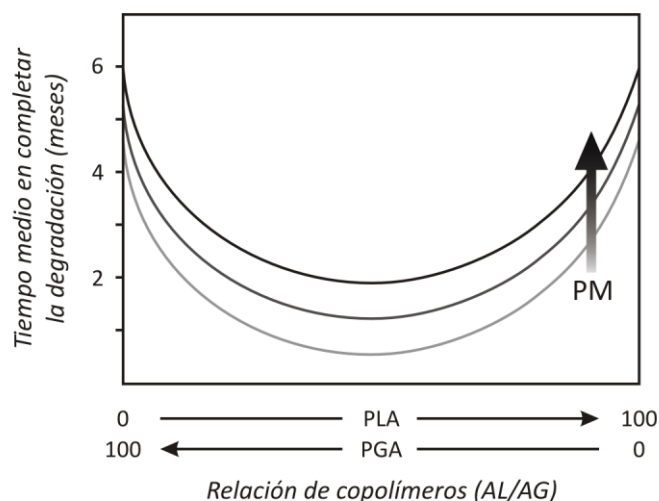


Figura 1.7. Perfiles de degradación *in vivo* de PLGA. Figura adaptada de Cleland y colaboradores (Cleland, 2002).

A medida que la cantidad relativa de cada monómero aumenta, el tiempo de degradación aumenta debido a diferencias en la cristalinidad y la hidrofobicidad del polímero, respectivamente (ver **Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Tiempos de degradación *in vivo* en ratas

Composición polimérica (AL/AG)	Peso molecular (kDa)	Tiempo medio para completar la degradación (meses)	Cristalinidad
PLA	85	6,1	Moderada
75:25 PLGA	50	0,6	Baja/moderada
50:50 PLGA	46	0,24	Baja
25:75 PLGA	S/D	0,55	Moderada
PGA	S/D	5,0	S/D

Tabla reproducida de Cleland y colaboradores (Cleland, 2002). Datos obtenidos de Miller y colaboradores (Miller y col., 1977).
S/D, sin datos.

El reemplazo de grupos carboxílicos terminales libres desprotegidos por grupos alquil éster (protegidos) disminuye la velocidad de degradación (ver **Figura 1.8**). La degradación de polímeros desprotegidos produce grupos terminales más ácidos, lo que autocataliza la degradación. Otra razón de la más rápida degradación de los polímeros no protegidos es que ganan agua más rápidamente (Tracy y col., 1999).

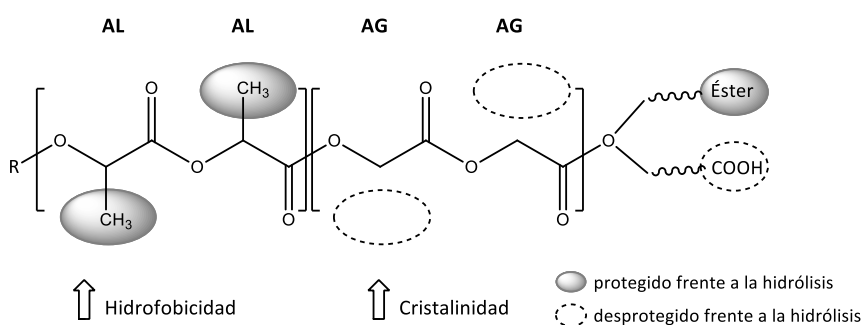


Figura 1.8. Variables que afectan la velocidad de degradación del PLGA.

Existen algunos procesos capaces de alterar la degradación del polímero debido a la presencia de un aditivo o droga, tales como: i) cambio en la porosidad, ii) cambio en la fuerza osmótica, iii) neutralización por propiedades básicas o supresión de la reducción del pH causada por productos de degradación ácidos, y iv) interacción química entre el grupo funcional del polímero y el aditivo (O'Neil, 2010).

El PLGA se degrada finalmente a sus monómeros AL y AG. Estas moléculas pueden ser metabolizadas y excretadas por las vías fisiológicas normales en humanos y animales. El AL es un producto común de la contracción muscular. Éste ácido pasa a ácido pirúvico, se metaboliza luego en el ciclo del ácido tricarboxílico y se excreta como agua y dióxido de carbono a través de la respiración. El AG puede ser excretado directamente a través de la orina. Además, el AG reacciona para formar glicina en el cuerpo. La glicina se convierte en serina, que es luego transformada en ácido pirúvico. Después de entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico, el ácido pirúvico es excretado en la forma de agua y dióxido de carbono (Middleton y Tipton, 2000).

Generalmente se acepta que las matrices de PLGA sufren erosión *bulk* en medio acuoso (Li y col., 1990; Tamada y Langer, 1993). Sin embargo algunos autores encontraron que el PLGA también es capaz de erosionarse por superficie (Yoshioka y col., 2008).

A principios de los '90, Li y col. reportaron que la degradación *bulk* que sufrían discos de PLA y PLGA no ocurría homogéneamente en toda la matriz polimérica (Li y col., 1990): la degradación procedía más rápido en el centro que en la superficie de la matriz. Esta degradación no homogénea, o **degradación heterogénea** como se la conoce actualmente, resulta de un fenómeno de difusión-reacción (Li y Vert, 1999). Al colocar la matriz polimérica homogénea en el medio acuoso, el agua penetra y la escisión de las uniones ésteres comienza. La reacción de degradación del PLGA se esquematiza en la **Figura 1.9 a**. Cada unión que se rompe forma un nuevo grupo terminal carboxílico que disminuye el pH circundante y acelera la hidrólisis de las uniones ésteres remanentes como se muestra en la **Figura 1.9 b**, efecto conocido como “autocatálisis” (Antheunis y col., 2009; Fu y col., 2000; Han y Pan, 2011).

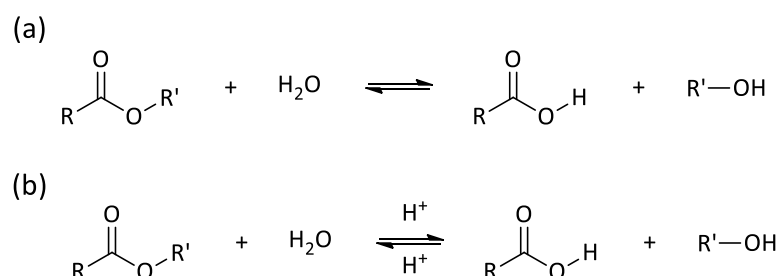


Figura 1.9. Esquemas de reacción de (a) la degradación hidrolítica de PLGA y (b) la degradación autocatalizada de PLGA. Los protones provienen de los productos oligoméricos ácidos de la degradación.

Los oligómeros solubles que se encuentran cerca de la superficie pueden difundir hacia fuera de la matriz, mientras que aquellos que se encuentran en el interior difícilmente pueden hacerlo. Esta

diferencia resulta en una mayor acidez dentro respecto de la superficie. Cuando el medio acuoso externo se encuentra regulado a pH fisiológico (pH 7,4), se produce además una neutralización de los grupos terminales carboxílicos en la superficie que contribuye aún más a disminuir la acidez de la superficie. De esta manera la autocatálisis es mucho mayor en el interior, produciendo una diferenciación superficie-interior. Existen así dos poblaciones de macromoléculas degradándose a diferentes velocidades.

Por otro lado, se ha reportado en la bibliografía que los dispositivos de PLGA pequeños (como microesferas de diámetro menor a 10 μm) sufren degradación *bulk* homogénea (Lu y col., 1999; Park, 1995), debido a que no presentan problemas difusionales significativos, y por lo tanto no ocurre una acumulación de oligómeros ácidos solubles en el interior de la matriz.

1.6 Sistemas de liberación controlada de drogas basados en PLGA

Una variedad de sistemas poliméricos biodegradables parenterales para la LCD se han desarrollado ampliamente durante las últimas décadas. Una ventaja importante de las formas de dosificación biodegradables sobre las no degradables es que no es necesaria la remoción quirúrgica del cuerpo luego de la administración. A fin de lograr las formas de dosificación finales requeridas, se debe evaluar qué polímeros biodegradables y cuáles técnicas de producción son las adecuadas. Debido a las ventajas del PLA, PGA y sus co-polímeros, se ha puesto especial énfasis en la investigación de sistemas biodegradables para la LCD con dichos polímeros. Estos polímeros son fáciles de ser fabricados en varias formas de dosificación (Jain, 2000). Un número de productos farmacéuticos para la LCD basados en PLA y PLGA se han lanzado en el mercado mundial (O'Neil, 2010).

Para superar los inconvenientes de las formas convencionales de dosificación parenterales, los sistemas para la LCD se han diseñado con el objeto de reducir la frecuencia de dosificación, prolongar la duración de acción de la droga, mejorar la comodidad del paciente, y por ende optimizar la terapia farmacéutica relacionada (Iyer y col., 2006; Shi y Li, 2005). Dentro de estos sistemas se encuentran micropartículas, nanopartículas, implantes preformados, implantes formados *in situ* y microesferas formadas *in situ*.

Dentro de estos dispositivos se pueden incorporar drogas de bajo peso molecular, agentes anticancerígenos, hormonas, péptidos, proteínas y vacunas, y ser liberados de manera controlada (Jain, 2000).

Si bien los sistemas basados en micropartículas de PLA/PLGA cargadas con drogas se han fabricado con éxito y han sido lanzadas en el mercado mundial, esta tecnología presenta una serie de desventajas tales como: i) necesidad de reconstitución previo a la inyección; ii) incapacidad de remover la droga una vez inyectada (la terapia no se puede terminar antes si existe algún tipo de complicación); iii) condiciones extremas de fabricación (uso de calor y/o solventes) que pueden afectar negativamente la estabilidad de las drogas; iv) sistemas de manufactura muy costosos y complicados (simple emulsión, doble emulsión, coacervación, secado por atomización, secado en frío, fusión en caliente, y fluidización, entre otros, y liofilización final); v) dificultad para obtener buenos rendimientos de entrapamiento a altas cargas de droga; vi) toxicidad y peligrosidad ambiental de los solventes orgánicos utilizados durante la manufactura; y vii) dificultad de eliminación de los residuos de dichos solventes en el producto final (Eliaz y Kost, 2000; Jain, 2000; Turino, 2012).

Algunos procedimientos para preparar implantes sólidos pueden evitar el uso de solventes orgánicos. Los implantes son formas de dosificación que se insertan en el cuerpo por vía subcutánea o en una cavidad corporal con la ayuda de cirugía (Shi y Li, 2005). Aunque los procedimientos invasivos son una desventaja importante de la administración, los implantes pueden ser removidos fácilmente si se requiere la terminación temprana debido a efectos adversos. Los implantes se pueden utilizar como sistemas de liberación sistémicos o locales. Para obtener efectos terapéuticos sistémicos, los implantes se administran por vía subcutánea (Shi y Li, 2005). El fármaco incorporado se libera desde el implante y es absorbido por la circulación sanguínea. Para obtener efectos locales, los implantes se colocan en sitios específicos del cuerpo, donde se produce la acción del fármaco sin ser absorbido en la circulación sistémica, ejerciendo un efecto terapéutico en el sitio de implantación (Senior, 2000). Los implantes biodegradables preformados presentan varios de los inconvenientes que presentan las microesferas, sumado a que su administración es invasiva y dolorosa, ya que requieren de anestesia local y una pequeña intervención quirúrgica (Packhaeuser y col., 2004).

Para evitar la necesidad de procedimientos invasivos en la colocación de los implantes, se ha desarrollado en los últimos años un novedoso implante que se inyecta de forma líquida y luego precipita *in situ* por un **proceso de inversión de fases**, como se muestra en la **Figura 1.10**.

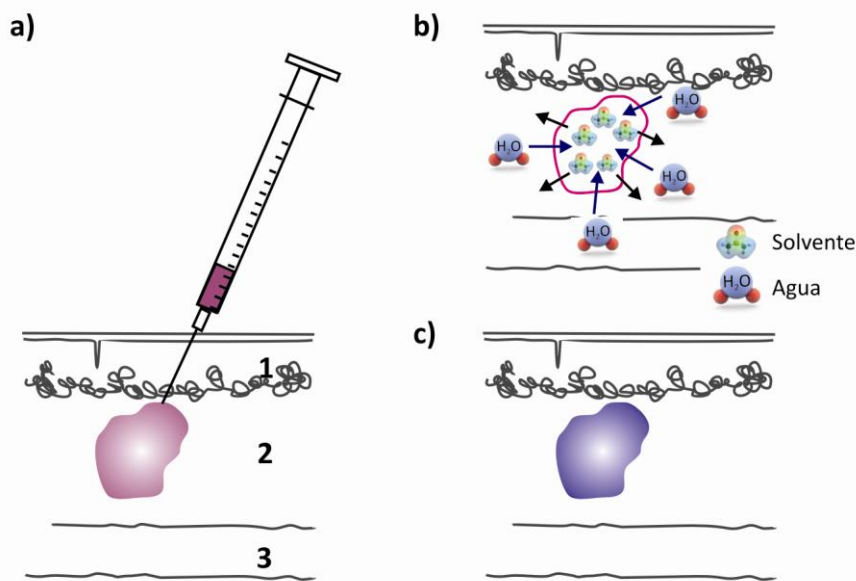


Figura 1.10. Formación *in situ* de implantes por inversión de fases a) inyección de formulación polimérica, b) proceso de inversión de fases, y c) implante formado *in situ*. Se encuentran indicados: (1) epidermis y dermis, (2) subcutis, y (3) músculo. Adaptado de Kempe y Mäder (Kempe y Mäder, 2012).

Este sistema de formación *in situ* introducido por Dunn y colaboradores (Dunn y col., 1990), se basa en un polímero biodegradable insoluble en agua disuelto en un solvente orgánico biocompatible hidrosoluble. En esta solución polimérica o formulación se añade la droga para obtener la solución final del fármaco o dispersión. Este sistema polímero-solvente-fármaco tiene una consistencia viscosa, pero puede ser inyectado por vía intramuscular o subcutánea con jeringa y aguja convencionales. Cuando se inyecta esta formulación, se pone en contacto con el agua del medio fisiológico (*in vivo*) o del medio acuoso (*in vitro*) y, como resultado, el polímero precipita y forma una matriz de gel atrapando el fármaco *in situ*. El solvente se disipa y difunde fuera del sistema, rico en agua donde éste es soluble, mientras que el agua difunde hacia la matriz polimérica. Debido a la insolubilidad del polímero en agua, éste precipita o coagula al ponerse en contacto con el medio acuoso, resultando así en un implante polimérico sólido (Jain, 2000; Packhaeuser y col., 2004).

Este sistema tiene una serie de ventajas frente a los sistemas existentes, tales como procesos de fabricación relativamente sencillos, condiciones de preparación menos extremas, uso de solventes biocompatibles no tóxicos, y mayor aceptación por los pacientes (Packhaeuser y col., 2004).

El PLGA o PLA puede formularse como dispositivo de formación *in situ* basado en la precipitación del polímero. Dentro de los posibles solventes biocompatibles para la preparación de implantes de PLGA/PLA de formación *in situ* se encuentran: *N*-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido, 2-

pirrolidona, triacetina y polietilenglicol (Sautter, 2006). El efecto del solvente utilizado, la concentración de polímero y el peso molecular del polímero han sido investigados en sistemas de formación *in situ* de implantes para la LCD. Todos estos parámetros influyen en la velocidad de precipitación del polímero y la liberación del fármaco. El efecto explosivo inicial o efecto *burst* (del inglés explosión) ocurre cuando la cantidad de droga atrapada en el implante durante la precipitación es baja, y hay un “escape” de droga inicial. Las desventajas de esta liberación inicial explosiva y de corta duración son: i) falta de predicción y/o control, ii) menor droga disponible para ser liberada controladamente durante más tiempo, y iii) toxicidad local o sistémica por causa de las altas concentraciones de droga (Huang y Brazel, 2001). Algunos factores que afectan la magnitud del *burst* son la velocidad de formación *in situ* y la viscosidad de la formulación. Se ha reportado un mayor efecto *burst* inicial a bajas concentraciones de polímero y al usar solventes capaces de difundir rápidamente de la matriz polimérica (Brodbeck y col., 1999a; Lambert y Peck, 1995; Liu y Venkatraman, 2012; Wang y col., 2004). Es por esto que se deben tener en cuenta estos y otros factores a la hora de diseñar un dispositivo de formación *in situ* para la LCD.

Un dispositivo polimérico biodegradable va a liberar la droga controladamente por tres posibles mecanismos: hinchamiento del polímero, difusión del fármaco fuera del polímero, y erosión del polímero. El mecanismo que se produzca a mayor velocidad será el que domine la liberación (Schliecker, 2003). Si la erosión del polímero controla la liberación, este proceso ocurre a mayor velocidad que los otros dos procesos. De lo contrario, la liberación del fármaco puede estar controlada tanto por el hinchamiento como por la difusión de la droga, como se muestra en la **Figura 1.11**.



Figura 1.11. Posibles mecanismos de liberación del fármaco a partir de polímeros degradables. Figura reproducida de Göpferich y Schliecker (Göpferich, 1997a; Schliecker, 2003).

Por lo tanto, sólo los polímeros que se erosionan rápidamente son candidatos adecuados para controlar la liberación del fármaco por erosión solamente. De lo dicho anteriormente, es obvio que estos polímeros son aquellos que se erosionan por superficie, dado que poseen enlaces rápidamente hidrolizables, tales como los poli(anhídridos) y poli(orto-ésteres). Sin embargo, la erosión *bulk* y de superficie son casos extremos y el mecanismo de erosión de un polímero degradable muestra características usualmente de ambos. Además de la difusión y la degradación, otros factores tales como la absorción de agua, que depende de la hidrofiliidad del polímero, afecta al comportamiento erosivo sustancialmente (Göpferich, 1997a).

1.7 Liberación controlada de drogas para el tratamiento del cáncer

El desarrollo de formulaciones inyectables para la LCD ha tenido especial interés en el área de tratamiento contra el cáncer, con la finalidad de minimizar los efectos tóxicos secundarios y aumentar los efectos carcinostáticos del fármaco (Pentecost, 1993).

Actualmente, la opción de tratamiento más curativo para tumores sólidos es la resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante o terapia de radiación para reducir al mínimo el riesgo de recurrencia. Muchos tipos de tumores responden bien a este tratamiento, sin embargo no todos los tumores pueden ser resecados quirúrgicamente. Las limitantes para la resección quirúrgica son: tamaño del tumor, más de un lóbulo hepático afectado (en el caso de tumores hepáticos), y la coexistencia de otra enfermedad (como por ejemplo cirrosis en cáncer hepático, enfermedad quística en cáncer renal, etc.) (Weinberg y col., 2008). Además, la tasa de supervivencia global para estos pacientes aún después de la cirugía es a menudo baja (Jemal y col., 2006). La administración intravenosa de quimioterápicos a estos tumores también tiene una efectividad limitada. Debido a que una pequeña cantidad del flujo sanguíneo sistémico se dirige al tumor, sólo una fracción de la dosis total se dirige al tejido afectado (Dowell y col., 2000). El resto de la dosis es distribuída a través de órganos y tejidos sanos, resultando en una serie de efectos secundarios adversos no deseados (Crawford y col., 2004). Además, muchas drogas anticancerígenas poseen una remoción plasmática (del inglés, *clearance*) elevada, que conduce a cortos tiempos de exposición al tumor (El-Kareh y Secomb, 2000). Para mejorar el pronóstico de estos pacientes con cáncer, nuevas terapias mínimamente invasivas y terapias locorregionales han evolucionado rápidamente, recibiendo considerable atención en los últimos años (Gillams, 2005).

Para aumentar la exposición de la droga anticancerígena al tumor, limitando a la vez la toxicidad sistémica, la administración de la misma puede realizarse de manera locorregional, en la región que contiene al tumor, ó intratumoral, directamente dentro del tumor. Una estrategia para la

quimioterapia locorregional es la infusión de una solución conteniendo un agente quimioterapéutico en la región afectada. Este tratamiento requiere que las células malignas estén en contacto directo con el espacio circundante donde la quimioterapia es administrada (Weinberg y col., 2008). El tratamiento intratumoral extiende el concepto de tratamiento locorregional, tratando de limitar aún más el alcance de la exposición a los quimioterápicos. Dentro de los tratamientos para la quimioterapia intratumoral se encuentran: infusiones, inyecciones y dispositivos implantables intratumorales que suministran la droga anticancerígena u otro agente terapéutico (Goldberg y col., 2002). Las inyecciones intratumorales de soluciones terapéuticas han demostrado tener éxito en el tratamiento de tumores ubicados en diferentes lugares tales como cerebro, pulmón, páncreas e hígado (Goldberg y col., 2002). Sin embargo, una desventaja de esta terapia es que los líquidos inyectados pueden distribuirse irregularmente y sufrir un rápido clearance. Es por esto que varios trabajos han introducido los depósitos de drogas inyectables con el fin de prolongar la liberación del fármaco. Ejemplos de depósitos intratumorales incluyen microesferas y geles inyectables que solidifican tras la inyección intratumoral de PLGA, alginato y albúmina (Weinberg y col., 2008). Dentro de los depósitos intratumorales a base de PLGA, se han reportado microesferas cargadas con doxorubicina, carboplatino y 5-fluorouracilo (Emerich y col., 2002; Menei y col., 2004), y formulaciones inyectables que solidifican *in situ* conteniendo carboplatino y fluoresceína (Krupka y col., 2006; Patel y col., 2010). Estos depósitos inyectables tienen la ventaja de una fácil administración y la exposición prolongada de drogas al tumor evitando el daño a otras células. La utilización de implantes intratumorales para la liberación controlada de quimioterápicos, como terapia paliativa contra el cáncer, mostró ser una alternativa prometedora en los últimos años.

Para tumores que no son accesibles desde el exterior, las alternativas para el tratamiento locorregional son la perfusión local, o la administración de un agente quimioterapéutico a un segmento de la circulación que perfunde al tumor. La administración intraarterial de quimioterápicos puede maximizar la administración de la droga a los vasos sanguíneos que alimentan el tumor. Dentro de los tratamientos más comúnmente utilizados para el manejo intraarterial de tumores, la quimioembolización es la técnica de elección. Esta terapia nace de la embolización, procedimiento no quirúrgico, mínimamente invasivo realizado por angiografía intervencionista, para ocluir selectivamente los vasos sanguíneos a través de la introducción intencional de un émbolo. Esta oclusión, con un agente embolizante (sólido, líquido o particulado), bloquea el suministro sanguíneo para el tratamiento de aneurismas, malformación arteriovenosa,

fístulas, tumores, y hemorragias, entre otras patologías vasculares. La quimioembolización, por su parte, se utiliza para el tratamiento de tumores, agregando a esta oclusión una infusión simultánea de una droga quimioterápica en la arteria que lo irriga y alimenta (Pentecost, 1993; Ramsey y col., 2002). La quimioembolización busca liberar una alta carga de quimioterápicos a las células tumorales, prolongar el tiempo de contacto entre la droga y las células cancerosas, y disminuir la toxicidad sistémica. La combinación de concentraciones elevadas de agentes quimioterápicos y cierto grado de isquemia en el tumor parece tener un efecto sinérgico en lograr la necrosis del tumor, disminuyendo su tamaño o impidiendo que éste aumente (Ramsey y col., 2002).

La quimioembolización comenzó a utilizarse para tratar el carcinoma hepatocelular (HCC, del inglés *hepatocellular carcinoma*), uno de los tipos de cáncer más comunes en el mundo que causa en la mayoría de los casos la muerte del paciente (Hussain y col., 2001). Es la terapia paliativa de elección en pacientes con HCC no resecables y/o transplantables, aumentando en muchos casos la sobrevivencia del paciente, utilizándose también como terapia preoperatoria para el trasplante y la resección (Bruix y Sherman, 2005). La quimioembolización para el tratamiento de HCC se beneficia del hecho de que la mayoría de estos tumores se alimentan principalmente a través de la arteria hepática mientras que el hígado normal recibe su suministro de sangre en gran medida desde la vena porta (Pentecost, 1993; Ramsey y col., 2002). Al bloquear la arteria hepática se consigue una necrosis isquémica y eso aumenta el contacto entre el tumor y los agentes quimioterapéuticos. Tres a seis semanas después de la quimioembolización, el tumor se suaviza, el estroma se vuelve más permeable, permitiendo mejor difusión y mayor eficacia del agente quimioterápico (Ramsey y col., 2002). Se ha demostrado que esta terapia aumenta la concentración del quimioterápico en el tumor 10 a 100 veces y mejora en un 20% la sobrevivencia de los pacientes con HCC irresecable en un año. Como resultado, la quimioembolización se ha convertido en una terapia comúnmente utilizada en el tratamiento de HCC, y se ha empezado a utilizar en el tratamiento de otros tumores hipervascularizados, tales como los fibromas uterinos (Golzarian y col., 2010).

En este tratamiento, esquematizado en la **Figura 1.12**, un catéter es colocado selectivamente en las ramas de la arteria que alimentan al tumor (en este caso, la arteria hepática). Una vez que se selecciona la arteria deseada, se administra por el catéter un cóctel de quimioterapéuticos disueltos en etiodol, agente oleoso con gran afinidad por las células tumorales, que sirve como depósito para los fármacos. Luego, se inyecta un agente embolizante, obteniéndose así la oclusión vascular y el depósito de los fármacos (Ramsey y col., 2002). Los procedimientos para esta terapia

no están propiamente estandarizados, debido a la variedad de drogas, agentes embolizantes y protocolos utilizados. Esto puede afectar significativamente los resultados de los tratamientos (Shi y Ping Guo, 2012).

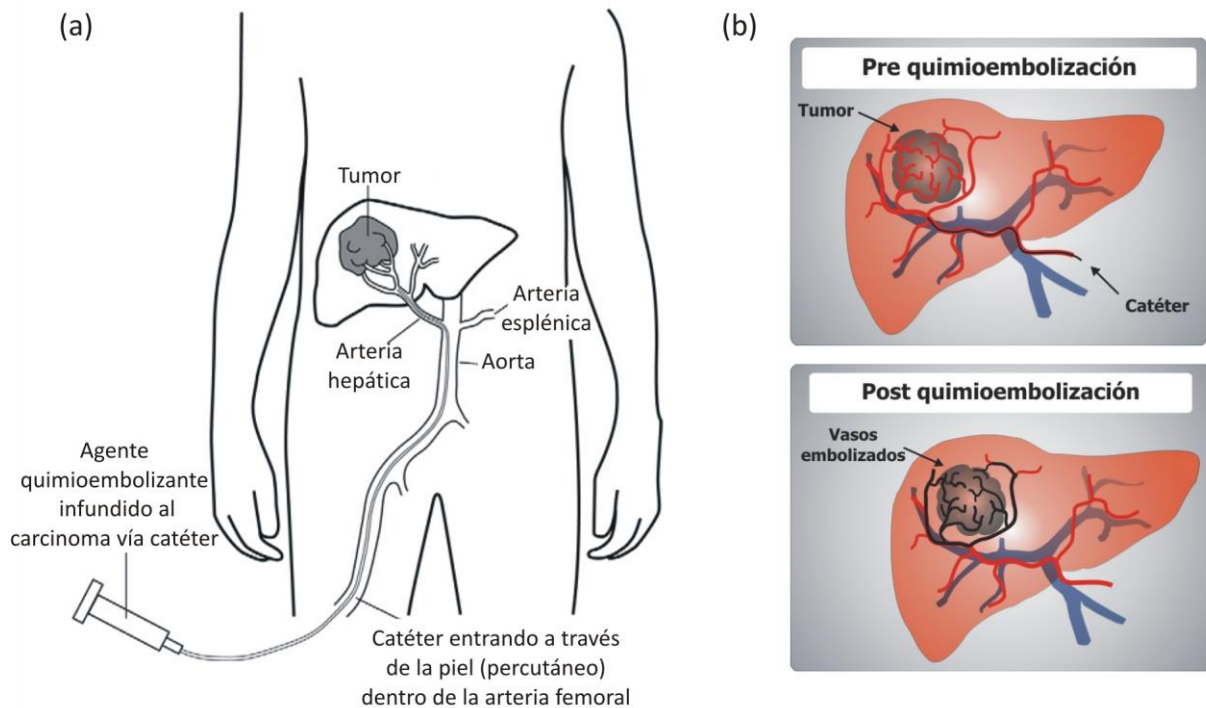


Figura 1.12. Diagrama esquemático de a) colocación de un catéter a través de la arteria femoral en la rama de la arteria hepática que alimenta a un tumor. Un agente quimioembolizante se suministra a la masa cancerosa vía catéter. El catéter también se puede introducir a través de una punción en otras arterias, tales como la arteria braquial; b) procedimiento de quimioembolización arterial para HCC. Gráficos adaptados de Tam y colaboradores (Tam y col., 2011) y de García Mónaco (García Mónaco, 2011).

Los agentes antitumorales más utilizados para esta terapia son la doxorubicina, la mitomicina y el cisplatino, que suelen combinarse en cócteles (Llovet y Bruix, 2008; Ramsey y col., 2002). También se ha propuesto el uso de paclitaxel, droga que actúa interfiriendo e inhibiendo el crecimiento y la dispersión de las células tumorales, y que además inhibe la formación de nuevos vasos en la región tratada (Hunter y col., 1998).

Para este procedimiento, no es conveniente que se produzca la oclusión permanente de la arteria debido a que i) la arteria debe recanalizarse para permitir la repetición del tratamiento (Coldwell y col., 1994), y ii) estudios *in vitro* han mostrado que la hipoxia prolongada induce la selección a células neoplásicas más agresivas (Park y col., 2008).

El agente de oclusión vascular biodegradable comúnmente utilizado en los procedimientos de quimioembolización es una esponja de gelatina conocida como gelita (en inglés, *gelfoam*). El nivel

de oclusión que éste agente genera depende de su tamaño y preparación (torpedos, cubos, suspensión, polvo) (Sharafuddin y col., 2006) (ver **Figura 1.13**), siendo el resultado del tratamiento poco previsible. Por otro lado, se ha observado oclusión permanente con este material a causa de la reacción inflamatoria que provoca (Golzarian y col., 2006). Otros agentes utilizados en los procedimientos de quimioembolización, como el polivinilalcohol, son no biodegradables, y ocluyen de manera permanente la vía (Golzarian y col., 2006; Ramsey y col., 2002). Tanto la gelita como el polivinilalcohol son sólo agentes oclusivos, esto es embolizantes y no quimioembolizantes. Son incapaces de contener droga y liberarla como tal, por lo que se usan en conjunto con un cocktail de drogas más etiodol, para efectuar un taponamiento posterior.

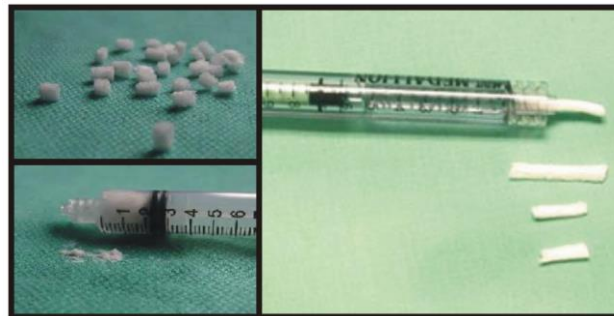


Figura 1.13. Material embolizante gelita cortadas a partir de láminas en cubos (izquierda), y tipo torpedo (derecha)

En los últimos años, se empezaron a utilizar las primeras plataformas de LCD para uso en quimioembolización. Consisten en microesferas calibradas capaces de adsorber drogas quimioterápicas, y liberarlas de una manera controlada. Las mismas están fabricadas a partir de materiales no biodegradables como polivinilalcohol, cerámica y vidrio, y polímero de acrilamida (superabsorbentes) (Kritzinger y col., 2013), aunque algunos autores reportan la recanalización de la vía luego del procedimiento con estos agentes.

Actualmente no se utilizan terapéuticamente agentes embolizantes biodegradables para la LCD para uso en técnicas de quimiembolización. Como se dijo anteriormente, los dispositivos biodegradables embolizantes son incapaces de cargar droga, además de ocluir los vasos de una manera poco predecible, aportando un factor más a la no estandarización de la técnica.

Resulta de gran interés el desarrollo de un dispositivo inyectable de formación *in situ* reabsorbible para uso como implantes intratumorales y/o quimioembolizantes para el tratamiento de distintos tipos de tumores. Dichos dispositivos cuentan con las ventajas de la tecnología de formación *in*

situ, permitiendo entrapar y liberar drogas controladamente y degradarse de manera predecible. El uso de PLGA como material reabsorbible para estos dispositivos garantizaría además la aceptación de esta tecnología por los organismos regulatorios, y la simplificación de los pasos para su aprobación.

2 Objetivos

2.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo de tesis es el desarrollo de un novedoso sistema inyectable para la LCD para su uso en terapias contra el cáncer. Se propone el uso de formulaciones que precipitan *in situ* formando un implante, para su inyección directa en el tumor (terapias intratumorales) o endovascular para uso en técnicas de quimioembolización (terapias locorreregionales). Para tal fin, se plantea utilizar la tecnología de formación de implantes *in situ* por inversión de fases, por precipitación de una formulación de PLGA. Esta formulación deberá permitir: i) la formación del implante por precipitación total del polímero, ii) la liberación de drogas quimioterápicas desde la matriz polimérica y iii) la gradual degradación de la matriz en contacto con el medio fisiológico en un período de 1 a 2 meses.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos planteados en este trabajo de tesis son:

- i) Caracterizar formulaciones de PLGA para la formación *in situ* de implantes y seleccionar formulaciones en base a su inyectabilidad y su velocidad de precipitación para distintas aplicaciones. Estudiar el efecto del agregado de aditivos en las propiedades físicas de estas formulaciones.
- ii) Estudiar la degradación y erosión *in vitro* de implantes formados *in situ*, a partir de las formulaciones seleccionadas, en ensayos simulando condiciones fisiológicas.
- iii) Estudiar la degradación y erosión *in vivo* de implantes formados *in situ*, a partir de las formulaciones seleccionadas, en ensayos llevados a cabo en ratas. Analizar los patrones de degradación/erosión *in vitro* e *in vivo*, tratando de establecer correlaciones *in vitro* - *in vivo*.
- iv) Estudiar la degradación heterogénea de los implantes formados *in situ*, a través de la utilización de un modelo sin problemas difusionales, como son las microesferas preformadas de tamaños menores a 10 micras. Para esto, se evaluará la degradación de microesferas incubadas en dos sistemas límites: en un medio acuoso a pH no regulado (para imitar la hidrólisis autocatalítica dentro de la matriz polimérica), y en un medio acuoso mantenido a pH 7,4 (para simular la degradación en la superficie del polímero). Proponer un modelo del mecanismo de degradación de los implantes.
- v) Estudiar la liberación *in vitro* a partir de estos dispositivos, de drogas anticancerígenas como el paclitaxel. Interpretar los perfiles de liberación obtenidos, teniendo en cuenta los procesos de difusión de la droga, el hinchamiento y la erosión de la matriz polimérica.

- vi) Evaluar la biocompatibilidad de las formulaciones seleccionadas, a través del estudio histopatológico y la observación clínica de animales inyectados por vía subcutánea e intrararterial.
- vii) Seleccionar el modelo animal y las condiciones óptimas para los ensayos. Poner a punto protocolos de procedimientos de embolización en animales de experimentación.
- viii) Estudiar las formulaciones en cuanto a su aplicación, ensayándolas como material embolizante, para su uso futuro en técnica de quimioembolización. Estudiar la penetrabilidad de una formulación modelo.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

Las siguientes sustancias químicas fueron utilizadas como se recibieron:

3.1.1 Polímero

Poli(D,L-lactido-co-glicolido) 50:50 grado RG 502H (PLGA 502H) fue provisto por Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim (Alemania). El peso molecular promedio en peso (M_w) y el peso molecular promedio en número (M_n) del PLGA RG 502H se determinaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*), obteniéndose $M_w = 7,3$ kDa, $M_n = 1,9$ kDa, e índice de polidispersidad (I_p) $M_w/M_n = 3,8$. Detalles del procesamiento de los datos de SEC se encuentran en la **Sección 3.2.15**.

3.1.2 Solventes

Dimetilsulfóxido (DMSO), 2-pirrolidona (2P) y triacetina (TR) fueron provistos por Sigma-Aldrich (Argentina); ácido trifluoroacético (TFA) (Uvasol®) fue provisto por Merck (Argentina), acetonitrilo (ACN) fue provisto por J.T. Backer, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), y acetato de etilo, fueron provistos por Cicarelli (Argentina).

3.1.3 Sales y otros excipientes

Cloruro de sodio (NaCl), fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4) fosfato de sodio dibásico (NaH_2PO_4), azida sódica (NaN_3), hidróxido de sodio (NaOH), dodecil sulfato de sodio (SDS), polivinil alcohol (PVA), y polivinilpirrolidona fueron provistos por proveedores locales. Tantalio en polvo 99,9% (60-100 mesh), tween 80 y *N,N*-dietilnicotinamida fue provisto por Aldrich (Sigma Aldrich Argentina).

Para preparar las soluciones se utilizó agua destilada y desionizada (agua-dd).

3.1.4 Medios de ensayo

Para los ensayos de degradación se utilizaron dos medios: PBS y SS. Para los ensayos de liberación de droga se utilizó un medio solubilizante de la droga (paclitaxel) PBS-SDS.

Los medios se prepararon de la siguiente manera:

- **PBS.** Solución buffer fosfato salina pH 7,4, que provee la fuerza iónica fisiológica y el pH tamponado. Se preparó disolviendo 8,77 g de NaCl, 11,5 g de Na_2HPO_4 , 2,28 g de NaH_2PO_4 y 0,2 g de NaN_3 como agente conservante en 1 L de agua-dd. El pH de la solución fue ajustado a 7,4 usando NaOH.

- **SS.** Solución salina, que provee la fuerza iónica fisiológica sin efecto tampón. Se preparó disolviendo 8,77 g de NaCl y 0,2 g de NaN₃ como agente conservante en 1 L de agua-dd. El pH inicial de la solución fue 6,4.
- **PBS-SDS.** PBS con SDS al 0,3 % p/v.

3.1.5 Otros insumos

Para los ensayos de formación *in vitro* de implantes y de degradación *in vitro* se utilizaron bolsas de diálisis (membranas de diálisis de tubo de celulosa, peso molecular de corte: 12,4 kDa, ancho plano medio: 10 mm, diámetro lleno medio: 6 mm), provista por Sigma (Sigma Aldrich, Argentina).

Para las técnicas analíticas, los solventes se filtraron con filtros de discos de nylon (tamaño de poro 0,22 y 0,45 µm), provistos por Microclar (Argentina), y las muestras para cromatografía se filtraron con filtros de jeringa de nylon (tamaño de poro 0,45 µm, MINISART NY), provistos por Sartorius. Para esterilizar los solventes para su uso en experimentación con animales, se utilizaron filtros de jeringa estériles de nylon (tamaño de poro 0,22 µm, MINICLAR), provistos por Microclar.

3.1.6 Insumos para el trabajo con animales

Para realizar los ensayos en animales se utilizaron los insumos enumerados a continuación:

- Jeringas de 1, 3, 5 y 10 mL, agujas 0,5x16 mm; 0,8x50 mm, y cánulas tipo Abocat de 20, 22 y 24G de calibre, fueron provistos por Terumo.
- Introdutor radial 5 French (F), catéteres 4 F (FR4), y guías de 0,021" y 0,014", fueron provistos por Cordis y Terumo.
- Microcatéter 3 F RapidTransit™, fue provisto por Cordis.
- Solución antiséptica para desinfección del área de aplicación (iodopovidona), anestésicos (ketamina, acepromacina, xilacina, lidocaína), solución para eutanasia y solución fisiológica (9 g/L ClNa), fueron provistos por proveedores locales.
- Medio de contraste iodado Urografina 76%, fue provisto por Bayer Healthcare.
- Material de cirugía, hilos y agujas para suturar

3.2 Métodos

1era parte: Caracterización de formulaciones para formación *in situ* de implantes. Elección de formulaciones de estudio

3.2.1 Preparación de formulaciones de PLGA

Se prepararon soluciones poliméricas (formulaciones) mezclando en frascos de vidrio, 200, 300, 400 y 500 mg de PLGA con 1 mL de solvente (puro o una mezcla de DMSO:2P ó DMSO:TR) hasta disolución completa, como se detalla en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 Formulaciones a base de PLGA 502H utilizadas para el estudio de viscosidad

Formulación	PLGA (mg)	DMSO (mL)	cosolvente (mL) ^a
PLGA20	200		
PLGA30	300	1	0
PLGA40	400		
PLGA50	500		
PLGA20/TR25 ó PLGA20/2P25	200		
PLGA30/TR25 ó PLGA30/2P25	300	0,75	0,25
PLGA40/TR25 ó PLGA40/2P25	400		
PLGA50/TR25 ó PLGA50/2P25	500		
PLGA20/TR50 ó PLGA20/2P50	200		
PLGA30/TR50 ó PLGA30/2P50	300	0,5	0,5
PLGA40/TR50 ó PLGA40/2P50	400		
PLGA50/TR50 ó PLGA50/2P50	500		
PLGA20/TR75 ó PLGA20/2P75	200		
PLGA30/TR75 ó PLGA30/2P75	300	0,25	0,75
PLGA40/TR75 ó PLGA40/2P75	400		
PLGA50/TR75 ó PLGA50/2P75	500		
PLGA20/TR100 ó PLGA20/2P100	200		
PLGA30/TR100 ó PLGA30/2P100	300	0	1
PLGA40/TR100 ó PLGA40/2P100	400		
PLGA50/TR100 ó PLGA50/2P100	500		

^a cosolvente: 2P ó TR

3.2.2 Caracterización de formulaciones de PLGA

3.2.2.1 Determinación de la densidad de las formulaciones

La densidad del PLGA y sus formulaciones se determinó con un picnómetro calibrado con termómetro de 5 mL (FITE, S.A.C.I.), a 25 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.2.2 Determinación de la viscosidad de las formulaciones

La viscosidad de las formulaciones se obtuvo usando viscosímetros capilares (Cannon Fenske Routine Viskosimeter, Alemania). Se utilizaron capilares tipo Cannon Fenske Nº 75, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450 y 500. Las mediciones se realizaron a $25 \pm 0,5$ °C. Se aplicaron correcciones de tiempo de flujo según las instrucciones operativas de cada capilar, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. El tiempo de flujo superó los 240 s en todas mediciones. Las mediciones se realizaron por triplicado.

La viscosidad cinemática ν (en cSt) se calculó según la **Ecuación 3.1**.

$$\nu = t \cdot k_{cap} \tag{3.1}$$

Donde t es el tiempo de flujo de la formulación (en s) y k_{cap} es la constante del capilar utilizado (en mm^2/s).

La viscosidad dinámica η (en cP) se calculó según la **Ecuación 3.2**.

$$\eta = \delta \times \nu \tag{3.2}$$

Donde δ es la densidad de la formulación a la temperatura del ensayo (25 °C).

3.2.3. Estudio del efecto de tantalio sobre la viscosidad de las formulaciones

El efecto sobre la viscosidad por la adición de polvo de tantalio como agente radiopaco (0,3 g por cada mL de solvente) fue evaluado en las formulaciones en estudio, siguiendo la metodología detallada en la sección anterior (**Sección 3.2.2**).

3.2.4. Estudio del efecto de polivinilpirrolidona sobre la viscosidad de las formulaciones

El efecto sobre la viscosidad por la adición de polivinilpirrolidona como excipiente (0,05 g, 0,1 g y 0,15 g por cada mL de solvente) fue evaluado en las formulaciones en estudio, siguiendo la metodología detallada en la **Sección 3.2.2.**

3.2.5 Ensayo de liberación de solvente. Caracterización de la formación *in situ* de implantes de PLGA

Para caracterizar la formación *in situ* de los implantes se determinaron los perfiles de liberación del solvente o mezcla de solventes de las formulaciones durante el proceso de inversión de fases como medida de la velocidad de precipitación de las formulaciones.

Para esto, un volumen de 0,2 mL de solución polimérica se colocó en bolsas de diálisis (n=3). Las bolsas se colocaron luego en frascos conteniendo 10 mL de PBS. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en un agitador orbital (Vicking, M-23) a 50 rpm. A los 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h, se tomaron 0,1 mL de muestra, que fueron reemplazados por medio fresco. Luego de una dilución apropiada, las muestras se filtraron, y se determinó el contenido de solventes (DMSO, 2P, TR) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*), como se detalla en el **Anexo 1.**

2da parte: Caracterización de implantes formados *in situ* y su degradación *in vitro*

3.2.6 Formación *in vitro* de implantes

Los implantes de PLGA fueron formados *in situ* mediante inversión de fases, concepto introducido por Dunn (Dunn y col., 1990). El PLGA disuelto en un solvente biocompatible soluble en agua se inyecta en un medio acuoso. El solvente difunde hacia fuera, mientras que el agua difunde hacia dentro del sistema polimérico. El polímero, debido a su insolubilidad, solidifica en contacto con agua formando así un implante polimérico sólido.

Un volumen de formulación correspondiente a 75 mg de PLGA (M_0) se colocó en bolsas de diálisis previamente hidratadas y selladas en su parte inferior. Luego, las bolsas se colocaron dentro de viales de vidrio conteniendo 10 mL de medio PBS para la formación del implante *in situ*.

3.2.7 Ensayo de degradación *in vitro* de implantes formados *in situ*

Los implantes se formaron como se detalla en la sección anterior. Los ensayos de degradación se llevaron a cabo en un medio pH regulado (Imp-PBS) a 37 °C en un agitador orbital a 50 rpm. El pH

del medio se determinó a diario durante toda la experiencia. Cada vez que el pH llegó a 7, se lavaron los implantes tres veces con agua-dd, y se reemplazó el medio por PBS fresco, en orden de mantener el pH del medio cercano a 7,4. A distintos tiempos de degradación, durante 50 días, se recuperaron los implantes cortando cuidadosamente con un bisturí la bolsa de diálisis, se lavaron tres veces con agua-dd, y se pesaron (masa residual húmeda $M_H(t)$). Luego, los implantes se secaron al vacío hasta pesada constante para obtener la masa residual seca ($M_S(t)$). Los implantes secos fueron guardados a -20 °C para posteriores análisis. El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.8 Caracterización de la degradación *in vitro* de implantes formados *in situ*

Para caracterizar la degradación de los implantes, a cada punto muestral se le determinó:

- Contenido de solvente remanente en la matriz polimérica
- Monitoreo del pH del medio de degradación
- Morfología de la matriz polimérica
- Masa remanente y fracción de agua de la matriz polimérica
- AL y AG en el implante remanente y en el medio de degradación
- Distribución de peso molecular (DPM), M_w y M_n de la matriz polimérica

3.2.9 Contenido de solvente remanente en los implantes

El contenido remanente de solvente (DMSO, 2P, TR) en el implante se determinó por cromatografía gaseosa (GC, del inglés *Gas Chromatography*). Los detalles de la técnica analítica utilizada se detallan en el **Anexo 2**.

3.2.9.1 Preparación de muestras para GC

Para tomar una muestra representativa de los implantes, los mismos se homogeneizaron como se detalla a continuación. Cada implante remanente se disolvió en 200-300 μ L de DCM. Una alícuota de la disolución correspondiente a aproximadamente 2 mg de PLGA se colocó en tubos tipo eppendorf y se secó al vacío hasta pesada constante (*mg implante seco*). Dicha masa se redisolvió en DCM, y se inyectó en el cromatógrafo gaseoso para la cuantificación del contenido de solvente, como se detalla en el **Anexo 2**.

El solvente residual en el implante se calculó según la **Ecuación 3.3**.

$$\text{Solvente residual (\%)} = \frac{\text{mg solvente}}{\text{mg implante seco}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

3.2.10 Monitoreo del pH

La evolución del pH en el medio de degradación fue monitoreada con un potenciómetro (Orion* 3-Star Plus pH Benchtop Meter) en cuatro muestras de implantes formados *in situ* seleccionadas al azar. Para determinar el valor del pH en el medio de degradación, se retiraron las bolsas de diálisis conteniendo los implantes y se escurrieron dentro de los viales. Luego de la determinación del pH, las muestras se colocaron nuevamente bajo agitación a 37 °C para continuar con los ensayos de degradación.

3.2.11 Caracterización morfológica de implantes formados *in situ* y su degradación

A los 3, 12, 22 y 33 días de incubación, se caracterizaron morfológicamente los implantes formados *in situ* y su degradación *in vitro*, por microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*). Luego, se estudio la morfometría de los implantes a través del análisis de las imágenes SEM.

3.2.11.1 Microscopía electrónica de barrido

Los implantes húmedos fueron fracturados transversalmente a la temperatura del nitrógeno líquido, colocados sobre tacos de aluminio y secados al vacío.

Todas las muestras así preparadas fueron recubiertas con oro bajo atmósfera de argón con un equipo de sputtering (SPI SUPPLIES, 12157-AX) en tres sesiones de 10 segundos a 16 mA.

Las fotomicrografías SEM fueron obtenidas usando un equipo JEOL JSM-35C acoplado a un programa de adquisición de imágenes (SemAfore, JEOL), con un voltaje de aceleración de 20 kV.

3.2.11.2 Análisis de imágenes

Las fotomicrografías a distintos tiempos de degradación se analizaron utilizando un programa de procesamiento de imagen libre (ImageJ 1.40g, National Institutes of Health). En los implantes se determinó: tamaño de poro de la matriz esponjosa (diámetro de poros expresado en μm , y área de poros expresada en μm^2 para poros no esféricos), densidad de poros (cantidad de poros por área expresado en poros/ μm^2), área porosa (área ocupada por poros/área total %), y área de canales (área ocupada por canales/área total %).

3.2.12 Determinación de masa remanente y fracción de agua

El porcentaje de masa remanente, $MR(t)$, se calculó según la **Ecuación 3.4**.

$$MR(t)(\%) = \frac{M_s(t)}{M_0} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Donde M_0 es la masa inicial de implante, y $M_s(t)$ es el implante final seco a un tiempo t , respectivamente.

La fracción polimérica ($F_{Polimero}$) de una matriz hinchada es una medida de la cantidad de fluido que la matriz puede incorporar en su estructura (Lowman y Peppas, 1999).

$$F_{Polimero} = \frac{V_{Polimero}}{V_{Matriz}} \quad (3.5)$$

Donde $V_{Polimero}$ y V_{Matriz} son el volumen ocupado por el polímero en la matriz y el volumen total de la matriz, respectivamente.

De la misma manera, y teniendo en cuenta la **Ecuación 3.5**, se puede definir a la fracción de agua (F_{H_2O}) de una matriz como:

$$F_{H_2O} = 1 - F_{Polimero} = \frac{V_{H_2O}}{V_{Matriz}} \quad (3.6)$$

Donde V_{H_2O} es el volumen ocupado por el agua en la matriz.

Estos parámetros se calcularon teniendo en cuenta los datos $M_s(t)$ y $M_H(t)$ (implante final seco y húmedo a un tiempo t), y conociendo la densidad del agua y del PLGA a la temperatura del ensayo ($\delta_{H_2O}^{37^\circ C} = 0,99337 \text{ g/mL}$ y $\delta_{PLGA}^{37^\circ C} = 0,93596 \text{ g/mL}$).

3.2.13 Corrección de la masa remanente de implantes

Para referir la masa remanente sólo al contenido de PLGA en la matriz, se utilizó el contenido de solvente residual (DMSO, 2P, TR) en el implante calculado en la **Sección 3.2.9**.

La masa remanente de PLGA corregida en el implante polimérico M_s^c se calculó según:

$$M_s^c (mg) = M_s (mg) \times \left(1 - \frac{\text{Solvente residual}(\%)}{100} \right) \quad (3.7)$$

Donde M_s^c es el implante seco corregido (a la masa de PLGA solamente), M_s es la masa de implante seco conteniendo solvente residual medido por gravimetría y *Solvente residual (%)* es el calculado con la **Ecuación 3.3**. En los puntos muestrales que contenían solvente, se calculó la $RM(t)$ (**Ecuación 3.4**) utilizando M_s^c en lugar de M_s .

3.2.14 Determinación de monómeros solubles AL y AG en la masa remanente y en el medio de degradación

La proporción de AL y AG en la masa remanente durante el transcurso de la degradación, se determinó sometiendo una determinada masa de implante a una hidrólisis alcalina, hasta total disolución del implante. De la misma manera se procedió a hidrolizar un determinado volumen de medio de degradación, para determinar en el mismo el contenido de AL y AG. Esto es debido a que, de la matriz, se desprenden ácidos solubles tanto en forma de monómeros como de oligómeros y, por otro lado, los ácidos tienden a auto-polimerizar formando compuestos más estables que evaden la determinación (Burkersroda y col., 1997; Staniforth y col., 1999). Entonces, para poder cuantificar en el medio los ácidos liberados como unidades monoméricas por HPLC, se sometieron las muestras a una hidrólisis alcalina. Para esto, se realizó una adaptación de la técnica reportada por Avgoustakis y colaboradores (Avgoustakis y col., 2002).

3.2.14.1 Tratamiento de las muestras

La hidrólisis alcalina se realizó de la siguiente manera:

- En fase sólida, cada implante remanente se homogeneizó disolviéndolo en el mínimo volumen posible de DCM (100-200 μ L) y agitándolo vigorosamente. Un volumen correspondiente a 2 mg de PLGA se colocó en tubos tipo eppendorf y se secó al vacío hasta pesada constante. Por cada miligramo de implante seco, se agregó 0,5 mL de NaOH 0,2 N.
- En fase soluble, se colocaron en tubos tipo eppendorf 0,5 mL de medio de degradación y se agregaron 0,5 mL de NaOH 0,2 N.

La hidrólisis se llevó a cabo toda la noche bajo agitación orbital, a 50 rpm y 43 °C.

Para neutralizar, se agregó 1 mL de HCl 0,2 N por cada mililitro de NaOH adicionado inicialmente.

Luego de una dilución apropiada, las muestras se filtraron, y se determinó el contenido de cada monómero por HPLC, como se detalla en el **Anexo 3**. El porcentaje de AL y AG remanente ($AL_{remanente}$ y $AG_{remanente}$) se calculó según la **Ecuación 3.8** y la **Ecuación 3.9**, respectivamente.

$$AL_{remanente}(\%) = \frac{AL(t)}{AL_0} \cdot 100 \quad (3.8)$$

$$AG_{remanente}(\%) = \frac{AG(t)}{AG_0} \cdot 100 \quad (3.9)$$

Donde AL_0 y AG_0 corresponden a la masa de AL y AG antes de comenzar con los ensayos de degradación, mientras que $AL(t)$ y $AG(t)$ corresponden a la masa de AL y AG cuantificadas a cada tiempo t de muestreo, respectivamente. AL_0 y AG_0 fueron calculadas conociendo la masa inicial de PLGA utilizada en cada ensayo (M_0) y la fracción másica del PLGA de partida.

3.2.15 Determinación de la distribución de peso molecular y pesos moleculares

El estudio de degradación de la matriz polimérica, indicado por la variación del peso molecular, se llevo a cabo por SEC. Detalles de la técnica analítica utilizada se encuentran en el **Anexo 4**.

3.2.15.1 Preparación de muestras para SEC

Dado que los implantes se degradan de manera no homogénea, estas muestras se homogeneizaron previamente para la determinación del peso molecular por SEC. Para esto, cada implante remanente se disolvió en 200-300 μ L de DCM. Una alícuota de la disolución correspondiente a 2 mg de PLGA se colocó en tubos tipo eppendorf y se secó al vacío hasta pesada constante. Dicha masa se redisolvió en THF a la concentración de trabajo, y se inyectó en el cromatógrafo para la determinación de DPM, M_w y M_n .

3.2.15.2 Procesamiento de datos

La estimación del peso molecular absoluto de PLGA por SEC presentó dos dificultades:

- i) Incertidumbre en la línea de base de los cromatogramas a altos volúmenes de elución;
- ii) Falta de una calibración directa en base PLGA

La incertidumbre i) se origina por perturbaciones introducidas por el solvente (THF), que eluye próximo a la amplia variedad de oligómeros de PLGA comúnmente presentes en una muestra degradada. Por lo que el pico de THF impide una determinación clara de la línea de base en el

cromatograma a altos volúmenes, que a su vez afecta principalmente el cálculo exacto de M_n (Mohd-Adnan y col., 2008). Para sistematizar el procesamiento de todos los cromatogramas crudos, el volumen de elución correspondiente al límite superior de la línea de base se seleccionó justo antes de la aparición del pico de THF.

La dificultad ii) impide un cálculo directo del peso molecular absoluto de las muestras de PLGA. Para saltar este problema, se aplicó el concepto de SEC de calibración universal (Sadao Mori, 1999). Para ello, el pico de peso molecular de cada estándar de PS (PM_{PS}) se transformó en un peso molecular equivalente al PLGA, aplicando la **Ecuación 3.10** (Meira y col., 2004):

$$\log PM_{PLGA} = \frac{1}{1 + \alpha_{PLGA}} \cdot \log \frac{K_{PS}}{K_{PLGA}} + \frac{1 + \alpha_{PS}}{1 + \alpha_{PLGA}} \cdot \log PM_{PS} \quad (3.10)$$

Donde (K_{PS} , α_{PS}) y (K_{PLGA} , α_{PLGA}) son las constantes de Mark-Houwink-Sakurada (M-H-S) para el PS y para el PLGA, respectivamente; y $\log PM_{PLGA}$ y $\log PM_{PS}$ representa el logaritmo decimal de PM_{PLGA} y PM_{PS} , respectivamente. Para PS y PLGA en THF como solvente, las siguientes constantes de M-H-S fueron utilizadas (Chiu y col., 1995; Kenley y col., 1987): $K_{PS}=0,011$ mL/g; $\alpha_{PS}=0,725$; $K_{PLGA}=0,0107$ mL/g; y $\alpha_{PLGA}=0,761$.

Una vez transformados los cinco pares de puntos de los estándares de PS (PM_{PS}, V_{PS}) a los correspondientes valores en PLGA, se ajustó un polinomio de tercer orden obteniendo la siguiente ecuación de ajuste ($R^2= 0,9997$):

$$\log PM(V) = -0,0005133 \cdot V^3 + 0,04972 \cdot V^2 - 1,686 \cdot V + 22,61 \quad (3.11)$$

Donde V es el volumen de elución para un dado peso molecular PM .

Combinando esta regresión con los cromatogramas corregidos por línea de base, se calculó la DPM de las muestras a cada tiempo de degradación. Con las DPM, se determinaron los pesos moleculares M_w y M_n .

3era parte: Caracterización de implantes formados *in situ* y su degradación *in vivo*

3.2.16 Formación *in vivo* de implantes

Los implantes de PLGA fueron formados *in situ* mediante inversión de fases. Las formulaciones a inyectar fueron preparadas de manera aséptica, utilizando solventes filtrados con filtros estériles, y colocadas en frascos estériles.

Ratas hembra de la cepa Wistar, de aproximadamente 3 meses de edad, se anestesiaron con una inyección intramuscular de ketamina–acepromazina (a una dosis de 2,4 y 48 mg/kg de peso, respectivamente). Una vez anestesiados los animales, la zona a inyectar fue rasurada y desinfectada. Luego, un volumen de formulación correspondiente a 75 mg de PLGA (M_0) se inyectó subcutáneamente en el dorso del animal. Por animal, se realizaron cuatro inyecciones de diferentes formulaciones.

3.2.17 Ensayo de degradación *in vivo* de implantes formados *in situ*

Los implantes se formaron como se detalla en la sección anterior. A los 3, 8, 12 y 22 días post inyección, se sacrificaron los animales, y se extrajeron los implantes formados *in situ*. La masa residual húmeda ($M_H(t)$) se pesó y luego se secó al vacío hasta pesada constante para obtener la masa residual seca ($M_S(t)$). Los implantes secos fueron guardados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análisis. El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.18 Caracterización de la degradación *in vivo* de implantes formados *in situ*

Para caracterizar la degradación de los implantes, a cada punto muestral se le determinó:

- Contenido de solvente remanente en la matriz polimérica. Se determinó como se detalla en la **Sección 3.2.9**.
- Morfología de la matriz polimérica. A los los 3 y 12 días de incubación, se caracterizaron morfológicamente los implantes formados *in situ* y su degradación *in vivo* por SEM, como se detalla la **Sección 3.2.11**.
- Masa remanente y fracción de agua de la matriz polimérica. El porcentaje de masa remanente, $RM(t)$, y la fracción de agua, F_{H_2O} , de los implantes, se calculó según la **Ecuación 3.4** y la **Ecuación 3.6**, presentadas en la **Sección 3.2.12**.
- DPM, M_w y M_n se determinaron según lo detallado en la **Sección 3.2.15**.

4ta parte: Estudio de la degradación heterogénea de implantes a través de microesferas

3.2.19 Síntesis de microesferas preformadas de PLGA

Las microesferas se obtuvieron por un proceso de extracción de solvente a partir de una emulsión aceite-en-agua (*o/w*, del inglés *oil-in-water*), adaptado de la técnica reportada por Sah (Sah, 1997), puesta a punto en nuestro laboratorio (Mariano, 2012).

Las emulsiones se formaron siguiendo la siguiente metodología:

- i) La **fase orgánica (o)** consistió en 5 mL de PLGA al 20% en acetato de etilo.
- ii) La **fase acuosa (w)** consistió en 15 mL de PVA al 2%.
- iii) La fase acuosa se colocó bajo agitación mecánica a 4000 rpm (Homogeinizador digital Ika® T-25 Ultra-Turrax® con rotor dispersante Ika® S25N-18G, Cole Parmer, Alemania).
- iv) La fase orgánica se goteó durante 2 min en la fase acuosa en agitación, formando una emulsión *o/w*.
- v) La emulsión se homogeneizó durante 10 min.

El proceso de extracción de solvente de la emulsión *o/w* se llevó a cabo siguiendo la siguiente metodología:

- i) A 7 mL de emulsión se adicionaron 25 mL de agua-dd y se homogeneizó bajo agitación magnética durante 60 min
- ii) Luego, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 10 mL de agua-dd. Este procedimiento se repitió tres veces. Por último, las microesferas se secaron al vacío a la temperatura del nitrógeno líquido hasta pesada constante y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.2.20 Determinación del tamaño de las microesferas de PLGA

Las microesferas se suspendieron en agua-dd y se observaron en un microscopio óptico (Leica DM 2500M) con una cámara acoplada (DFC 290HD) para la toma de fotomicrografías. El tamaño de las microesferas se determinó analizando las imágenes con un programa de procesamiento de imagen.

3.2.21 Ensayos de degradación *in vitro* de microesferas preformadas

Las microesferas se degradaron en dos sistemas límites: i) Me-PBS: en un medio acuoso tamponado y mantenido a pH 7,4 (para simular la degradación en la superficie del implante), y

ii) Me-SS: en un medio acuoso a pH no regulado (para imitar la hidrólisis autocatalítica dentro de la matriz polimérica). Para esto, 65 mg de microesferas (M_0) se colocaron en viales de vidrio conteniendo 10 mL de PBS (Me-PBS) ó SS (Me-SS).

Los ensayos de degradación se llevaron a cabo a 37 °C en un agitador orbital a 50 rpm. El pH del medio se determinó a diario durante toda la experiencia. En los frascos de Me-PBS, el pH se mantuvo en 7,4, al igual que en Imp-PBS. A tiempos preestablecidos, durante 50 días (para Me-PBS) y 40 días (para Me-SS), se retiraron las muestras, se centrifugaron, se lavaron tres veces con agua-dd y se secaron al vacío hasta pesada constante para obtener la masa residual seca ($M_s(t)$). Las microesferas secas fueron guardadas a -20 °C para posteriores análisis. El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.22 Caracterización de la degradación *in vitro* de microesferas

Para caracterizar la degradación *in vitro* de las microesferas preformadas, a cada punto muestral se le determinó:

- Monitoreo del pH: metodología detallada en la **Sección 3.2.10**. En este caso, fue necesario centrifugar las microesferas durante 5 min a 3500 rpm para poder efectuar la medición. Luego de la determinación del pH, las microesferas se resuspendieron con un agitador vortex (Vicking) para continuar con el ensayo.
- Morfología: Las microesferas se suspendieron en agua dd-y una gota de esta suspensión se colocó sobre un taco de aluminio a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del agua. El recubrimiento y la toma de las fotomicrografías, se realizó de acuerdo a lo descrito en la **Sección 3.2.11.1**.
- Masa remanente: El porcentaje de masa remanente, $RM(t)$, se calculó según la **Ecuación 3.4**, presentada en la **Sección 3.2.12**.
- DPM, M_w y M_n se determinaron según lo detallado en la **Sección 3.2.15**.

5ta parte: Liberación *in vitro* de paclitaxel a partir de implantes formados *in situ*

La determinación de paclitaxel (PTX) se realizó por HPLC, como se detalla en el **Anexo 5**.

3.2.23 Solubilidad de paclitaxel en diferentes medios de liberación

Se ensayó la solubilidad de PTX en los siguientes medios: PBS, PBS conteniendo SDS al 0,3% p/v (PBS-SDS), PBS conteniendo Tween 80 al 0,5% y 0,2% p/v y PBS conteniendo *N,N*-dietilnicotinamida 1M. A tubos tipo eppendorf conteniendo 1,5 mL de medio se le agregó 1,5 mg ó

7,5 mg de PTX. Estos tubos se sonicaron 30 min en baño ultrasónico (Cole-Palmer 8891) y se colocaron a 37 °C en un agitador orbital a 100 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron 5 min a 4000 rpm y el sobrenadante se filtró, se diluyó con fase móvil (ACN:metanol:agua 64:11:25), y se determinó por HPLC el contenido de PTX, como se detalla en el **Anexo 5**. El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.24 Solubilidad de paclitaxel en diferentes solventes

En un frasco de vidrio se agregaron 200 mg de PTX y 1 mL de solvente. Se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, se realizó un examen visual, considerando soluble (una única fase homogénea), parcialmente soluble (restos de PTX sin disolver), insoluble (PTX sin disolver). Durante el procedimiento no hubo evaporación de solvente. Se seleccionó una concentración tal de PTX que permitiera conocer si la droga se solubilizaba fácilmente en las proporciones a utilizar en los ensayos de liberación (máxima concentración utilizada en ensayos de liberación: 160 mg de PTX en 1 mL de solvente). El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.25 Obtención de formulaciones basadas en PLGA y paclitaxel

La masa de PLGA requerida por cada formulación se disolvió bajo agitación magnética en el solvente o mezcla de solventes hasta disolución completa. Luego, se agregó el PTX de manera tal de obtener una concentración de 10 y de 40% p/p en base a la masa de PLGA, agitando hasta obtener una solución.

3.2.26 Preparación de implantes formados *in situ*

Los implantes de PLGA fueron formados *in situ* mediante inversión de fases. Un volumen de formulación conteniendo la droga correspondiente a 75 mg de PLGA se colocó en viales circulares de 1,45 (0,02) cm (*media (DE)*) de diámetro. Luego, se agregó PBS-SDS a 37 °C lentamente por las paredes hasta llenar los viales de medio de liberación. Los viales así cargados se colocaron dentro de frascos conteniendo PBS-SDS a 37 °C, completando 50 o 100 mL de buffer, según si las formulaciones contenían 10 ó 40 % de PTX. Los frascos se colocaron a 37 °C en un agitador orbital a 50 rpm. A las 24 h, los implantes formados *in situ* se sacaron con la ayuda de una espátula y se lavaron con 5 mL de buffer PBS-SDS, para utilizar en: i) la determinación del contenido de PTX real dentro de los implantes, ii) ensayos de liberación de droga.

3.2.27 Eficiencia de entrampamiento de paclitaxel

Los implantes lavados se secaron al vacío, se pesaron ($M_{implante}$) y se disolvieron en 1 mL de DCM. La mezcla se homogeneizó con agitador vortex, quedando de color blanco. Luego, se adicionaron

6 mL de fase móvil y se volvió a homogeneizar con vortex hasta la obtención de una solución translúcida. Luego de una dilución apropiada, la concentración de PTX se determinó por HPLC, como se detalla en el **Anexo 5**. El cálculo de la cantidad de PTX atrapado (En) se realizó según la **Ecuación 3.12**:

$$En (\%) = \frac{M_{PTX}}{(M_{implante} - M_{PTX})} \cdot 100 \quad (3.12)$$

Donde En son los gramos de PTX atrapado cada 100 gramos de PLGA, M_{PTX} es la masa de droga cuantificada por HPLC y $M_{implante}$ es la masa de implante seco.

Estos resultados se compararon con la relación inicial entre PTX y PLGA ($[PTX]_{inicial}$) en la formulación líquida, para obtener la eficiencia de atrapamiento (Ee)

$$Ee (\%) = \frac{En}{[PTX]_{inicial}} \cdot 100 \quad (3.13)$$

El estudio fue realizado por duplicado.

3.2.28 Liberación *in vitro* de paclitaxel

Los implantes lavados se colocaron en frascos conteniendo 40 mL de medio de liberación previamente termostatizados a 37 °C. Este tiempo se consideró como día cero ($t=0$ días). Los frascos se incubaron a 37 °C bajo agitación orbital a 50 rpm perfectamente tapados. A intervalos de tiempo predeterminados, se tomaron muestras de medio hasta la liberación completa o finalización del ensayo. Durante cada muestreo, el 90% del volumen total de medio de liberación se reemplazó con medio fresco (36 mL) para asegurar las condiciones de dilución infinita o gradiente máximo (del inglés, *sink condition*). El estudio se llevó a cabo por duplicado.

La cuantificación del PTX liberado de las muestras filtradas se realizó por HPLC según la técnica detallada en el **Anexo 5**. El estudio fue realizado por duplicado.

6ta parte: Estudio en animales de formulaciones de PLGA de precipitación *in situ*

3.2.29 Estudio de la compatibilidad de implantes subcutáneos formados *in situ*

Implantes subcutáneos formados *in situ* fueron formados en ratas Wistar como se detalla en la **Sección 3.2.16**. En dichos implantes, se examinó la formación de cápsula fibrosa alrededor del implante, así como también posibles alteraciones de los implantes. La piel circundante al sitio de inyección se extrajo y se preparó para su evaluación por histopatología.

3.2.29.1 Preparación de tejidos para histopatología

Los tejidos se fijaron en buffer fosfato con formaldehído al 10% durante 24 h a temperatura ambiente. Luego, fueron deshidratados en alcohol e incluidos en parafina. Para la evaluación histopatológica, se tiñeron con hematoxilina-eosina secciones transversales de 4 μm de espesor.

3.2.29.2 Examen histopatológico de los tejidos

Se examinaron por microscopía óptica los cortes histológicos, donde se evaluó la infiltración al tejido de células del sistema inmune, la presencia de fibrina, exudado y la inducción de vascularización y estroma (matriz extracelular con vasos sanguíneos y fibroblastos).

3.2.30 Estudio del efecto radiográfico de los solventes sobre la arteria femoral

Se evaluó el efecto radiográfico que tenía la inyección directa de solvente sobre la arteria femoral de cerdos. Para tal fin, se trabajó con cerdos de aproximadamente 16 kg de peso corporal, de la manera que se detalla a continuación:

- i) Se anestesió el animal por vía intramuscular con una mezcla de acepromacina–ketamina (a una dosis de 1 y 15 mg/kg de peso, respectivamente). Se colocó y fijó un catéter Abocat 24 G en la vena auricular, para la administración endovenosa de propofol al 1% a respuesta. Luego, se intubó y se realizó ventilación asistida con oxígeno.
- ii) Se colocó el animal de cubito dorsal en una camilla, se expuso la parte interna del miembro posterior derecho (previamente rasurado), se palpó el pulso de la arteria femoral cercana a la ingle y se marcó con un fibrón indeleble su recorrido.
- iii) En la zona marcada, se desinfectó con iodopovidona, se realizó una inyección subcutánea de clorhidrato de lidocaína al 2%, y luego se disecó la arteria femoral realizando una incisión a 1-2 cm en la piel de la ingle y la fascia que recubre el paquete venoso para exponer la arteria femoral.
- iv) Una vez expuesta la arteria, se realizó una punción corriente abajo con una cánula Abocat 22G.

v) A través del catéter, se realizó una inyección continua de líquido de contraste y se tomó una placa radiográfica durante la inyección (placa basal, control).

vi) Se inyectaron 400 µL de solución fisiológica a velocidad rápida (10 s). Se esperaron 3 min, y se volvió a tomar una placa radiográfica con infusión de contraste.

vii) Se esperaron 5 min, y se inyectaron 400 µL de solvente filtrado con filtro de 0,22 µm estéril, a una velocidad lenta (90 s). Se sacaron placas radiográficas infundiéndole líquido de contraste de manera continua a los 3 y 5 min de la inyección de solvente.

viii) Se retiró la cánula y se realizó compresión sobre la arteria con una gasa durante 5 min, para asegurar la hemostasia. Se suturó la incisión con hilo no reabsorbible. Se administró, por vía intramuscular, analgesia y antibióticos, y, por vía endovenosa, solución fisiológica hasta la recuperación del animal de la anestesia.

Durante la intervención se realizó el monitoreo a través de la medición de la temperatura rectal (39 ± 1 °C), la frecuencia cardíaca (rango: 100-120 latidos/min) y la observación clínica del animal.

Con las placas radiográficas se analizó la presencia de estrechamiento del calibre arterial (vasoespasm) luego de la inyección del solvente. Para esto, se fotografiaron las placas radiográficas y se midieron los diámetros arteriales de la zona de la arteria afectada con un programa de procesamiento de imagen. Se realizaron 10 mediciones en cada placa, a distintas alturas del punto de punción.

El vasoespasm de la arteria afectada se determinó según la **Ecuación 3.14**.

$$\text{Vasoespasm} = \frac{D_t - D_0}{D_0} \cdot 100 \quad (3.14)$$

Donde D_t es el diámetro de la arteria a un tiempo t (3 ó 5 min) y D_0 es el diámetro de la arteria previo a la inyección de solvente.

Para definir la severidad del vasoespasm observado radiográficamente, se utilizó un sistema de puntuación reportado en la bibliografía (Chaloupka y col., 1999), según si el estrechamiento del vaso fue: nulo (grado 0), mínimo ($\leq 25\%$, grado 1), leve (entre 25 y 50%, grado 2); intermedio (entre 51 y 74%, grado 3), severo ($\geq 75\%$, grado 4), o profundo (resultando en pérdida de flujo anterógrado, grado 5).

3.2.31 Estudio de la recanalización de la arteria femoral

Se trabajó con tres cerdos de aproximadamente 16 kg de peso corporal, de la manera que se detalla en la **Sección 3.2.30** incisos i-v. Luego, se inyectó 160 μ L de formulación polimérica en dirección del flujo sanguíneo, ejerciendo presión corriente arriba de la inyección, de manera de provocar la precipitación cercana a la zona inyectada. A los 15 min post-inyección, se tomó una placa radiográfica de control durante la inyección continua de líquido de contraste. Luego, se procedió de manera similar al inciso viii de la **Sección 3.2.30**.

Durante la intervención se realizó el monitoreo a través de la medición de la temperatura rectal, la frecuencia cardíaca y la observación clínica del animal.

Luego de la intervención, se realizó diariamente una evaluación clínica de los animales. Se realizó una observación macroscópica del estado de la extremidad intervenida, teniendo en cuenta: color, aspecto, presencia de isquemia, grado de inflamación local, entre otros.

A los 5 días post inyección, se procedió con un cerdo como se detalla en la **Sección 3.2.30** incisos i-v, para tomarle una placa radiográfica de control durante la inyección continua de líquido de contraste en la zona intervenida. Luego, se sacrificó el animal con una inyección intracardíaca de solución para eutanasia, y se extrajo la sección de arteria femoral conteniendo el polímero para su evaluación histopatológica, como se detalla en **Sección 3.2.29**.

A los 16 y 25 días post inyección, se procedió al sacrificio de los animales, para extraerles la sección de arteria femoral afectada para su evaluación histopatológica, como se detalla en **Sección 3.2.29**.

3.2.32 Estudio de formulaciones poliméricas de PLGA para uso endovascular. Pruebas de penetrabilidad de las formulaciones

Se evaluó la penetrabilidad de una de las formulaciones radiopacas inyectables de precipitación *in situ* estudiadas, para su utilización en emboloterapia. Para tal fin, se trabajó con un conejo raza Neozelandés de aproximadamente 3 kg de peso corporal, de la manera que se detalla a continuación:

i) Se anestesió el animal por vía intramuscular con una mezcla de ketamina–xilacina–acepromacina (a una dosis de 48, 5 y 2,4 mg/kg de peso, respectivamente).

ii) Se colocó el animal de cubito dorsal en una camilla, se expuso la parte interna del miembro posterior derecho (previamente rasurado), se palpó el pulso de la arteria femoral cercana a la ingle y se marcó con un fibrón indeleble su recorrido.

iii) En la zona marcada, se desinfectó con iodopovidona, se realizó una inyección subcutánea de clorhidrato de lidocaína al 2%, y luego se disecó la arteria femoral realizando una incisión a 1-2 cm en la piel de la ingle y la fascia que recubre el paquete venoso para exponer la arteria femoral.

iv) Una vez expuesta la arteria, se obtuvo el acceso vascular realizando la punción corriente arriba con un catéter tipo Abocat de 22G, y luego se lo sustituyó por un introductor radial 5F.

v) Con un catéter 4F, se realizó una angiografía del tronco celíaco para identificar las arterias renal derecha e izquierda.

vii) Se cateterizó selectivamente la arteria renal derecha.

viii) Se cateterizó subselectivamente con microcatéter 3F.

ix) Se purgó el microcatéter con 0,4 mL de solvente y se inyectó bajo flujo la formulación polimérica hasta observar flujo retrogrado.

x) Se retiró el microcatéter y se colocó un catéter 4F para realizar una arteriografía celíaca de control inmediata, y a los 10 min de la última inyección polimérica.

xi) Se retiró el catéter y el introductor, se ligó la arteria femoral y se suturó la piel.

xiv) Luego, se administró analgesia y antibióticos por vía intramuscular, y solución fisiológica por vía endovenosa hasta la recuperación del animal de la anestesia.

Durante la intervención se realizó el monitoreo a través de la medición de la temperatura rectal (38,5-40 °C), la frecuencia cardíaca (rango: 200-300 latidos/minuto) y la observación clínica del animal.

A las 2 h de la intervención se sacrificó el animal con una inyección intracardíaca de solución para eutanasia. Luego, se realizó una incisión abdominal y se extrajeron los riñones y los pulmones para su observación macroscópica y para su estudio por radiografía de tejido blando e histología.

3.2.32.1 Evaluación de órganos por radiografía de tejido blando

Riñones y pulmones (derecho e izquierdo) fueron disecados y correctamente identificados para evaluar por radiografía de tejido blando:

- En riñones: distribución y penetración del agente embolizante, número de puntos de ramificación;
- En pulmones: ausencia/presencia de material radiopaco.

Para esto se utilizó un mamógrafo, variando el voltaje y el tiempo de exposición hasta obtener placas radiográficas nítidas. Se tomaron fotografías de las radiografías, que se analizaron utilizando un programa de procesamiento de imagen.

3.2.32.2 Evaluación de órganos por histopatología

Luego, los riñones fueron colocados en buffer fosfato con formaldehído al 10% durante 48 h a temperatura ambiente. El resto de los pasos de preparación del tejido para su evaluación histopatológica se siguieron de acuerdo a la **Sección 3.2.29.1**. Se estudió por histología el parénquima renal, la presencia de material embolizante, y el diámetro de arterias embolizadas.

3.2.33 Trabajo con animales de experimentación, normas éticas y de buenas prácticas de laboratorio

Los trabajos con animales de experimentación se llevaron a cabo bajo protocolos internos aprobados por las autoridades pertinentes, en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.

El trabajo en el laboratorio, el trabajo con animales de experimentación y la inyecciones de las formulaciones realizadas en animales, se llevaron a cabo de acuerdo a las normas descriptas en las Guías de Buenas Prácticas de Laboratorio (*Good Laboratory Practice for non Clinical Laboratory Studies*, 1997), el Manual sobre el cuidado y uso de animales de experimentación (*CCAC Guide to de Care and Use of Experimental Animals*, 1998), y lo reportado por Diehl y colaboradores (Diehl y col., 2001).

3.2.34 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue evaluada sobre la base de la prueba de Shapiro-Wilk y el estadístico chi-cuadrado para la bondad de ajuste. Los datos fueron reportados como sigue: *media (desviación estándar, DE)* para los datos que presentaron distribuciones normales, y *mediana (rango intercuartílico: cuartil 1-cuartil 3, RI)* para datos que no siguieron una distribución normal. La bondad de ajuste se evaluó mediante el coeficiente de correlación estándar (R^2) para regresiones lineales, y con la prueba de chi-cuadrado (nivel de significación de 0,01), para regresiones no lineales. Las barras de error de los puntos experimentales en los gráficos representan las desviaciones estándar. Para la comparación de las medias, se aplicó el test t de

Student o el test ANOVA, para dos o más muestras, respectivamente, y posterior test Bonferroni. Para la comparación de medianas, se aplicó el test no paramétrico U de Mann Whitney o el test de Kruskal Wallis, para dos o más muestras, respectivamente, y posterior test de Dunn, considerando diferencia estadísticamente significativa un p valor menor a 0,05.

4 Resultados y Discusión

4.1 Caracterización y selección de formulaciones inyectables para la formación *in situ* de implantes

4.1.1 Introducción y objetivos

Las características finales de una formulación y su producto precipitado dependerán de las propiedades de los solventes que la componen: si son biocompatibles o no, su capacidad de disolver el polímero y la droga, y su miscibilidad en agua, entre otras. Determinar dichas características permitirá, en un primer paso, seleccionarlos como posibles excipientes.

El sistema inyectable de formación *in situ* para la LCD requiere solventes farmacéuticamente aceptables, capaces de formar soluciones poliméricas concentradas, con la finalidad de conseguir altos entrapamientos de drogas y perfiles de liberación convenientes (Matschke y col., 2002; Shively y col., 1995). El vehículo no solo actúa como solvente, sino también como plastificante para los polímeros. La matriz no es sólo un polímero precipitado, sino también una matriz gomosa dependiendo de la concentración de los vehículos entrapados dentro del polímero en la inyección (Singh y col., 1997).

La elección del solvente apropiado es también un factor esencial, dado que este excipiente juega un rol determinante durante el proceso de formación del implante (proceso de inversión de fases), por lo que influye no solo la velocidad de liberación de la droga (Graham y col., 1999) sino también en la degradación del polímero.

El solvente para el polímero biodegradable debe ser bien tolerado y biocompatible. No debe causar dolor luego de la administración, ni irritación del tejido o necrosis en el sitio de inyección. El solvente debe ser miscible en agua en una proporción elevada y difundir hacia los fluidos corporales y, a la vez, permitir la penetración de agua en la solución polimérica y causar la coagulación o solidificación (Dunn y col., 1990; Kranz y col., 2001).

Los solventes más comúnmente utilizados para la tecnología de formación *in situ* de implantes son NMP y DMSO, siendo de elección por su precedencia farmacéutica (Dunn y col., 1997). Estos dos solventes permiten la formación de soluciones poliméricas altamente concentradas de hasta un 70% en peso (Sautter, 2006). Existe gran cantidad de datos de toxicidad para la administración oral, intraperitoneal e intravenosa de estos solventes (*Martindale, The Extra Pharmacopoeia*, 1993; *N-Methylpyrrolidone TSCA Workplan Chemical Risk Assessment*, 2012; Jouyban y col., 2010; McKim y Strub, 2008).

Otros solventes que se han utilizado en experimentos *in vitro* o en ensayos *in vivo* para la formación *in situ* de implantes incluyen TR (Brodbeck y col., 1999b; Graham y col., 1999; Jain y col., 2000; Liu y col., 2010; Shah y col., 1993; Singh y col., 1997), trietil citrato (Shah y col., 1993), acetato de etilo (Shively y col., 1995), glicofurol (Eliaz y Kost, 2000), benzoato de etilo (Brodbeck y col., 1999a; DesNoyer y McHugh, 2001; McHugh, 2005), benzoato de bencilo (Brodbeck y col., 1999a; Wang y col., 2003) y 2P (Kranz y Bodmeier, 2007; Kranz y col., 2001). En comparación con las formulaciones a base de DMSO y NMP, las soluciones inyectables a base de estos solventes alternativos soportan concentraciones más bajas de polímero debido a que la solubilidad del PLA/PLGA en estos solventes es relativamente baja. Sin embargo, algunos de estos solventes pueden ser menos tóxicos y mejor tolerados (*The Merck Index*, 1996; Bleiberg y col., 1993).

En cuanto al uso de solventes en líquidos embolizantes, estos deben ser hemocompatibles, miscibles en agua y fluidos corporales, no tóxicos, no irritantes, no ejercer ninguna actividad farmacológica, y la viscosidad debe permitir una fácil inyección (Mottu y col., 2000). El DMSO, a pesar de ser uno de los principales solventes utilizados para su aplicación intravascular en materiales embolizantes debido a sus propiedades físicas apropiadas (alta capacidad solubilizante, miscibilidad en agua, y baja viscosidad), es controversial debido a sus efectos adversos (Chaloupka y col., 1993). Estos efectos tóxicos pueden ser localizados en el sitio de inyección y dependientes de la dosis, o sistémicos, tales como toxicidad cardiovascular (Mottu y col., 2000). Aunque en algunos casos también es deseable una toxicidad local, para que los solventes actúen como trombogénicos *per se*, como es el caso del etanol, que destruye las paredes de los vasos sanguíneos por desencadenar una reacción inflamatoria fuerte, y causa una precipitación instantánea de las proteínas de las células endoteliales y una trombosis rápida (Golzarian y col., 2006). Otros solventes de aplicación intravascular son: propilenglicol, polietilenglicol, NMP, glicofurol, solketalTM, glicerol formal y acetona (Mottu y col., 2000).

La alta viscosidad de los sistemas inyectables de formación *in situ* para la LCD es un punto importante a tener en cuenta en esta tecnología, debido a que directamente determina la inyectabilidad de la formulación. Como contrapartida, es sabido que altas viscosidades disminuyen la velocidad de difusión de la droga durante el proceso de inversión de fases (menor efecto *burst*) (Kranz y Bodmeier, 2008). La viscosidad final de la formulación debe ser lo suficientemente baja como para permitir la aplicación a través de los diámetros estándares de jeringas y agujas. A menor diámetro de aguja, mayor tolerancia a la inyección, llevando a una mejor aceptación por los pacientes (Rungseevijitprapa y Bodmeier, 2009). Las viscosidades de las formulaciones pueden

ajustarse variando la cantidad y tipo de polímero y la cantidad de droga, como así también el tipo de solvente en la formulación. El uso de solventes alternativos como TR, posiblemente en combinación con otros co-solventes, en búsqueda de mejorar la tolerabilidad respecto a solventes como DMSO y NMP, van en detrimento de una mayor viscosidad de las formulaciones (Sautter, 2006).

Más allá de que es deseable que las soluciones inyectables sean poco viscosas para no generar dolor en los pacientes y para poder administrarse de manera fácil y segura, no existe por definición una viscosidad máxima permitida para inyectables. Los rangos se fijan según el criterio de cada autor y en base a cuestiones empíricas, y muchas veces depende de la vía de administración. Por ejemplo, Jones y Greff (Jones y Greff, 2004) definen a las composiciones fluidas como soluciones fluidas, emulsiones, y suspensiones con viscosidades menores a 300 cP, preferiblemente de 100 cP o menos, a 20 °C. Para uso en embolización a través de catéteres, el límite entre composiciones de baja y alta viscosidad, está reportado para un valor de viscosidad de 150 cSt a 40 °C (Bein y Greff, 2004). Sin embargo, formulaciones para embolizar malformaciones arteriovenosas, se encuentran en el rango 1.000-20.000 cSt (Whalen y col., 2003). Kipke y colaboradores (Kipke y col., 2003) presentan una invención para uso en embolización, con una viscosidad en el rango 25-275 cP, preferentemente, mientras que Goupil y colaboradores proponen un rango de viscosidades de 10-50 cP, para la entrega a través de microcatéteres (Goupil y col., 2004). Por último, Mottu y colaboradores aconsejan el uso de preparaciones líquidas para embolización con viscosidades menores a 150 cP, para que puedan ser inyectadas a través de pequeñas rutas de acceso, como microcatéteres con una luz de 0,4-0,8 mm (Mottu y col., 2000). En base a estos datos obtenidos de la bibliografía, es que en esta tesis se decidió trabajar dentro de un rango de viscosidades de 50-160 cP, tratando de conciliar con lo reportado en la bibliografía, y en base a nuestra propia experiencia en ensayos preliminares en animales.

Para la aplicación de la solución polimérica como agente embolizante, ésta se debe poder monitorear durante su inyección endovascular y confirmar su presencia una vez que el procedimiento se completa a través de, por ejemplo, fluoroscopia o radiografía. Es por esto que es necesario adicionar a la formulación un agente radiopaco. Este agente debe poder encapsularse en el sólido que se forma con el objeto de permitir una adecuada definición y monitoreo de su ubicación. La elección del agente de contraste en relación al agente embolizante es particularmente crítica, ya que no debe interferir ni retardar la formación del tapón, debe ser insoluble en agua y encapsularse dentro del agente embolizante durante su precipitación, y no

debe alterar las propiedades físicas de la solución (esto es, viscosidad), de manera de volver la composición inadecuada para su uso vascular (Greff y col., 1998). Entre los agentes de contraste insolubles en agua, se encuentran el tantalio, el óxido de tantalio, el sulfato de bario, el tungsteno, el oro y el platino, capaces de quedar encapsulados dentro del material sólido (Greff y col., 1998). Este encapsulamiento se refiere a la formación de una masa sólida integrada de manera coherente, que no se separa en componentes individuales (Greff, 2000).

En esta primera etapa, se evaluaron las viscosidades de una serie de formulaciones utilizando solventes biocompatibles, teniendo en cuenta el rango seleccionado para inyectables (50-160 cP). Además, se estudió el efecto de la adición de agente radiopaco y de excipientes farmacéuticos en la viscosidad. Se estudiaron también los perfiles de liberación de solventes, como una medida de la velocidad de precipitación de los implantes. A partir de los resultados obtenidos, se realizó la selección de formulaciones para su posterior estudio de su degradación, perfil de liberación de droga y uso en animales para posibles aplicaciones.

4.1.2 Resultados y discusión

Para este trabajo de tesis se trabajó con los solventes DMSO, 2P y TR. Las características fisicoquímicas de estos solventes se detallan en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados para la formación *in situ* de implantes

Solvente	Fórmula	Punto de Fusión (°C) ^a	Punto de Ebullición (°C) ^a	Densidad (g/mL) ^a	Viscosidad (cP) ^b	Solubilidad en agua (g/L)	Constante dieléctrica
DMSO	C ₂ H ₆ OS	18,6	189	1,10 (25)	2,19 (20)	M	47 (20)
2P	C ₄ H ₇ N ₀	25,0	245	1,12 (25)	14,66 (20)	M	28,2 (25) ^c
TR	C ₉ H ₁₄ O ₆	-78,0	258-260	1,16 (25)	19,70 (20)	70 (25)	7,3 (20) ^d

M indica completamente miscible. Entre paréntesis, temperatura de medición (en °C).

^a Merck Index, 12^a Edición (*The Merck Index*, 1996); ^b Rungseevijitprapa y Bodmeier (Rungseevijitprapa y Bodmeier, 2009); ^c George y Sastry (George y Sastry, 2004); ^d Gouw y Vlugter (Gouw y Vlugter, 1967).

El DMSO se eligió por su propiedades físicas apropiadas para su uso endovascular y por estar aprobado para su uso en formulaciones embolizantes, a pesar de la controversia que genera su toxicidad moderada (Chaloupka y col., 1999; Laurent y col., 2007). Además, se eligió la 2P porque, a pesar de no existir reportes asociados a su uso intravascular, la dosis letal 50 (LD₅₀) intravenosa es mayor a 2 mL/kg y posee menor miotoxicidad *in vitro* que el DMSO en sistemas de formación *in*

situ (Kranz y col., 2001). Que la 2P sea un solvente prótico (a diferencia del DMSO, que no posee hidrogeniones para donar), y que sea menos polar que el DMSO (menor constante dieléctrica), podría otorgar al implante otras características por afectar de manera diferente el proceso de inversión de fases. Por otro lado, la elección de TR se basó en su menor solubilidad en agua (70 g/L), que permite mejorar los niveles de entrapamiento y, en caso de ser usado por vía intravascular, regular cuan distal se produzca la precipitación. Además, la TR es considerada un solvente no tóxico (Quinn y col., 2012), por lo que su uso como co-solvente podría mejorar la biocompatibilidad de las formulaciones.

El polímero que se utilizará en este trabajo de tesis, PLGA Resomer 502H (Boehringer Ingelheim), es un polímero con una relación de co-monómeros 50:50. Esta relación, sumado a que este polímero se encuentra en su estado amorfo (contiene D,L-lactida), favorece el ingreso de agua a la matriz, resultando en una mayor hidrólisis de las cadenas poliméricas, y en menores tiempos de degradación (Eliaz y Kost, 2000). En la bibliografía, a esta composición de PLGA se le asocian tiempos de liberación de entre 7 y 30 d, dependiendo de si la droga entrapada es una proteína, un colorante, un antibiótico o una amina (Turino, 2012). En nuestro caso, además, el PLGA 502H es de bajo peso molecular (7,3 kDa) y posee un grupo carboxilo terminal desprotegido, que le confiere tiempos de degradación menores que cuando la cadena polimérica finaliza protegida por un grupo alquil éster, que retarda la toma de agua y la hidrólisis de las cadenas poliméricas (Tracy y col., 1999).

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Turino, 2012), se estudió la capacidad que tenían los solventes de trabajo seleccionados de solubilizar el PLGA Resomer 502H, en adelante PLGA. El polímero se solubiliza completamente en estos solventes luego de la incubación en agitación a 50 °C durante 1 h.

Con la determinación de la densidad, se calculó la concentración de las formulaciones PLGA20, PLGA30, PLGA40 y PLGA50 estudiadas. Se presentan en la **Tabla 4.2** un promedio de todas las concentraciones para una dada proporción de polímero, independientemente del sistema solvente estudiado (DMSO, 2P, TR, DMSO:2P, DMSO:TR) , expresada en % p/v y % p/p de formulación.

Tabla 4.2. Expresión de la concentración de las formulaciones de PLGA estudiadas

Formulación	[PLGA] (% p/v)	[PLGA] (% p/p)
PLGA20	17,44 (0,02)	15,2 (0,1)
PLGA30	24,61 (0,04)	21,2 (0,1)
PLGA40	30,95 (0,03)	26,4 (0,1)
PLGA50	36,64 (0,03)	31,0 (0,1)

Se presentan los promedios de las concentraciones de todos los sistemas solventes estudiados, para una dada proporción de polímero en la composición, expresados como *media (DE)*

Se determinaron las viscosidades de las formulaciones detalladas en la **Tabla 3.1 (Materiales y métodos)**, a 25 °C. En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de PLGA y del tipo de solvente sobre la viscosidad de las soluciones poliméricas. En la **Figura 4.1** se presentan las viscosidades de las formulaciones preparadas a partir de solventes puros.

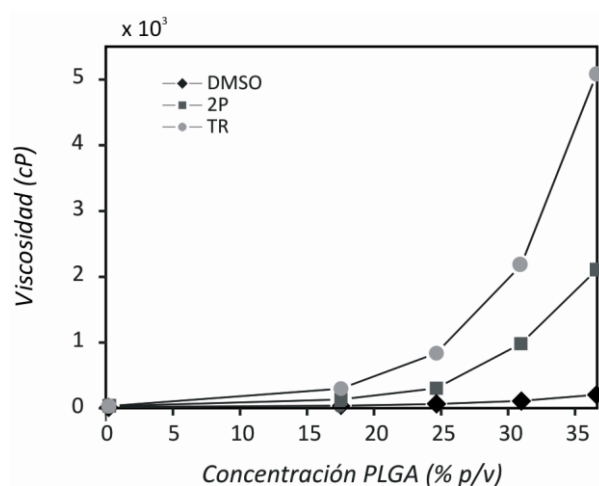


Figura 4.1. Efecto del tipo de solvente y concentración de polímero sobre la viscosidad de las formulaciones. Formulaciones de PLGA preparadas a partir de solventes puros DMSO, 2P y TR.

Como se puede observar, el aumento en la concentración de polímero resultó en un aumento exponencial en la viscosidad de las formulaciones. Además, las soluciones a base de DMSO, presentaron las viscosidades más bajas, de acuerdo con el alto poder solubilizante de este solvente. En tanto, los otros dos solventes dieron lugar a soluciones más viscosas (2P < TR). En soluciones poliméricas concentradas, como las presentadas en este trabajo de tesis, las viscosidades son mayores en solventes pobres que en aquellos solventes buenos (Kranz y Bodmeier, 2008). De los solventes estudiados, el DMSO es el solvente con mayor poder solubilizante, siguiéndole la 2P y por último la TR.

Se investigó luego el efecto de la adición de 25, 50 y 75% de 2P ó TR como co-solventes en las formulaciones de PLGA a base de DMSO. Los resultados para las formulaciones conteniendo mezcla de solventes DMSO:2P y DMSO:TR se presentan en la **Figura 4.2 a** y **Figura 4.2 b**, respectivamente.

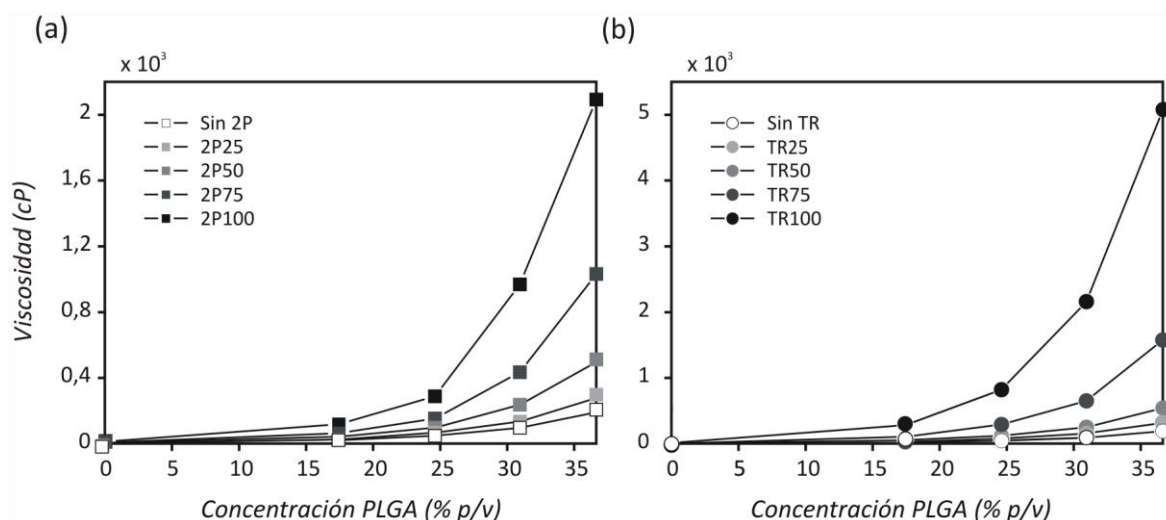


Figura 4.2. Efecto de la adición de co-solvente a) 2P ó b) TR en las formulaciones de PLGA a base de DMSO.

Como se puede observar, al aumentar la proporción de co-solvente en la mezcla de solventes, la viscosidad de las formulaciones aumentó, siendo mayor el aumento para TR que para 2P (máxima viscosidad alcanzada, acorde a su menor poder solubilizante). El comportamiento de estas curvas también fue exponencial.

Para seleccionar las formulaciones dentro del rango de viscosidades fijado para inyectables (50-160 cP), se amplió el eje y de la **Figura 4.2** en la zona de interés (**Figura 4.3**).

Las formulaciones con viscosidades en el rango 50-160 cP estudiadas en este trabajo de tesis fueron:

- i) PLGA20: PLGA 20/2P75, PLGA20/2P100, PLGA20/TR50 y PLGA20/TR75
- ii) PLGA30: PLGA30, PLGA30/2P25, PLGA30/2P50, PLGA30/2P75, PLGA30/TR25, PLGA30/TR50
- iii) PLGA40: PLGA40, PLGA40/2P25, PLGA40/TR25

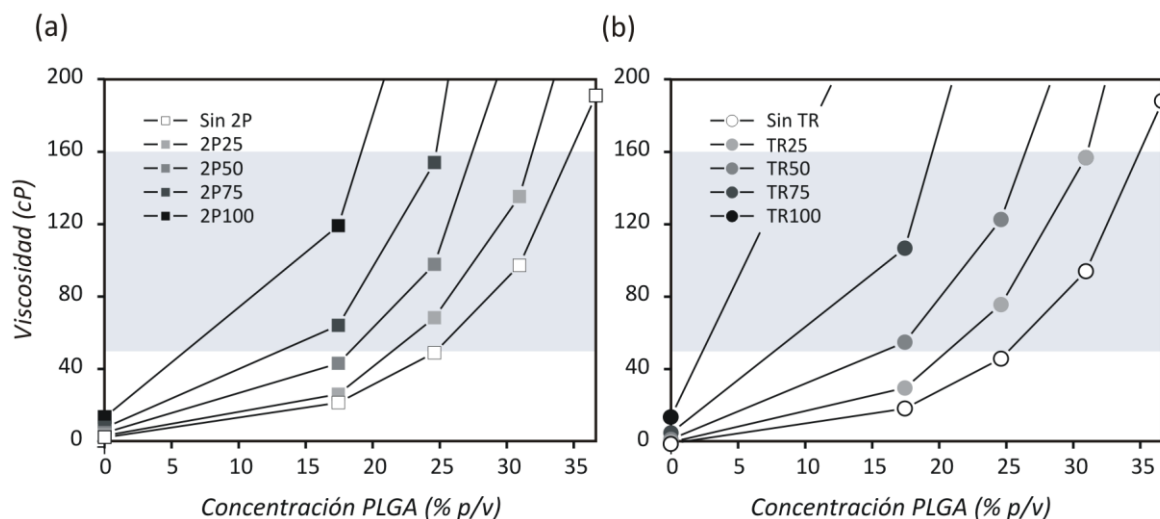


Figura 4.3. Formulaciones conteniendo co-solvente a) 2P ó b) TR en las formulaciones de PLGA a base de DMSO, en el rango definido para inyectables 50-160 cP (delimitado en gris).

Todas las formulaciones PLGA50 estudiadas presentaron viscosidades mayores a 160 cP, quedando fuera del rango definido para inyectables. Las formulaciones PLGA20, por su parte, quedaron descartadas dado que no fueron capaces de precipitar en contacto con un medio acuoso (no alcanzaron la concentración mínima necesaria para que el proceso de inversión de fases dé como resultado una masa coherente única). En cuanto a las formulaciones PLGA40, se decidió no trabajar con aquellas que contenían mezclas de solventes (PLGA40/2P25 y PLGA40/TR25), por encontrarse cercanas al límite superior 160 cP. Esto nos permite tener un margen de trabajo, en caso de agregar drogas y/o excipiente que aumentan la viscosidad de las formulaciones. De las formulaciones PLGA30, se decidió trabajar con PLGA30 (con DMSO puro como solvente), y con aquellas que, encontrándose en el rango 50-160 cP, tuvieran la mayor proporción de co-solvente posible, sin encontrarse nuevamente en el límite superior (esto es, PLGA30/2P50 y PLGA30/TR50).

Las formulaciones seleccionadas para este trabajo de tesis, se detallan en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3 Formulaciones seleccionadas para la formación *in situ* de implantes

Formulación	Abrev.	Preparación			Solvente	[PLGA] (% p/v)	[PLGA] (% p/p)	Viscosidad (cP) ^a
		PLGA (mg)	DMSO (mL)	2P ó TR (mL)				
PLGA40	F1	400	1	--	DMSO	31,0	26,8	97,2 (0,2)
PLGA30	F2	300	1	--	DMSO	24,6	21,5	48,90 (0,1)
PLGA30/2P50	F3	300	0,5	0,5	DMSO:2P (50:50)	24,6	21,1	97,8 (0,1)
PLGA30/TR50	F4	300	0,5	0,5	DMSO:TR (50:50)	24,6	21,4	125,8 (0,1)

^a Resultados expresados como *media* (DE)

De esta manera, se podrá estudiar el efecto de la concentración de polímero en dos sistemas preparados a partir del mismo solvente (F1 y F2) y, por otro lado, el efecto de la adición de co-solventes 2P y TR al 50%, para una dada concentración de polímero (F2 vs. F3 y F4), siendo 2P un solvente alternativo al DMSO, y TR un solvente poco soluble en agua.

Para continuar, se estudió la adición de tantalio (TA) en polvo (diámetro de partícula 1-5 μm) a la formulación, con el objeto de poder monitorear el implante formado *in situ*. El TA es un agente radiopaco fisiológicamente inerte, que se usa en medicina para la fabricación de instrumentos quirúrgicos e implantes (Balla y col., 2010; Black, 1994). Se trabajó con TA en polvo como agente radiopaco por su probado uso en otras composiciones embolizantes para el tratamiento de aneurismas y hemorragias (Golzarian y col., 2006; Greff, 2000; Greff y col., 1998). Este metal, insoluble en agua, queda encapsulado dentro del precipitado resultante, evitando complicaciones médicas.

Se probaron dos concentraciones de TA en las formulaciones, 25 y 30% p/v de solvente. Por fluoroscopia, se observaron las soluciones poliméricas líquidas e implantes formados *in situ* a partir de estas formulaciones, para evaluar su radiopacidad. Como se observa en la **Figura 4.4**, ambas formulaciones se observan bien por fluoroscopia (**Figura 4.4 b** y **Figura 4.4 c**). Sin embargo, el implante formado *in situ* que contiene un 30% de TA (**Figura 4.4 a**) es más nítido (posee mayor densidad radiográfica) que el que contiene un 25% de TA (**Figura 4.4 d**), por lo que se decidió trabajar con un 30% de TA

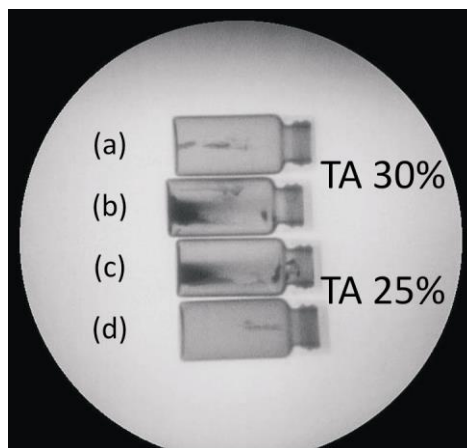


Figura 4.4. Fluoroscopia de implantes formados in situ en el laboratorio (a y d) a partir de las respectivas formulaciones poliméricas (b y c) conteniendo TA al 30% (a y b) y 25% (c y d) p/v de solvente.

Se evaluó el efecto de la adición de TA al 30% p/v de solvente sobre la viscosidad de las formulaciones F1-4. Los resultados, presentados en la **Figura 4.5 a**, muestran que la adición de 30% de TA no alteró significativamente la viscosidad de las composiciones, al igual que lo reportado por otros autores (Greff y col., 1998). Este resultado indica que el uso de TA como agente de contraste permite una mejor administración de soluciones inyectables, ya sea a través de una jeringa y aguja, como también a través de un catéter al sitio vascular y, por lo tanto, reduce la probabilidad de lesión vascular.

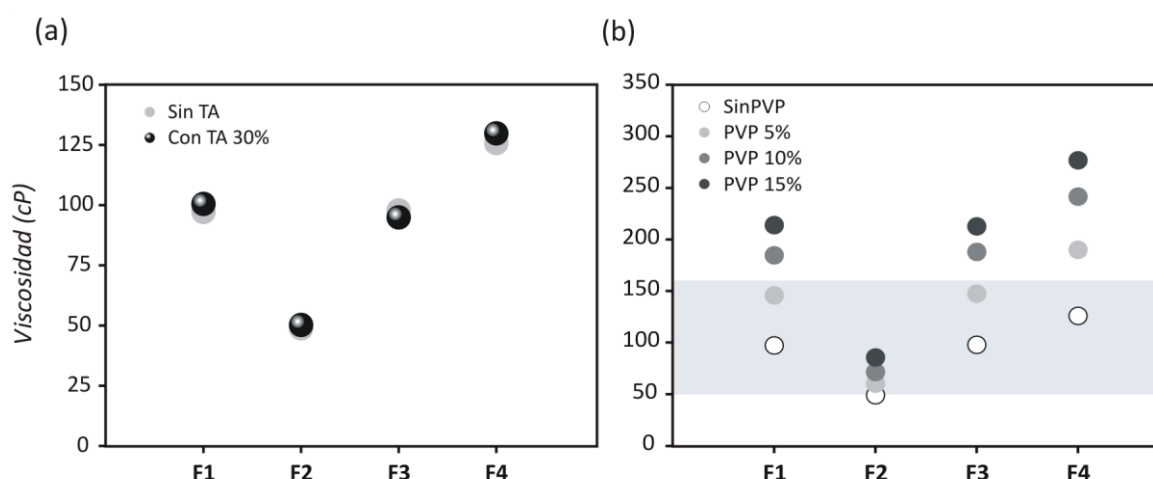


Figura 4.5. Efecto sobre la viscosidad de las formulaciones F1-4 de la adición de: a) TA al 30%, b) PVP al 5, 10 y 15%.

Se estudió luego el efecto de la adición de polivinilpirrolidona (PVP) sobre la viscosidad de las formulaciones. La PVP es un polímero sintético, higroscópico y altamente soluble en agua y en gran cantidad de solventes, formado por cadenas de vinilpirrolidonas. Es muy usado en la industria

farmacéutica debido a su biocompatibilidad, nula inmunogenicidad, baja toxicidad, su capacidad para formar complejos y su comportamiento inerte hacia las sales y los ácidos. Se usa como aglutinante y espesante hidrosoluble, y en preparaciones para liberación controlada, dado que prolonga la acción de las drogas y mejora su disolución, además de reducir la toxicidad de ciertas drogas, y de su alto poder adhesivo (Bühler, 2005; Robinson, 1990). Se evaluó el agregado de éste excipiente por estas propiedades y, por el hecho de que, al ser muy soluble en agua, podría utilizarse en la formación *in situ* de matrices más porosas.

El agregado de PVP a las formulaciones F1-4 generó soluciones más viscosas (**Figura 4.5 b**), siendo mayor el aumento en las formulaciones PLGA30 conteniendo mezcla de solventes (F3 y F4) y en la formulación con mayor concentración de polímero (F1). La solución más viscosa se obtuvo con la mezcla conteniendo TR, probablemente debido a su bajo poder de solvatación. Sólo la formulación F2, cuya viscosidad se encuentra en el límite inferior del rango de viscosidades propuesto, mantuvo viscosidades en el rango 50-160 cP con el agregado de PVP. Mientras que las otras formulaciones presentaron viscosidades que se salieron de rango, si no quedaron en el límite superior cercanas a 160 cP (F1 y F3 con 5% PVP). Esto indica que sólo F2 permitiría la adición de PVP en su composición. En caso de ser necesaria la adición de éste excipiente en las formulaciones, se tendrá en cuenta esta limitación.

Los principales movimientos difusionales que tienen que ser considerados para la formación *in situ* de implantes son básicamente cuatro: la salida del solvente, el ingreso de no-solvente, la salida de la droga y, probablemente, la salida de fracciones de bajo peso molecular del PLGA. La pérdida del solvente de la formulación resulta en un aumento de la concentración de polímero. Una vez que se alcanza la concentración de polímero mínima necesaria para la precipitación, se produce la separación de fases (Kranz y Bodmeier, 2008). Con el fin de investigar la velocidad de precipitación del polímero, se estudió la velocidad de liberación del solvente de la composición polimérica.

En primer lugar, se investigó la velocidad de liberación del solvente como una función de la concentración del polímero (formulaciones PLGA30, PLGA40 y PLGA50) y del tipo de solvente utilizado (PLGA30, PLGA30/2P100, PLGA30/TR100). A pesar de haber elegido ya las formulaciones, se estudiaron los perfiles de liberación de formulaciones preparadas con solventes puros, para luego poder comprender mejor los resultados obtenidos con las mezclas de solventes.

Luego de la inmersión de la solución polimérica en el medio PBS, se observó la difusión del solvente orgánico hacia el medio acuoso (**Figura 4.6**).

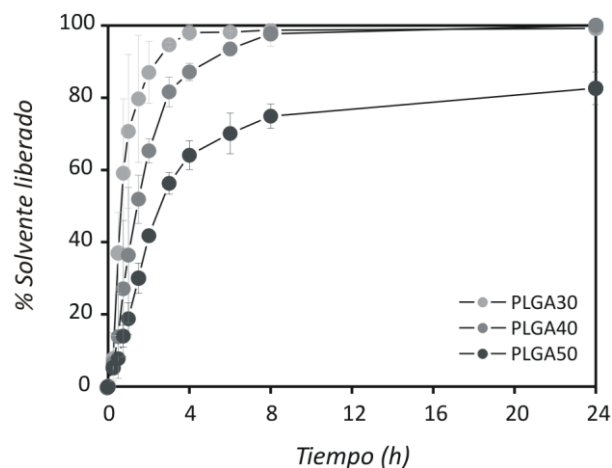


Figura 4.6. Efecto de la concentración de PLGA sobre la liberación de solvente. Perfiles de liberación de DMSO de las formulaciones PLGA30, PLGA40 y PLGA50.

Los perfiles presentados muestran una más rápida liberación de solvente de los implantes PLGA30 respecto de PLGA40, con un efecto explosivo o *burst* más marcado. Mientras que a las 4 h PLGA30 había liberado casi la totalidad del DMSO, PLGA40 lo hizo en 8 h; PLGA50, sin embargo, presentó una velocidad de liberación de DMSO mucho menor. Mientras que a las 8 h PLGA30 y PLGA40 liberaron casi por completo el solvente retenido, PLGA50 liberó el 75%, liberando el resto durante las siguientes 24 h (datos no mostrados). Este resultado, mayor concentración de polímero - menor velocidad de liberación de solvente, probablemente se deba al aumento de la viscosidad de las formulaciones, como se mostró anteriormente, que genera una resistencia de las moléculas de solvente a difundir fuera de la composición polimérica. A la vez, un aumento en la hidrofobicidad, debido a una mayor carga de polímero, también podría influir en un menor ingreso de agua y en una menor difusión de solvente fuera de la matriz. Resultados similares fueron reportados por otros autores para microesferas formadas *in situ* de PLA (Kranz y Bodmeier, 2008).

Luego, se estudió el efecto del tipo de solvente en los perfiles de liberación. En la **Figura 4.7** se encuentran graficados los perfiles de liberación de solvente de las formulaciones PLGA30 preparadas a partir de solventes puros DMSO, 2P y TR (PLGA30, PLGA30/2P100 y PLGA30/TR100, respectivamente). La velocidad de liberación de solvente disminuyó en el orden DMSO>2P>>TR. La liberación más lenta de la formulación conteniendo 2P, respecto de la que contenía DMSO, probablemente se deba a la mayor viscosidad de esta formulación, como se indicó anteriormente. Mientras que la liberación de TR de la formulación PLGA30/TR es aún menor, principalmente por la menor solubilidad de este solvente en agua, lo que hace que el proceso de inversión de fases ocurra más lento.

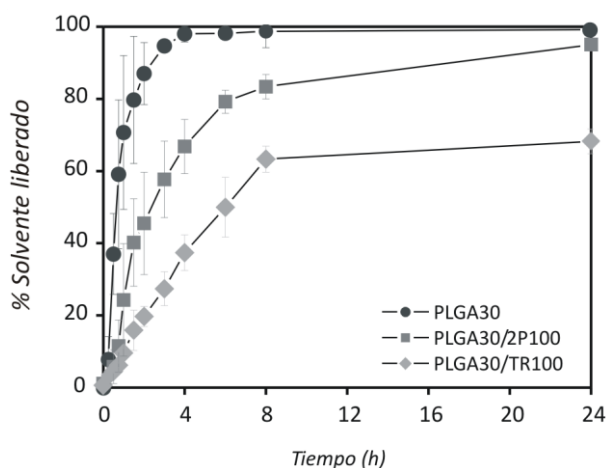


Figura 4.7. Efecto del tipo de solvente sobre la liberación de solvente. Perfiles de liberación de solventes puros DMSO, 2P y TR de las formulaciones PLGA30, PLGA30/2P100 y PLGA30/TR100, respectivamente.

Para los ensayos de liberación de solventes hasta ahora descritos, se puede resumir que decrecen con un aumento en la concentración de polímero en la composición, y que se ven afectados por el tipo de solvente, aún cuando poseen solubilidades en agua similares.

Se estudió luego el efecto sobre la liberación de solvente de la adición de 50% de co-solvente 2P o TR a la formulación PLGA30. En la **Figura 4.8** se presentan los perfiles de liberación de solvente de las formulaciones PLGA30, PLGA30/2P50 y PLGA30/TR50, correspondientes a las formulaciones seleccionadas F2, F3 y F4, respectivamente. Al agregar 2P ó TR al 50% en la formulación PLGA30 (PLGA30/2P50 ó PLGA30/TR50), la mezcla de solventes se libera más lentamente, siendo el orden PLGA30>PLGA30/2P50>>PLGA30/TR50, de manera similar a lo observado para la liberación de los solventes puros (**Figura 4.7**).

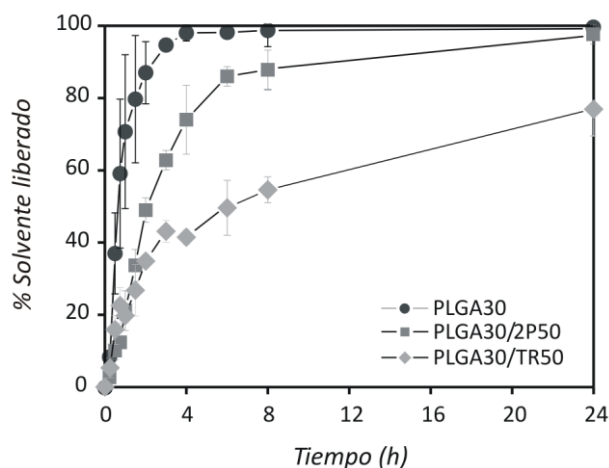


Figura 4.8. Efecto de la adición de co-solvente 2P ó TR al 50% en la liberación de solvente. Perfiles de liberación de DMSO, DMSO:2P (50:50) y DMSO:TR (50:50) de las formulaciones PLGA30, PLGA30/2P50 y PLGA/TR50.

Para conocer si esta liberación era causada por el retardo de la difusión de uno de los solventes o de ambos, se analizaron los perfiles de liberación individuales de cada solvente en las formulaciones PLGA30/2P50 y PLGA30/TR50 (**Figura 4.9**).

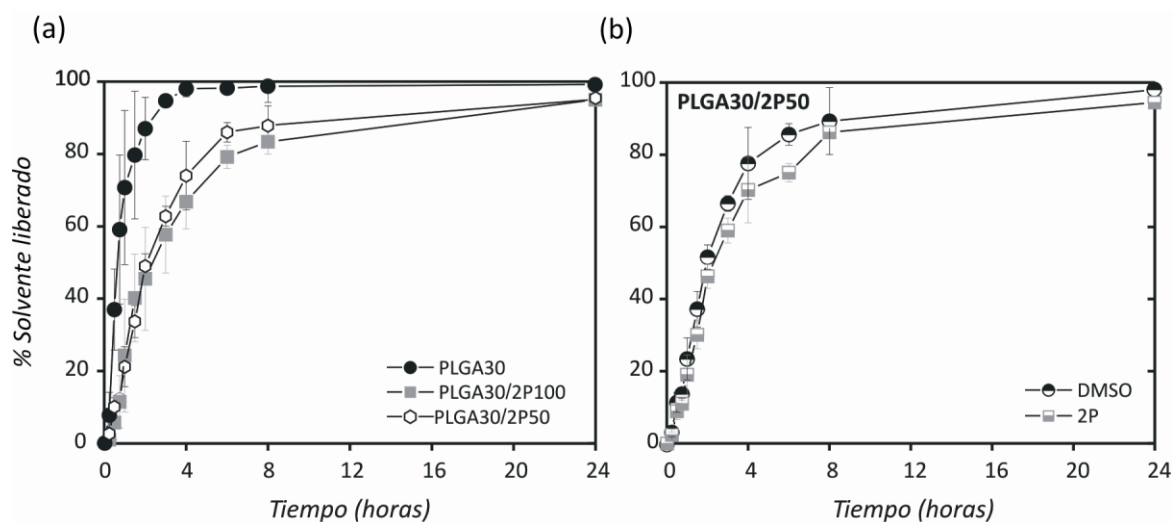


Figura 4.9. Efecto de la adición de co-solvente 2P en la liberación de solvente. a) Perfiles de liberación de DMSO y 2P puros de las formulaciones PLGA30 y PLGA/2P100 (de referencia) y de la mezcla DMSO:2P (50:50) de la formulación PLGA30/2P50. b) Perfiles de liberación individuales de DMSO y 2P en la formulación PLGA30/2P50.

En la **Figura 4.9 a** se presentan los perfiles de liberación de DMSO y 2P puros de las formulaciones PLGA30 y PLGA/2P100, como referencia, y de la mezcla DMSO:2P (50:50) de la formulación PLGA30/2P50. Como se puede observar, el perfil de liberación de la mezcla de solventes de la formulación PLGA30/2P50 se comporta de manera similar al perfil de liberación de solvente de la formulación conteniendo 100% de 2P (PLGA30/2P100). Cuando se analizan los perfiles de liberación individuales de los solventes contenidos en la mezcla de solvente DMSO:2P (50:50) (**Figura 4.9 b**), se puede observar como los perfiles casi se superponen. Esto estaría indicando que el DMSO pierde su perfil de difusión (con efecto explosivo), adoptando un comportamiento similar al de la 2P, y que el comportamiento de la mezcla es producto de un retardo en la salida de ambos solventes.

De la misma manera, en la **Figura 4.10** se presentan los perfiles de liberación de DMSO y TR puros de las formulaciones PLGA30 y PLGA/TR100, como referencia, y de la mezcla DMSO:TR (50:50) de la formulación PLGA30/TR50.

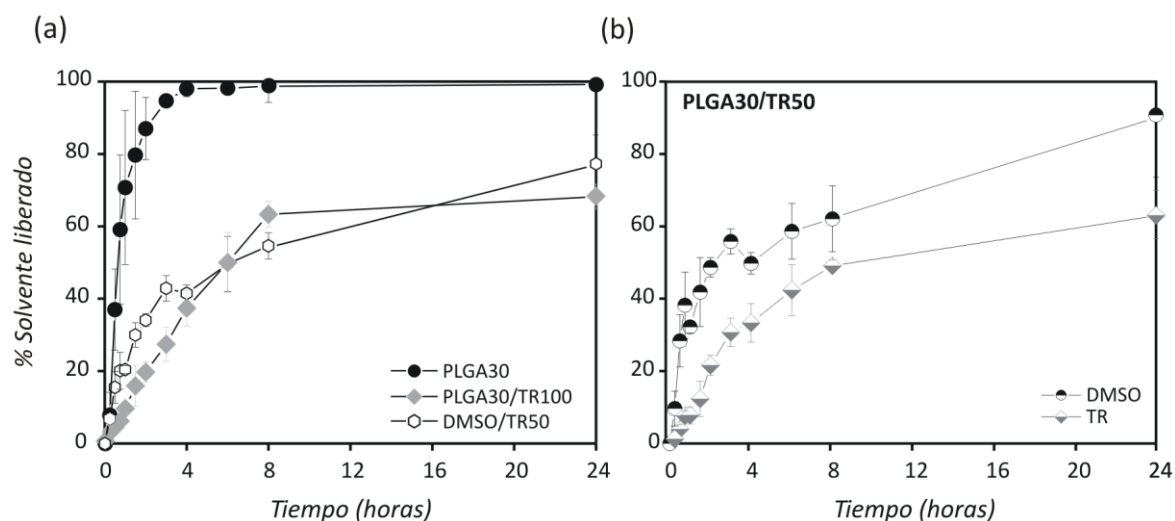


Figura 4.10. Efecto de la adición de co-solvente TR en la liberación de solvente. a) Perfiles de liberación de DMSO y TR puros de las formulaciones PLGA30 y PLGA/TR100 (de referencia) y de la mezcla DMSO:TR (50:50) de la formulación PLGA30/TR50. b) Perfiles de liberación individuales de DMSO y TR en la formulación PLGA30/TR50.

En este caso, el perfil de liberación de la mezcla de solventes de la formulación PLGA30/TR50 presenta un efecto explosivo en la primera hora de incubación, de manera similar a la liberación de DMSO de la formulación PLGA30, para luego disminuir la velocidad de liberación y alcanzar un 77% de solvente liberado a las 24 h (un poco superior a la formulación conteniendo PLGA30/TR100, que libera un 70%).

Cuando se analizan los perfiles de liberación individuales de los solventes contenidos en la mezcla de solvente DMSO:TR (50:50) (**Figura 4.10 b**) se puede observar como el efecto explosivo inicial mencionado anteriormente es debido a la liberación rápida de DMSO. Luego de la primera hora, este perfil se suaviza, alcanzando un 90% de liberación a las 24 h. El TR, por su parte, presenta un perfil de liberación similar al de la formulación conteniendo 100% de TR (PLGA30/TR100), alcanzando un 65% de liberación a las 24 h de ensayo. Esto estaría indicando que, luego de una liberación inicial explosiva, el DMSO pierde su perfil difusivo, adoptando un comportamiento intermedio entre el de DMSO y TR puros en PLGA30. Podemos decir entonces que, el efecto inicial observado en la mezcla de solventes en la formulación PLGA30/TR50 es debido a la liberación explosiva del DMSO de la formulación, y que, luego, la mezcla de solventes se sigue liberando de manera más lenta, siendo producto de un retardo en la salida de ambos solventes, pero siendo el mayor retardo proveniente de la TR, dado su característica de baja solubilidad en agua.

4.1.3 Conclusiones

Hasta aquí, estudiamos i) como la viscosidad de las formulaciones crece de manera exponencial al aumentar la concentración de polímero, ii) como el tipo de solvente afecta la viscosidad de las formulaciones, siendo el orden de viscosidades DMSO<2P<TR, iii) como la adición de co-solvente 2P ó TR aumenta la viscosidad de la formulación de PLGA conteniendo DMSO, en este mismo orden. A partir de estos resultados, y acotándonos al rango fijado para formulaciones inyectables de 50-160 cP, se seleccionaron las formulaciones PLGA40 (F1), PLGA30 (F2), PLGA30/2P50 (F3) y PLGA30/TR50 (F4). Se estudió la velocidad de liberación del solvente o mezcla de solventes, como una medida de la velocidad de precipitación de estas formulaciones. Para un mejor entendimiento, se analizaron además los perfiles de liberación de los solventes puros de las formulaciones PLGA30/2P100, PLGA30/TR100 y PLGA50. Del análisis de los perfiles de liberación podemos concluir que, i) al aumentar la concentración de polímero en la composición, la velocidad de liberación de solvente disminuye, a causa de un aumento de la viscosidad y de la hidrofobicidad de la solución polimérica, ii) al agregar 50% de 2P a la formulación PLGA30 (F3), la mezcla de solventes se comporta como la 2P en PLGA30/2P100, siendo la liberación más suave, producto del retardo en la salida de ambos solventes, iii) al agregar 50% de TR a la formulación PLGA30 (F4), la mezcla de solventes presenta un efecto explosivo inicial debido a la liberación de DMSO, y luego, ésta difunde más lentamente, producto del retardo en la salida de ambos solventes, siendo mayor el retardo provocado por la TR. Podemos concluir que la adición de 2P ó TR a las formulaciones de PLGA en base a DMSO, le confiere propiedades de liberación de solvente similares a las del co-solvente utilizado, pero con viscosidades más aceptables (no tan elevadas) de las soluciones, de manera de poder ser utilizadas como inyectables. Estos perfiles de liberación de solvente, en el orden PLGA30>PLGA30/2P50>>PLGA30/TR50, determinan diferentes velocidades de precipitación de la composición polimérica. Esta reportado en la bibliografía que diferentes velocidades de precipitación de polímeros conducen a características morfológicas diferentes que afectan la liberación de droga de la matriz (Graham y col., 1999).

El siguiente paso, fue estudiar como la precipitación diferencial observada de las cuatro formulaciones seleccionadas, F1-4, afectan las características de los implantes formados *in situ* y su degradación/erosión *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Caracterización de los implantes formados *in situ* y de su degradación *in vitro*

4.2.1 Introducción y objetivos

El principal mecanismo de degradación del PLGA tanto *in vitro* como *in vivo* se lleva a cabo por escisión de los enlaces éster de las cadenas del polímero por las moléculas de agua (hidrólisis). Esto produce el acortamiento de las cadenas poliméricas, que al alcanzar un peso molecular crítico (aproximadamente 1050 – 1150 g/mol) pueden disolverse en el medio acuoso y difundir fuera de la matriz, dando origen al proceso de erosión (Körber, 2010; Park, 1994).

Se ha demostrado que la velocidad de degradación del PLGA se ve afectada por factores propios del polímero, del medio de liberación, como así también de las características de la formulación, según se detalla en la **Tabla 4.4**.

Sin embargo, algunos principios sobre el proceso de degradación se encuentran aún en discusión. Como se comentó en la **Sección 1.5** de la **Introducción General**, la degradación del PLGA puede ocurrir más rápidamente en el centro, debido a que los productos de degradación ácidos se acumulan en el interior y disminuyen el pH, acelerando la hidrólisis de las uniones ésteres (Göpferich, 1997b). Debido a la dificultad de los productos de degradación para difundir fuera de la matriz, es que la porosidad del polímero puede tener impacto en la degradación. Las matrices poliméricas que posean baja porosidad pueden resultar en una degradación más rápida debido a un aumento de la influencia del efecto autocatalítico (Lu y col., 2000). Por lo que la morfología, producto del proceso de inversión de fases, podría involucrar cambios en la degradación de las matrices.

Con el objeto de simular condiciones fisiológicas, los ensayos de degradación de PLGA normalmente se llevan a cabo en un medio tamponado fosfato salino pH 7,4 (Dånmark y col., 2011; Körber, 2010; Krebs y col., 2009; Schliecker y col., 2003; Wang y col., 2004; Yoshioka y col., 2008). Sin embargo, como consecuencia de la liberación de productos ácidos, que ocurre típicamente debido al proceso de hidrólisis, el pH del medio tiende a disminuir a medida que la matriz se degrada (Göpferich, 1997a), lo que impide una correcta simulación de condiciones fisiológicas estrictas. Generalmente, no se reporta un riguroso monitoreo y control del pH cuando se estudia la degradación del PLGA *in vitro*.

Tabla 4.4 Factores que afectan la velocidad de degradación de matrices de PLGA

Factores propios de la composición del polímero:	Velocidad de degradación	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> Mayor proporción de AG que de AL 	↑	(Alexis y col., 2006; Giunchedi y col., 1998; Li y col., 1990; Park, 1995; Vey y col., 2011)
<ul style="list-style-type: none"> Mayor peso molecular 	↓	(Göpferich, 1997b; Lu y col., 2000; Park, 1994; Tracy y col., 1999; Yoo y col., 2005a)
<ul style="list-style-type: none"> Mayor grado de cristalinidad 	↓	(Alexis y col., 2006; Li y col., 1990; Schliecker y col., 2003)
<ul style="list-style-type: none"> Mayor temperatura de transición vítrea 	↓	(Park, 1994; Vey y col., 2012)
<ul style="list-style-type: none"> Protección del grupo final en la cadena polimérica 	↓	(Göpferich, 1997b; Tracy y col., 1999)
Factores inherentes al medio de liberación/degradación:		
<ul style="list-style-type: none"> Mayor temperatura 	↑	(Deng y col., 2008; Dunne y col., 2000; Zolnik y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Mayor fuerza iónica 	↑	(Li y col., 1990)
<ul style="list-style-type: none"> pH ácidos 	↑	(Holy y col., 1999; Yoo y col., 2005a; Zolnik y Burgess, 2007)
<ul style="list-style-type: none"> pH alcalinos 	↑	(Faisant y col., 2002)
<ul style="list-style-type: none"> Presencia de enzimas y/o células 	↑	(Cai y col., 2003; Kemme y col., 2011)
Propiedades de la formulación:		
<ul style="list-style-type: none"> Mayor tamaño de la matriz 	↑	(Dunne y col., 2000; Grizzi y col., 1995; Li y col., 1990)
<ul style="list-style-type: none"> Contenido de agua 	↑	(Dong y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Uso de sales poco hidrosolubles 	↓	(Tracy y col., 1999)
<ul style="list-style-type: none"> Uso de sales básicas protectoras 	↓	(Mobedi y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Uso de solventes próticos polares 	↑	(Dong y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Entrampamiento de drogas hidrofílicas 	↑	(Birnbaum y Brannon-Peppas, 2003; Dong y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Adición de droga 	↑/↓	(Li y col., 1996; Siegel y col., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> Esterilización por calor o radiación 	↑	(Athanasίου y col., 1996; Dånmark y col., 2011; Hausberger y col., 1995)

En esta sección se presenta una contribución sobre los ítems que presentan mayor controversia acerca de la degradación del PLGA. Se evaluó la degradación *in vitro* de implantes formados *in situ* en un medio fosfato salino a pH controlado a 37 °C a partir de las formulaciones escogidas previamente. Para esto, se determinó: pH del medio de degradación, contenido residual de

solvente en la matriz, pérdida de masa, contenido de agua, DPM, M_w , M_n e l_p , proporción de monómeros en el medio de degradación y en la matriz. Por último, se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM) la morfología de los implantes y su evolución durante la degradación.

4.2.2 Resultados y discusión

En la presente sección se trabajó con los implantes formados *in situ* a partir de las cuatro formulaciones escogidas en la sección anterior F1-4 (ver **Tabla 4.3**). La finalidad de estudiar estos implantes preparados a partir de distintas formulaciones fue evaluar el efecto sobre la formación de los implantes y la degradación *in vitro* de: i) el uso de distintas concentraciones de polímero (25 y 31% p/v de PLGA) y ii) el agregado de un co-solvente hidrofílico con distinta polaridad y prótico (2P) y de un solvente poco soluble en agua como es la TR.

La hidrólisis del PLGA genera productos solubles que disminuyen el pH del medio (Li y col., 1990; Yoo y col., 2005a). *In vivo*, el continuo intercambio de fluidos mantiene el pH constante en 7,4. Con el objetivo de imitar las condiciones fisiológicas, la mayoría de los estudios *in vitro* son llevados a cabo en un medio regulado a pH 7,4. Para mantener el pH del medio, se han reportado diferentes metodologías: recambio por medio fresco una vez a la semana (Dånmark y col., 2011; Krebs y col., 2009), en cada toma de muestra (Körber, 2010; Schliecker y col., 2003), o cada vez que los autores consideraron apropiado (Wang y col., 2004). En esta tesis, se realizó un monitoreo estricto del pH y se reemplazó el medio de incubación cada vez que éste parámetro descendía media unidad, con el fin de mantenerlo cercano a 7,4.

Para los cuatro implantes investigados F1-4, el pH en el medio de degradación se monitoreo rigurosamente con el fin de obtener información acerca de la liberación de ácidos de la matriz polimérica. En la **Figura 4.11** se observa la variación del pH y los recambios por medio fresco (indicados con flechas) durante el ensayo.

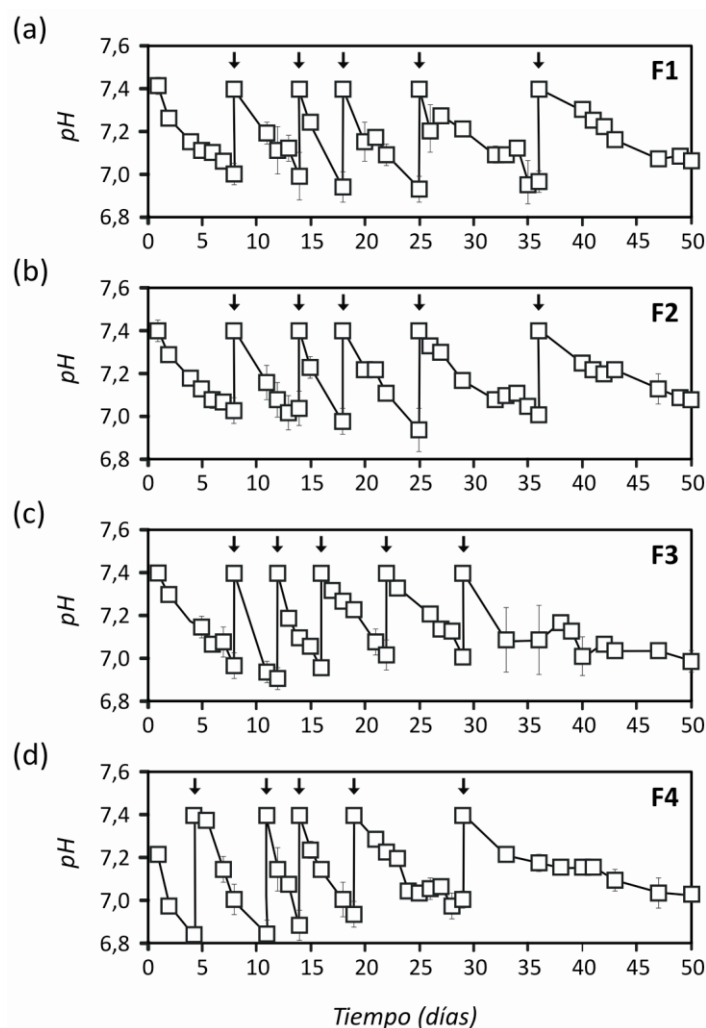


Figura 4.11. Variación del pH del medio de incubación durante la degradación *in vitro* de los implantes a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4. Las flechas indican recambios de medio.

Para mantener el pH en el rango 6,9 – 7,4, se realizaron cinco recambios de medio a todos los sistemas estudiados, siendo necesario una mayor frecuencia entre los días 12 y 18 (segundo y tercer recambio). Esto podría indicar una mayor liberación de productos ácidos al medio de degradación. Al primer día de incubación, el pH del medio de F1-3 (**Figura 4.11 a-c**) se encontró cercano a 7,4, mientras que para F4 fue de 7,2 (**Figura 4.11 d**). Esta acidificación temprana del medio donde se encontraban los implantes con TR hizo que sea necesario realizar el primer recambio de PBS al día 4, en lugar de al día 8 como en el caso de F1-3. Liu y Venkatraman también observaron este efecto en el medio de degradación de implantes formados *in situ* conteniendo una mezcla de TR:DMSO ó TR:NMP (Liu y Venkatraman, 2012). Además, reportaron una relación lineal entre el contenido de TR en la mezcla y la disminución inicial del pH. Estos autores asociaron la adición de TR con una degradación acelerada y con un mayor escape de oligómeros de bajo peso molecular a causa de un mayor hinchamiento de la matriz. Sin embargo, como se verá más

adelante, el hinchamiento de nuestros implantes formados *in situ* a partir de la mezcla TR:DMSO fue similar al de los demás implantes estudiados. Por otro lado, se sabe que la TR se hidroliza en presencia de agua a glicerol y ácido acético (Limpanuparb y col., 2010). Podemos postular entonces que éste último estaría involucrado en la acidificación inicial del medio de incubación de los implantes F4, y que además podría catalizar la degradación del polímero al inicio del ensayo (ver *Factores inherentes al medio de liberación/degradación*, de la **Tabla 4.4**).

Para los cuatro implantes estudiados, los recambios 4 y 5 fueron menos frecuentes, dado que el pH descendió más lentamente.

Se determinó por GC el contenido de solvente remanente en los implantes formados *in situ* a distintos tiempos de degradación. El *Solvente residual (%)*, calculado en base a la masa de implante seco según la **Ecuación 3.3** de la **Sección 3.2.9** de **Materiales y Métodos**, se presenta en la **Figura 4.12** para los implantes F1-4 durante los primeros días de incubación.

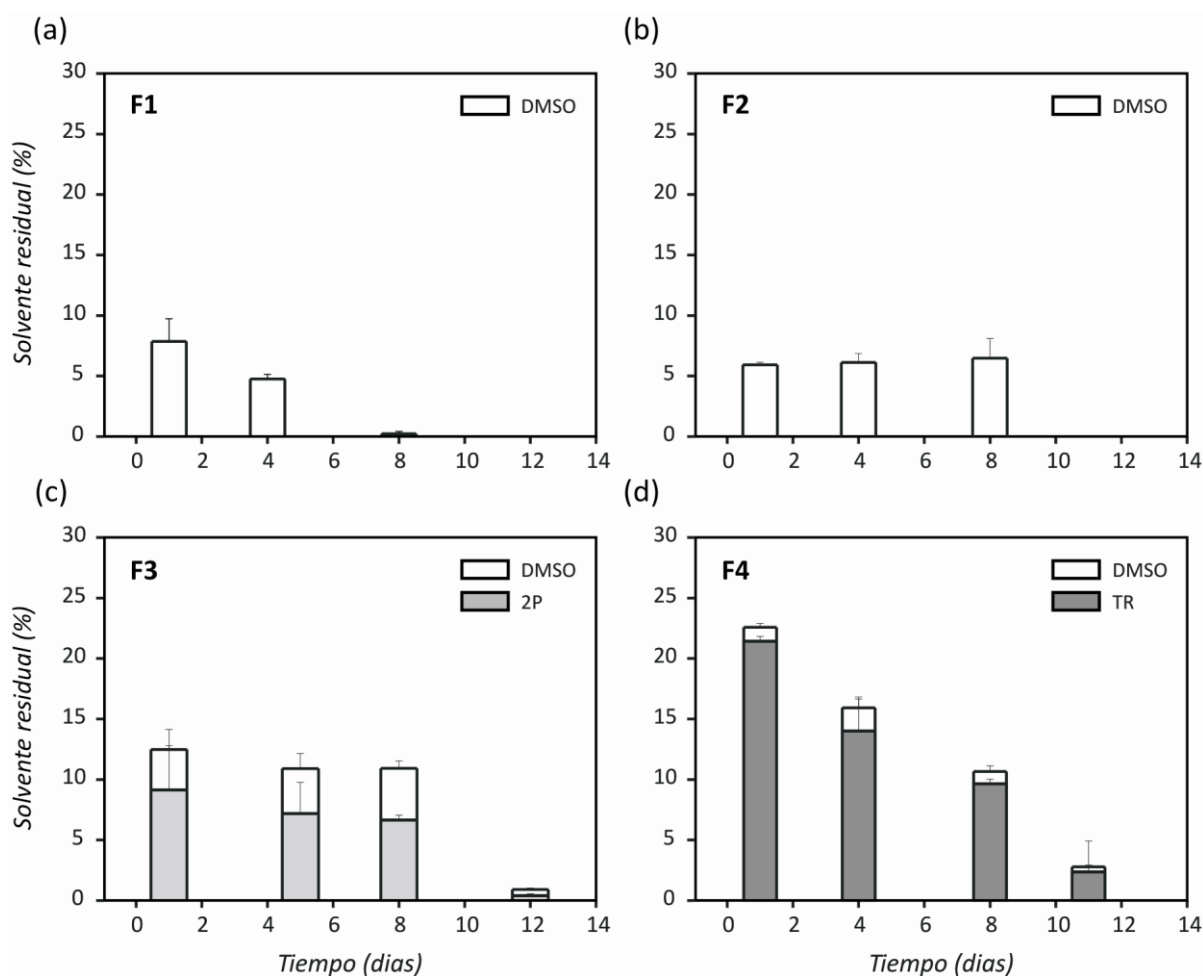


Figura 4.12. Solvente residual (%) de los implantes formados *in situ* a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante los primeros días de incubación *in vitro*.

El contenido de solvente en los implantes F1 de 1 día de incubación fue del 8%, siendo casi nulo (0,2%) a los 8 días (**Figura 4.12 a**). Sin embargo, F2 mantuvo un 6% de solvente residual durante los días 1, 4 y 8 de incubación (**Figura 4.12 b**). A los 12 días, no se detectó DMSO residual en los implantes F1 y F2 por la técnica analítica utilizada. De manera similar a F2, el contenido de solvente en los implantes F3 se mantuvo relativamente constante durante los primeros 8 días de incubación, siendo el contenido de DMSO cercano al 3% y el de 2P entre 9 y 6,5% (**Figura 4.12 c**). A los 12 días de incubación, el solvente residual en los implantes F3 fue menor al 0,5%. Como se observa en la **Figura 4.12 d**, en los implantes F4 el contenido de TR fue del 21% al primer día de incubación y decreció a un 2,5% a los 11 días. El DMSO residual de estos implantes decreció de 1% a 0,4% en este mismo período de tiempo. En los implantes F3 y F4 de mayor tiempo de incubación no se encontró solvente residual por el método de cuantificación utilizado.

El contenido de solvente en los implantes preparados a partir de soluciones poliméricas con mezcla de solventes (F3 y F4) fue mayor que en aquellos implantes preparados a partir de DMSO puro (F1 y F2). La caída en el contenido de solvente fue gradual en F4, mientras que en F3 ocurrió principalmente entre los días 8 y 12 de incubación. La salida de DMSO del implante F2 también ocurrió entre el día 8 y 12, mientras que en F1 fue progresiva. Estos resultados sugieren que el proceso de inversión de fases que da lugar a la precipitación del polímero no es total y ocurre en dos etapas. Al principio, ocurre una solidificación rápida inicial de la capa externa al ponerse en contacto con el PBS, por inversión de fases, donde se libera la mayor proporción del solvente contenido en la formulación. Luego, los solventes del interior difunden hacia fuera más lentamente, culminando el proceso a los 8-12 días.

El solvente residual calculado también se utilizó para corregir la masa de implante seco (M_s^C), como se detalló en la **Sección 3.2.13** de **Materiales y Métodos**.

En la **Figura 4.13** se presenta la variación de la masa remanente, $MR(t)$ (%), de los cuatro implantes estudiados durante los 50 días de incubación. Los perfiles muestran una disminución constante de la masa remanente desde el inicio del ensayo.

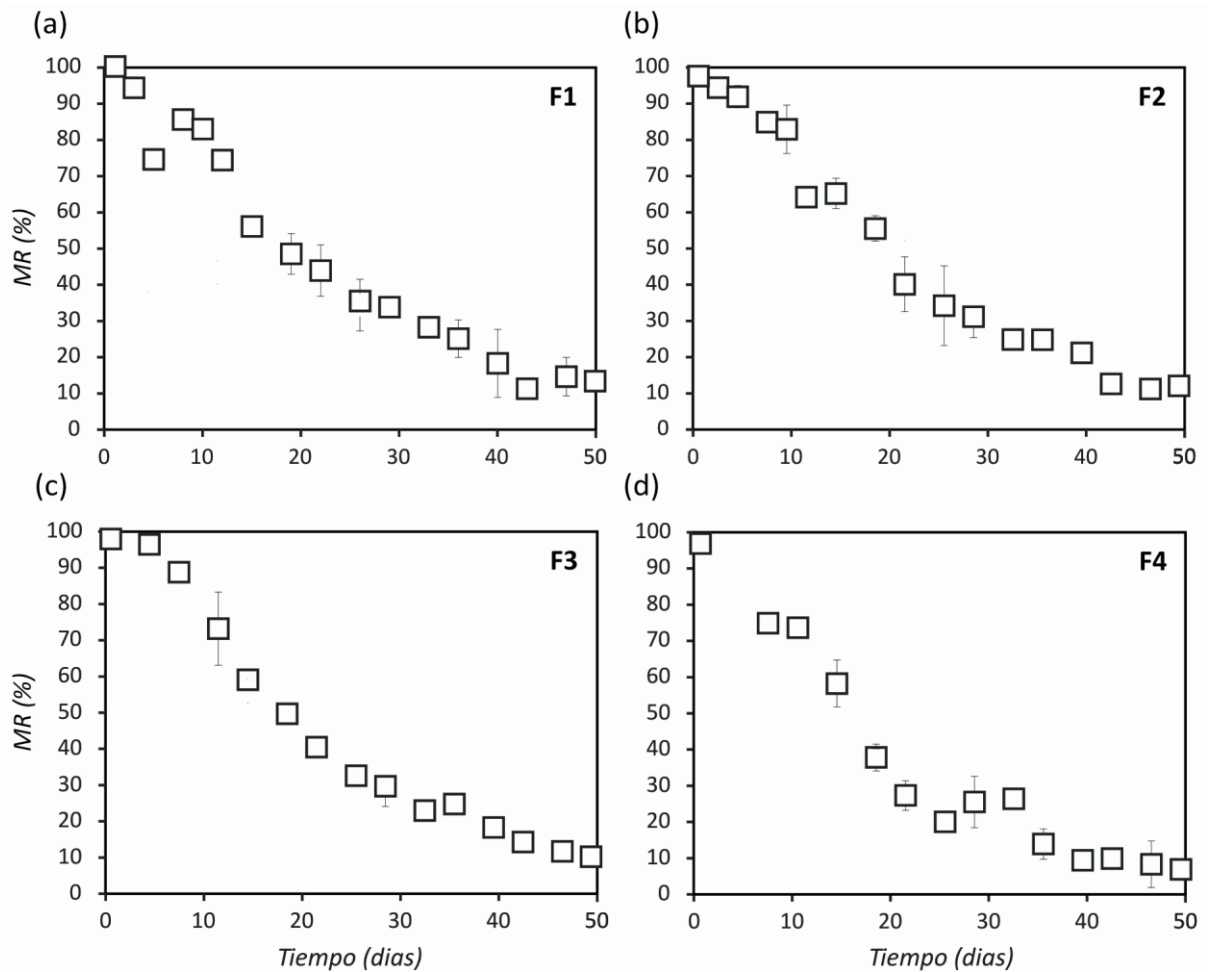


Figura 4.13. Variación de Masa remanente (MR) de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro.

Típicamente, los polímeros que sufren degradación *bulk* como el PLGA presentan perfiles de erosión caracterizados por la presencia de un primer período sin pérdida de masa apreciable (en dónde sólo ocurriría la hidrólisis de las cadenas poliméricas) seguido de una rápida reducción de la masa, una vez que las cadenas de polímero son lo suficientemente cortas como para difundir fuera de la matriz (Göpferich, 1997b). Los cuatro implantes estudiados no presentaron esta fase inicial de retardo, conocida como fase *lag* (que en inglés significa retraso o retardo). Esto podría deberse a un escape de aquellos oligómeros hidrosolubles que difunden junto con el solvente, donde se encuentran disueltos durante la precipitación *in situ* del implante. La disminución de la MR fue más pronunciada para los implantes F4 (**Figura 4.13 d**). A los 26 días de degradación, se puede observar que, mientras F1-3 presentaron un 35% de MR, F4 exhibió sólo un 23%. Transcurridos 50 días de degradación, la masa remanente de los implantes F1, F2, F3 y F4 fue de 14, 15, 13 y 10%, respectivamente.

Los datos obtenidos de MR (%) en función del tiempo (t) se ajustaron con una cinética de pseudo-primer orden para evaluar las velocidades de erosión de los distintos implantes, como se ha reportado para otros sistemas de PLGA (Göpferich, 1997b; Vey y col., 2011):

$$\ln(MR(\%)) = -k \cdot t + b \quad (4.1)$$

Donde k es la constante cinética de erosión exponencial y b es la ordenada al origen.

En la **Tabla 4.5** se presentan las constantes cinéticas de pseudo-primer orden calculadas y los valores del ajuste correspondiente.

Tabla 4.5. Parámetros de erosión del ajuste de MR a la **Ecuación 4.1**, para los cuatro implantes investigados

	F1	F2	F3	F4
Puntos experimentales (n)	17	17	15	15
k (día⁻¹)^a	-0,044 (0,004)	-0,043 (0,003)	-0,045 (0,002)	-0,052 (0,006)*
R^2	0.9668	0.9804	0.9902	0.9555

La bondad de ajuste se realizó usando el coeficiente de correlación R^2 .

^a Los resultados se expresan como: *valor del ajuste (DE)*.

Test estadístico: ANOVA y posterior test de Bonferroni. * indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

El ajuste lineal de los datos de los cuatro sistemas de acuerdo con la **Ecuación 4.1** presentó, en todos los casos, un coeficiente de correlación estándar (R^2) mayor a 0,95, indicando un ajuste aceptable de los datos. No hubo diferencia significativa entre las constantes de erosión k de los implantes F1-3, mientras que para F4 fue estadísticamente mayor. Este resultado está en concordancia con el perfil de $MR(t)$ (%) más pronunciado observado para estos implantes. Estos resultados indican que la erosión de los implantes con TR es más rápida, como lo reportado en la bibliografía (Liu y Venkatraman, 2012).

La fracción de agua (F_{H2O}) de los implantes, se determinó como medida de la cantidad de fluido que la matriz puede incorporar en su estructura. Asumiendo la hipótesis de que todos los poros se encuentran interconectados (no existen poros cerrados), y de que el volumen de poro es igual al volumen de agua dentro de la matriz, F_{H2O} sería igual a la fracción hueca de los implantes. Sin embargo, el volumen de agua dentro de una matriz polimérica es un mal indicador de la porosidad cuando los polímeros tienden a hincharse (Yan y col., 2000). F_{H2O} se refiere al agua presente no

solo dentro de la estructura porosa, sino también aquella que se encuentra dentro de los intersticios entre las cadenas poliméricas. Por lo que éste parámetro es un buen indicador del hinchamiento de la matriz polimérica.

La **Figura 4.14** muestra la variación de F_{H_2O} de los cuatro implantes estudiados durante los 50 días de ensayo.

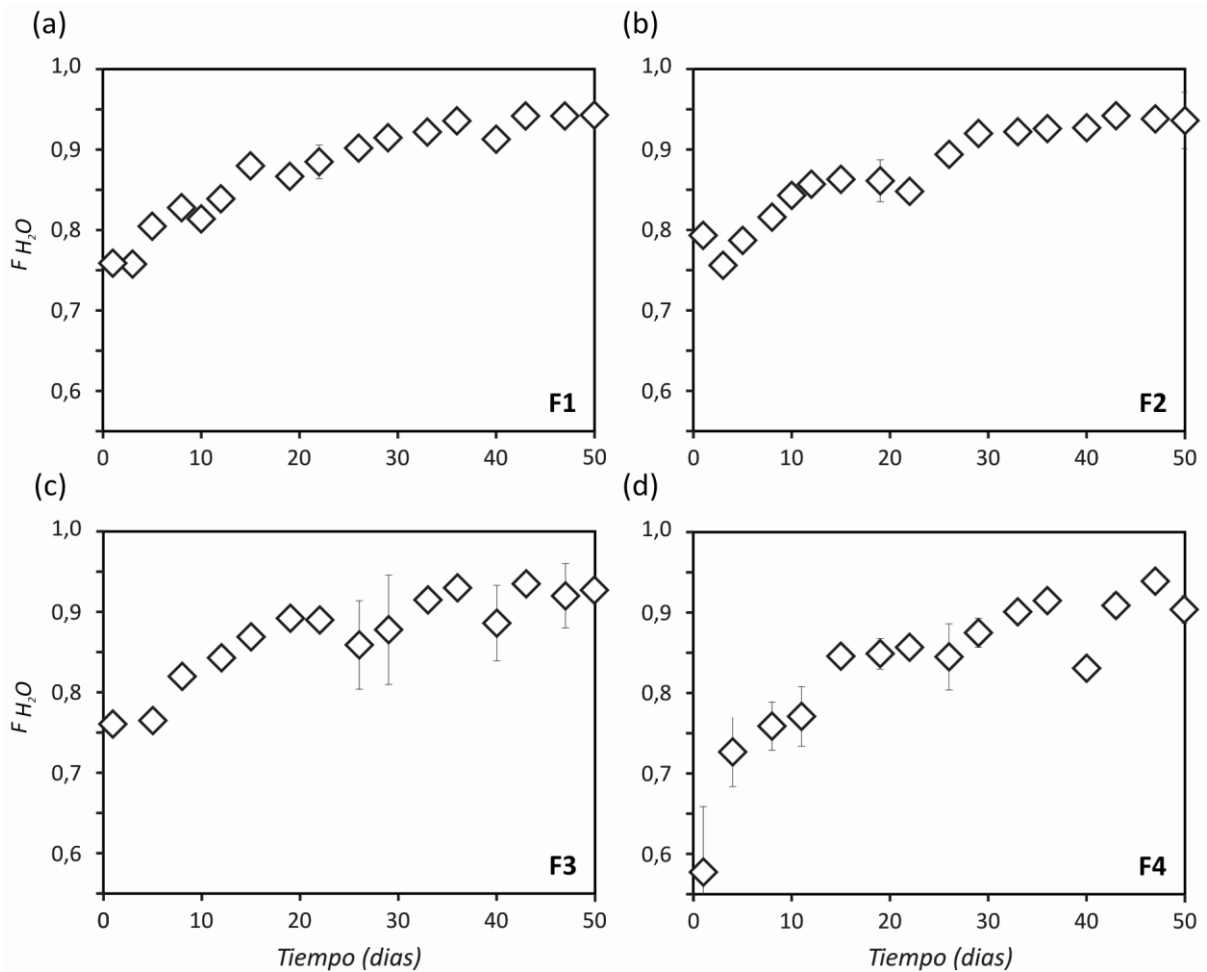


Figura 4.14. Variación de la Fracción de agua (F_{H_2O}) de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro.

Se puede observar que los cuatro implantes ganaron agua durante todo el ensayo, siendo mayor el crecimiento de las curvas durante los primeros 20-25 días de ensayo. Al primer día de incubación, la fracción de agua en los implantes F1-3 fue de 0,75, mientras que los implantes F4 presentaron un valor de F_{H_2O} cercano a 0,6, aumentando rápidamente al cuarto día de incubación. Esta diferencia estaría asociada a un efecto del tipo de solvente en la absorción de agua dentro del implante. Esto es, la TR de la formulación F4 es poco soluble en agua y, como se estudió en la

Sección 4.1, debido a esta menor solubilidad del solvente el proceso de inversión de fases ocurre más lento. A pesar de que durante los primeros 12 días F4 presenta una menor fracción de agua, luego, el comportamiento de este implante es similar al resto, alcanzando todos un valor de F_{H_2O} de aproximadamente 0,93 al día 50 de degradación. La dispersión observada en los últimos puntos de las curvas probablemente este asociada al error experimental cometido durante la manipulación de los implantes, cuya mayor degradación los volvió más frágiles, haciendo difícil una correcta cuantificación del contenido de agua.

La hidratación de los polímeros es uno de los factores que influyen en la degradación y en la liberación de principios activos a través de la matriz. La hidrofiliidad en los polímeros está dada por el grado de hinchamiento, el cual se calcula a partir de la relación entre el volumen de polímero hinchado y el volumen del polímero seco. Durante el hinchamiento, se produce la incorporación del líquido en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, provocando una dilatación de la misma. Al proceso de dilatación se le opone una fuerza elástica-retráctil, la cual se opone a su vez a la penetración de medio exterior (Comyn, 1985). El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando se igualan la fuerza de hinchamiento y la fuerza elástica-retráctil.

Para el PLGA se ha reportado el ingreso de agua dentro la matriz polimérica de tipo difusivo según las leyes de Fick (Huang y Brazel, 2001; Proikakis y col., 2006; Turino, 2012). Para una matriz polimérica, la difusión Fickiana es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. En los sistemas estudiados no se encontró una relación lineal entre el hinchamiento y \sqrt{t} , probablemente debido a la limitante espacial de las bolsas de diálisis, que impiden un hinchamiento radial y limitan el hinchamiento longitudinal de los implantes.

Siguiendo con la caracterización de la degradación del PLGA, se estudiaron los implantes por cromatografía de exclusión molecular (SEC). En la **Figura 4.15** se presenta la DPM del PLGA de partida provisto por Boehringer Ingelheim.

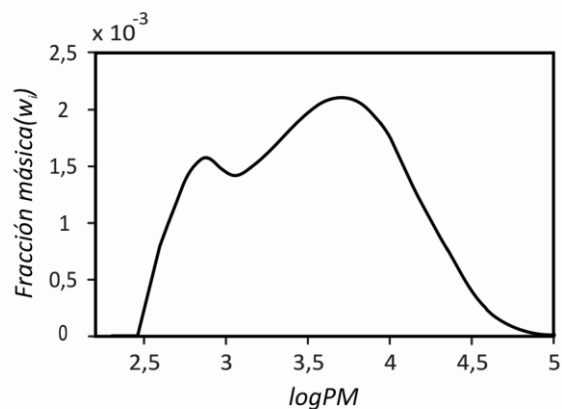


Figura 4.15. Distribución de peso molecular del PLGA de partida con el que se prepararon las formulaciones de precipitación *in situ*.

Como se puede observar, el PLGA de partida presenta una DPM bimodal. Con un modo principal de alto peso molecular, cuyo valor máximo se encuentra a un valor de pico del logaritmo de peso molecular ($\log PM_p$) de 3,8 y un segundo modo de bajo peso molecular a 2,9 $\log PM_p$. Comúnmente, no se reportan PLGA con DPM bimodales en la bibliografía. Sin embargo, a pesar de no estar expresado de manera explícita, algunos trabajos presentan DPM bimodales para ácido PLA (Mobedi y col., 2006), PLGA Resomer RG 503H (Zolnik y Burgess, 2007) y PLGA Resomer RG 502H (Jaklenec y col., 2008). A pesar de la bimodalidad observada, el valor de M_w de nuestro PLGA de partida se encontró dentro del rango esperado para el PLGA RG 502H de Boehringer Ingelheim (en el rango 7000-17000 g/mol).

En la **Figura 4.16** se presenta la evolución de las DPM normalizadas a la masa remanente de los sistemas estudiados (F1-4). Es evidente el decrecimiento de las áreas bajo la curva a medida que el proceso erosional avanza. Durante los primeros 12 días de degradación, se produce en los cuatro sistemas estudiados una pérdida en la fracción másica del modo de alto peso molecular y un incremento relativo en el modo de bajo peso molecular. Esto indicaría un proceso de hidrólisis de las cadenas más largas, aumentando la población de cadenas de menor longitud.

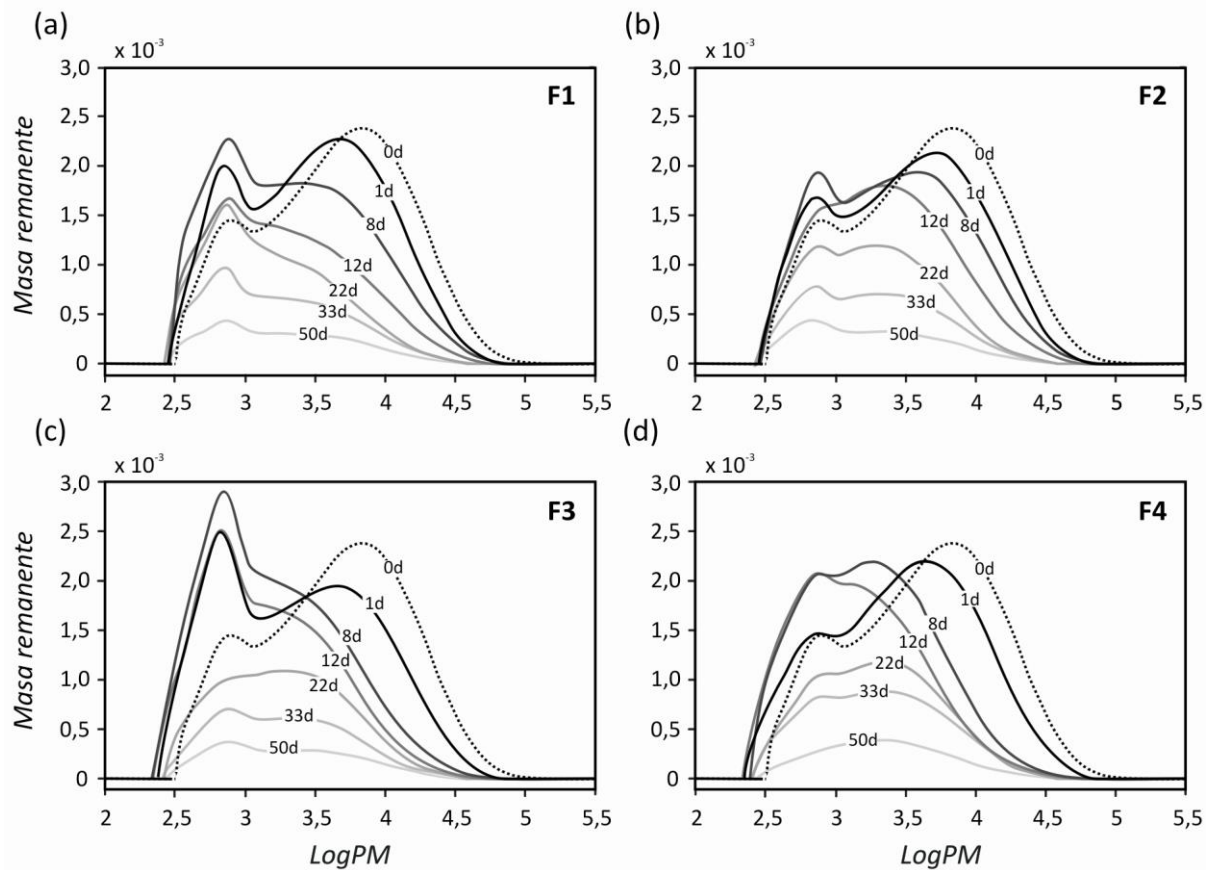


Figura 4.16. Evolución de la distribución de peso molecular normalizadas a la masa remanente de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro. La línea de puntos (0d) corresponde al PLGA de partida.

Los implantes F1-3 presentaron un comportamiento cromatográfico similar durante los 50 días de ensayo (**Figura 4.16 a, b y c**). El modo principal de alto peso molecular, con $\log PM_p$ inicial de 3,8, presenta un desplazamiento hacia menores pesos moleculares hasta alcanzar un $\log PM_p$ de 3,4 aproximadamente al día 12 de degradación (para F1 y F2) y al día 8 (para F3), mientras que el pico de bajo peso molecular se mantiene sin variaciones a un valor de $\log PM_p$ de 2,9. Estos resultados se pueden apreciar mejor en la **Figura 4.17**, donde se graficó la evolución en el tiempo de los máximos de los modos de las DPM, esto es, $\log PM_p$, para los implantes F1-4. A partir del día 12 en adelante (para F1 y F2), y del día 8 (para F3), los modos permanecen constantes en 3,4 y 2,9 $\log PM_p$, con algunas variaciones en las fracciones másicas de estos modos.

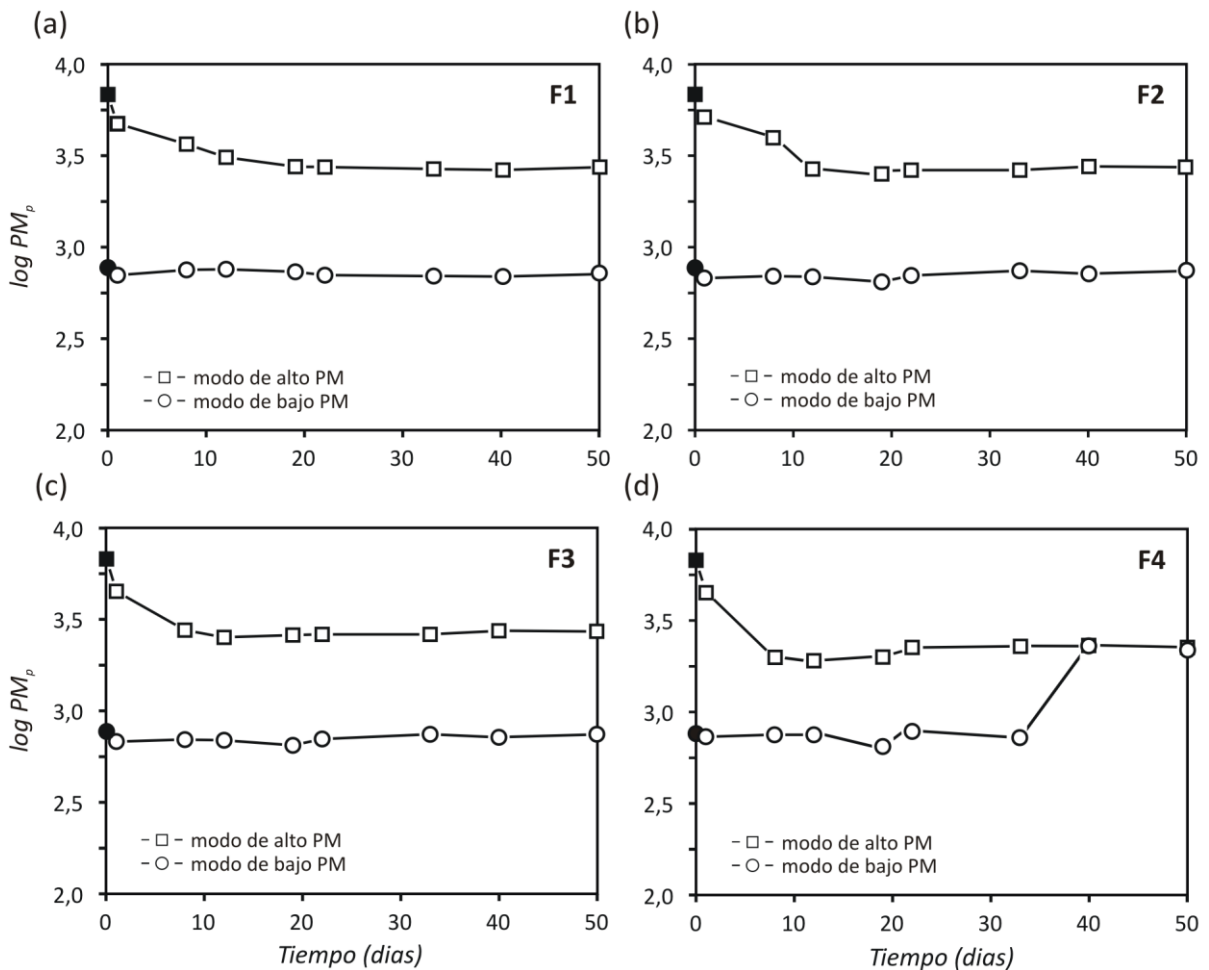


Figura 4.17. Evolución en el tiempo del pico del logaritmo de peso molecular ($\log PM_p$). (□) Modo de alto peso molecular y (○) modo de bajo peso molecular, de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro. Los símbolos ● y ■ corresponden a los $\log PM_p$ del PLGA de partida.

A diferencia de los otros tres implantes, los implantes con TR presentaron un desplazamiento del pico de alto peso molecular más drástico: de 3,8 a 3,3 a los 8 días de incubación. A los 22 días este pico se corre a 3,35 $\log PM_p$ y se mantiene hasta el final de la experiencia. El pico de bajo peso molecular se mantiene en un valor de 2,9 $\log PM_p$ hasta el día 33 de degradación, solapándose luego a los 40 (no mostrado) y 50 días de incubación, con el pico de alto peso molecular formando un único modo ancho centrado en 3,35 $\log PM_p$. Estos resultados se ven reflejados en la **Figura 4.17 d**, donde la curva del modo de alto peso molecular se une con la curva del modo de bajo peso molecular. La última observación en la que es importante detenerse es que, a simple vista, las DPM de F4 presentan una mayor fracción másica sobre la región de bajo peso molecular. Esto es, las curvas están desplazadas más hacia la izquierda, lo que estaría indicando una mayor proporción de cadenas poliméricas de bajo peso molecular.

A partir del análisis de las DPM, se determinaron los pesos moleculares promedio para los sistemas estudiados. La **Figura 4.18** presenta la variación de M_w y M_n para los implantes formados *in situ* F1-4 durante los 50 días de ensayo.

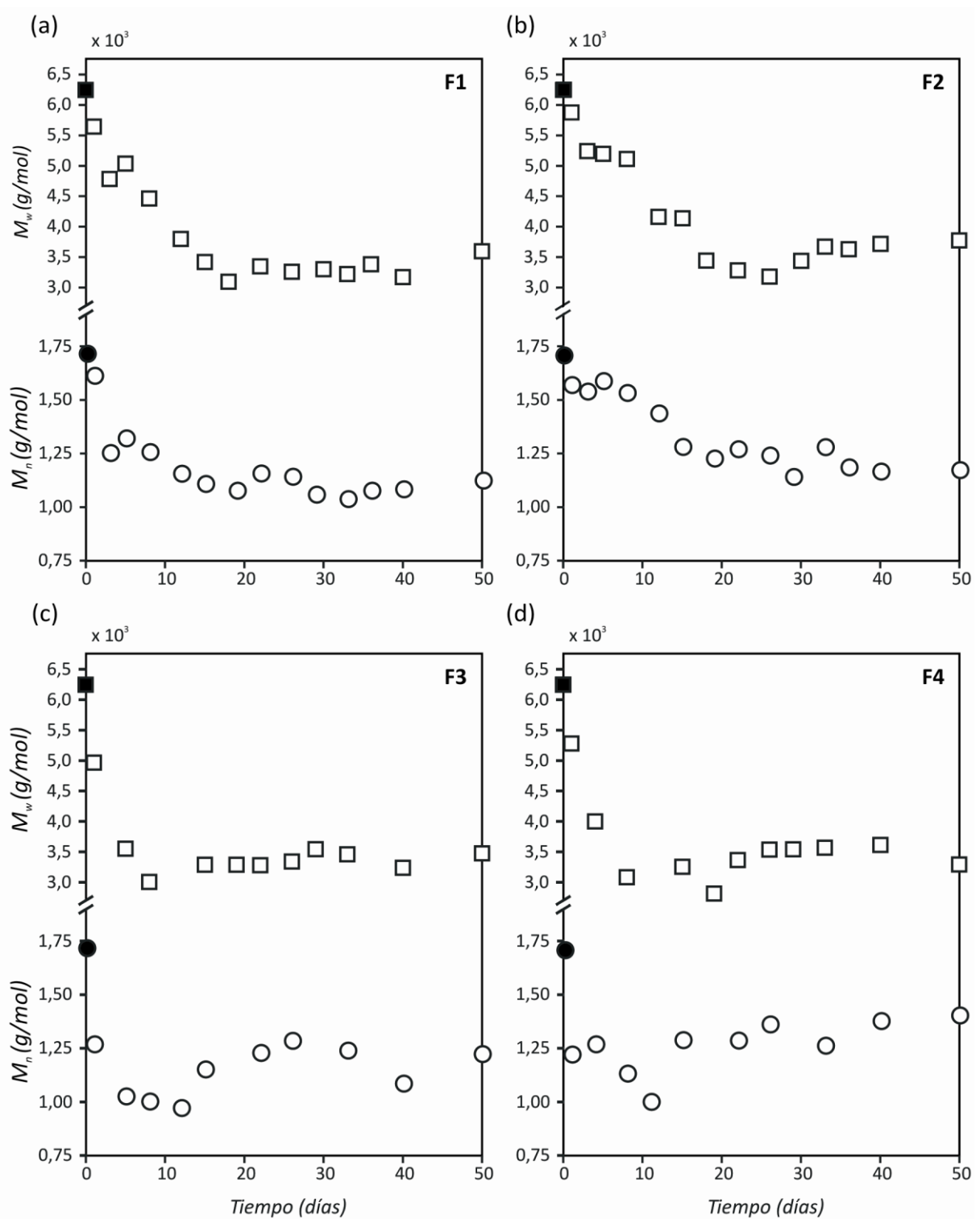


Figura 4.18. Evolución de los pesos moleculares promedio en peso M_w (\square) y en número M_n (\circ) de los implantes formados *in situ* a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación *in vitro*. Los símbolos \blacksquare y \bullet corresponden al M_w y al M_n del PLGA de partida.

Se observa que los perfiles de M_w de los cuatro implantes presentan una caída de M_w inicial para luego alcanzar un valor aproximadamente constante de 3300 g/mol. Ésta disminución inicial del M_w indica que la hidrólisis comienza inmediatamente cuando se ponen las formulaciones en contacto con el medio de degradación. Además, se observa que esta caída es más pronunciada para los implantes que contenían mezcla de solventes (F3 y F4): mientras que el M_w de F1 y F2 alcanza un valor de 3300 g/mol a los 15 días aproximadamente, F3 y F4 presentan este valor a los 10 días. En el caso de los implantes F3, restos de 2P en el implante podrían estar involucrados en una mayor hidrólisis de las uniones éster. Se ha reportado en la bibliografía que el PLGA se degrada más rápido en presencia de 2P que de DMSO (Dong y col., 2006). Esto debido a que, al ser la 2P un solvente prótico polar, es capaz de donar protones y posiblemente formar puentes hidrógeno con el PLGA, quedando las uniones éster más expuestas al agua, aumentando así la hidrólisis. Esto queda evidenciado en las DPM de los implantes F3, cuyo pico de mayor peso molecular presenta un desplazamiento más pronunciado hacia menores pesos moleculares a los 8 días (**Figura 4.16 c**), respecto de los implantes F1 y F2 (**Figura 4.16 a** y **Figura 4.16 b**). En cambio, la TR es un solvente aprótico como el DMSO, por lo que en estos implantes, otros mecanismos estarían involucrados asociados al comportamiento diferencial de la DPM observado respecto al resto, como la acidificación del medio a causa de ácido acético, como se comentó anteriormente.

Los perfiles de M_n de los cuatro sistemas estudiados presentaron una tendencia similar a la de M_w . Los primeros días de degradación ocurre una caída abrupta en los implantes F3 y F4 (menos pronunciada en los implantes F1 y F2) que, a partir del día 12 (día 18 para los implantes F1 y F2), alcanza un valor aproximado de 1100-1200 g/mol, valor que se mantiene hasta finalizar el ensayo. En este caso, los datos tuvieron mayor dispersión, posiblemente debido a que este parámetro es muy sensible a la concentración de cadenas de polímero de bajo peso molecular (Mohd-Adnan y col., 2008). Además, la corrección por línea de base hecha a las curvas de DPM, principalmente la que se lleva a cabo a bajos pesos moleculares, estarían acentuando este problema.

Es interesante observar el comportamiento del índice de polidispersidad, I_p (M_w/M_n). Este parámetro, es una medida de la variedad de pesos moleculares de las diferentes cadenas que componen la muestra de polímero.

En la **Figura 4.19** se muestra la variación del I_p en función del tiempo para los cuatro implantes estudiados.

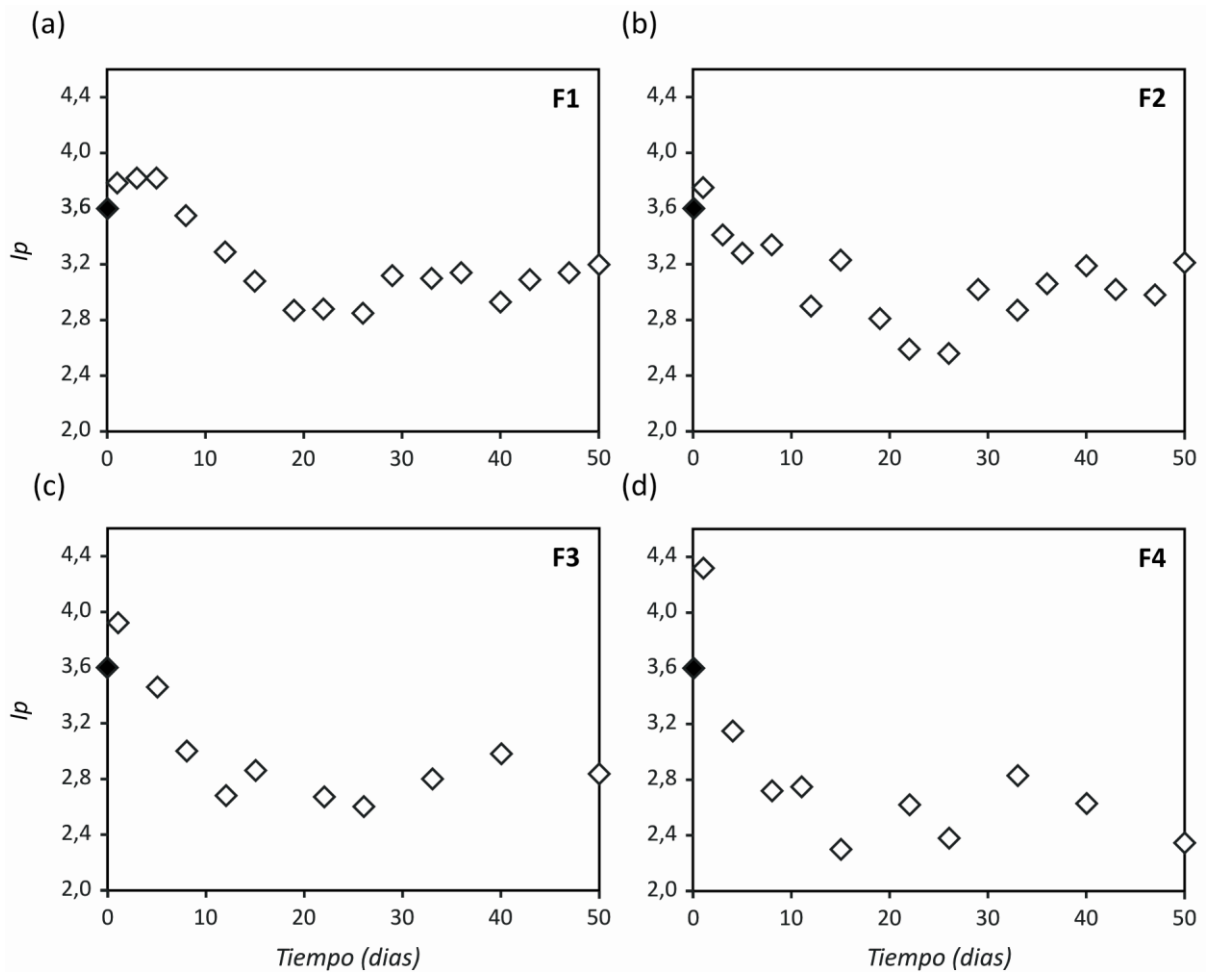


Figura 4.19. Evolución del índice de polidispersidad (I_p) de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro. El símbolo • corresponde al I_p del PLGA de partida.

Los primeros días de degradación, el I_p aumenta para los cuatro sistemas. Luego, en todos los implantes el I_p cae a medida que transcurre la degradación, lo que indicaría que el M_w desciende más rápido que el M_n . Según lo reportado por Hausberger y colaboradores (Hausberger y col., 1995), esto estaría indicando que las cadenas poliméricas de PLGA, bajo las condiciones en estudio, estarían preferentemente sufriendo una degradación aleatoria (del inglés, *random scission*). Mientras que un aumento del I_p indica que la degradación esta gobernada por una hidrólisis de los enlaces ubicados en los extremos de las cadenas poliméricas (del inglés, *unzipping scission*). Así, un decrecimiento más rápido de M_w que de M_n significa la escisión de cadenas poliméricas largas en puntos aleatorios creando cadenas más cortas que, en el promedio, son más largas que oligómeros y monómeros (generados en una escisión por los extremos). El aumento del I_p observado al inicio de la experiencia en los cuatro sistemas estudiados, asociado a una escisión por extremo de las cadenas poliméricas, podría estar relacionado a un efecto del solvente residual en la matriz polimérica.

Por último, los implantes F4 alcanzan un valor de I_p medio mas bajo respecto a los otros implantes (2,6 versus 2,9) (**Figura 4.19 d**), como resultado de los perfiles monomodales obtenidos en las DPM de F4 degradado (ver **Figura 4.16 d**).

El paso a seguir fue determinar si la escisión que sufren las cadenas poliméricas de PLGA, tiene preferencia a ocurrir entre enlaces AL-AL, AL-AG o AG-AG. En la **Figura 4.20** se muestran los perfiles de $AL_{remanente}$ y $AG_{remanente}$ (%) en fase sólida para los cuatro sistemas estudiados.

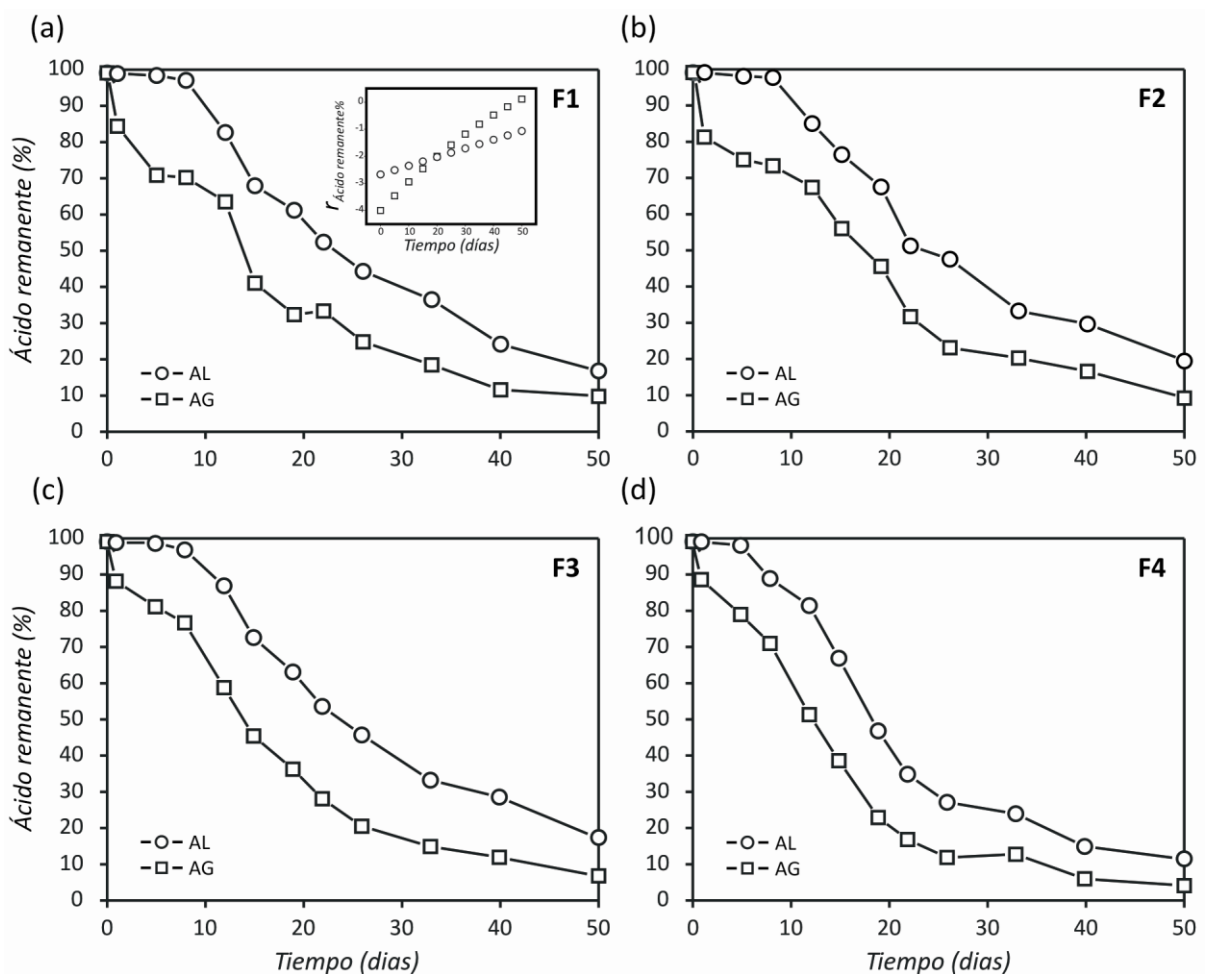


Figura 4.20. Evolución del contenido de ácido $AL_{remanente}$ % (○) y $AG_{remanente}$ % (□) de los implantes formados in situ a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación in vitro. Gráfico insertado en (a): Tasa de cambio de $AL_{remanente}$ % (○) y $AG_{remanente}$ % (□) en los implantes F1 durante la degradación in vitro. Los implantes F2-4 presentaron tendencias similares.

De un análisis visual de las gráficas, podemos inferir que la hidrólisis aleatoria de los enlaces en el PLGA ocurre a distintas velocidades. Siendo las uniones éster AG-AG y AG-AL las que presentan mayor probabilidad de ser hidrolizadas que las uniones AL-AL. Esto se deduce a partir de que las curvas de AG remanente comienzan a disminuir antes que las curvas correspondientes al AL.

En el gráfico dentro de la **Figura 4.20 a**, se presenta la tasa de cambio del remanente de ácido ($r_{\text{Ácido remanente}}$) en función del tiempo, donde se observa más claramente este resultado: la pendiente de la curva de AL es significativamente menor que la de AG. Estos resultados se confirmaron además al cuantificar la liberación de cada uno de los monómeros en fase líquida (no se muestran datos).

Esta mayor velocidad de hidrólisis de las uniones AG, probablemente se deba a un efecto estérico del grupo metilo de la lactida, que dificulta el acceso del agua, y a la menor hidrofiliicidad de éste monómero, que causa una repulsión de las moléculas de agua, causantes de la hidrólisis de los enlaces éster de las cadenas poliméricas (ver **Figura 4.21**). Las unidades de AG constituyen puntos vulnerables en las cadenas macromoleculares, ya que no cuentan con este grupo metilo, por lo que la degradación ocurre preferentemente en las uniones AG (AG-AG y AG-AL). Estos resultados son consistentes con los reportados en la bibliografía (Alexis y col., 2006; Ding y col., 2006; Giunchedi y col., 1998; Li y col., 1990; Vey y col., 2011; Yoo y col., 2005a).

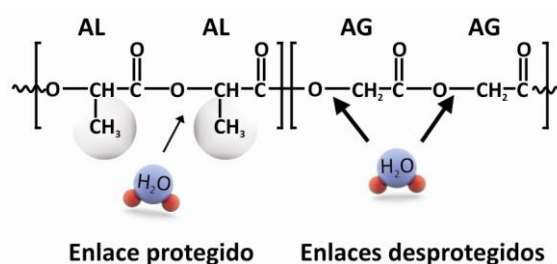


Figura 4.21. Esquema de la susceptibilidad a la hidrólisis de los enlaces éster del PLGA.

Una mayor velocidad de hidrólisis del AG aumenta el contenido de AL en la matriz polimérica, aumentando de esta manera su hidrofobicidad. Una mayor hidrofobicidad resulta en una difusión de agua más lenta hacia el interior de la matriz (Vey y col., 2011). Por lo que estos resultados podrían justificar, en parte, la desaceleración en los perfiles de Fracción de agua (F_{H_2O}) observada para los cuatro sistemas (**Figura 4.14**).

Se ha confirmado entonces, que la erosión se ajusta bien a una cinética de pseudo primer orden en los sistemas estudiados. Que durante los primeros días de incubación, la degradación de las cadenas poliméricas ocurre por los extremos, pero que luego, y durante prácticamente todo el ensayo, ocurre de manera aleatoria, como se reporta comúnmente en la bibliografía. Que existe una preferencia del agua por hidrolizar primero enlaces que contengan AG que AL. Esto se debe probablemente al impedimento estérico causado por el grupo metilo que posee la lactida en su

estructura química, y por la repulsión electrostática de éste monómero debido a su menor hidrofiliidad. En cuanto a los perfiles de M_w y M_n , los implantes con mezcla de solventes presentaron caídas más pronunciadas respecto a los implantes formados a partir de DMSO puro, pero sólo F4 presentó una constante cinética de erosión mayor.

Para poder entender un poco más estos resultados, se estudió por SEM la morfología de los implantes formados *in situ* F1-4 y los cambios de éstas estructuras durante la degradación *in vitro*.

Es importante tener en cuenta dos cuestiones a la hora de analizar las imágenes obtenidas por SEM. En primer lugar, cabe recordar que el PLGA con que se trabajó en esta tesis es un polímero amorfo con una T_g de 42–46 °C, por lo que es necesario tomar ciertos recaudos a la hora de procesar las muestras para SEM. Si alguna región de la matriz procesada sufre un incremento de temperatura por encima de su T_g , probablemente las imágenes obtenidas por SEM no representarán verdaderamente la muestra en estudio, dado que ésta se deforma (se vuelve gomosa) y no vuelve a recuperar su estructura original. Hemos encontrado trabajos en la bibliografía que presentan polímeros cuya estructura se encontraba alterada debido al procesamiento de las muestras (Astaneh y col., 2009; Astaneh y col., 2006; Eliaz y Kost, 2000; Liu y Venkatraman, 2012; Liu y col., 2010). Por otro lado, el proceso de inversión de fases que da lugar a la precipitación del polímero no es inmediato. Luego de una liberación de solvente inicial al ponerse en contacto con el PBS, quedan moléculas de solvente fuertemente retenido en el interior de la matriz, que difunden hacia fuera más lentamente. Como se estudió al inicio de esta sección, quedan en el interior de los implantes pequeñas cantidades de solvente residual que, a la hora de secar las muestras para procesarlas para SEM, pueden redissolver el polímero logrando que éste pierda parte de su morfología.

En la **Figura 4.22** se presentan secciones transversales de un cuarto de los implantes formados *in situ* de 3 y 12 días de degradación *in vitro*.

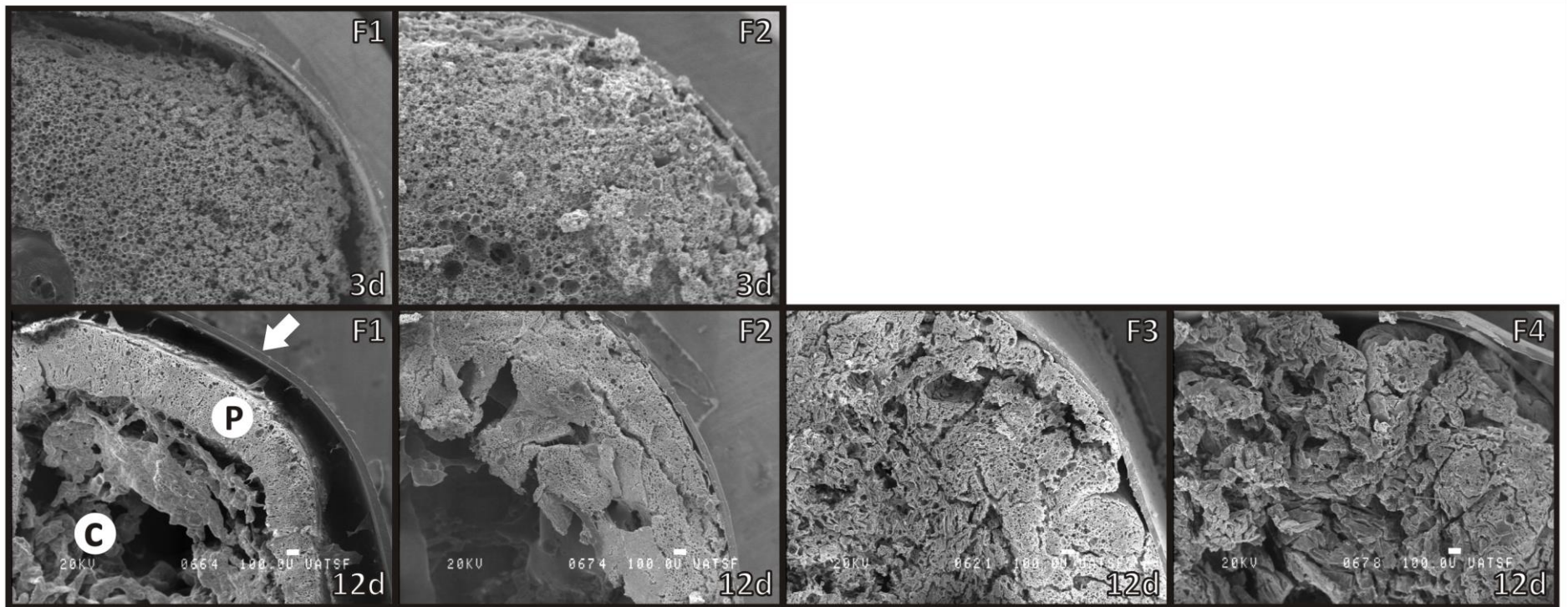


Figura 4.22. Fotomicrografías SEM de implantes F1-4 formados in situ de 3 y 12 días de degradación in vitro. Las letras C y P indican el centro y la pared del implante, respectivamente. La flecha indica la membrana de diálisis. Las fotomicrografías están tomadas a 40X, la barra indica 100 μm .

Debido a la presencia de solvente residual en la matriz polimérica de los implantes F3 y F4 luego de tres días de incubación, los implantes formados *in situ* fueron totalmente destruidos durante el proceso de secado por congelación de la preparación de muestras para SEM. Los implantes formados *in situ* F1 y F2 presentaron a los 3 días de incubación una estructura muy porosa y no homogénea. Resultados similares fueron reportados previamente por otros autores (Kranz y col., 2008). El aspecto “liso” del centro de F1 apareció luego del procesamiento, dado que al realizar el corte transversal el centro se encontraba intacto. Al secar los implantes al vacío, probablemente el solvente residual contenido en el centro disolvió el polímero. A los 12 días de incubación, se puede diferenciar en los implantes F1 y F2 dos regiones: la superficie o capa externa superficial (rodeada por la membrana de diálisis utilizada en el ensayo) y el centro. La capa externa de estos implantes se encontró recubierta de poros, mientras que el centro tiene un aspecto más degradado. Este centro más degradado probablemente se deba a un efecto autocatalítico de los productos de degradación. Una menor Tg en el centro debido a un efecto de autocatálisis probablemente sea la causante del aspecto de estas estructuras en los implantes formados *in situ* de 12 días de degradación: ausencia de poros debido al estado gomoso del polímero a la temperatura de trabajo. Los implantes F3 de 12 días de incubación, presentaron una superficie con algunos pliegues, que en los implantes F1 y F2 no se observaron. La ausencia de pliegues en los implantes formados a partir de DMSO puro debe estar asociado al efecto explosivo de su liberación, visto en la **Sección 4.1** del presente capítulo (**Figura 4.7**). Una más rápida inversión de fases generó un endurecimiento rápido de la capa externa, mientras que la precipitación de F3 dio lugar a una estructura porosa, con una capa externa un poco más “abierta”, y un centro más íntegro.

Por otro lado, el implante F4 presentó una morfología diferente, sin una diferenciación clara entre el centro y la superficie, con una estructura con pocos poros macroscópicos, con pliegues, grandes canales y cavidades. Esta estructura es producto de la más lenta inversión de fases causada por el contenido de TR (solvente poco soluble en agua) en la formulación, que hace que la matriz se mantenga de una manera más fluida durante más tiempo. Estructuras con algunas cavidades grandes y poros no-interconectados fueron reportadas por otros autores para implantes de PLGA formados *in situ* a partir de formulaciones conteniendo TR (Brodbeck y col., 1999a; Graham y col., 1999). Estos canales y cavidades probablemente permitan una mejor difusión de los productos de degradación, evitando o disminuyendo el efecto de autocatálisis observado en los otros implantes.

En la **Figura 4.23** se observan secciones transversales de un cuarto de los implantes formados *in situ* de 22 y 33 días de degradación *in vitro*.

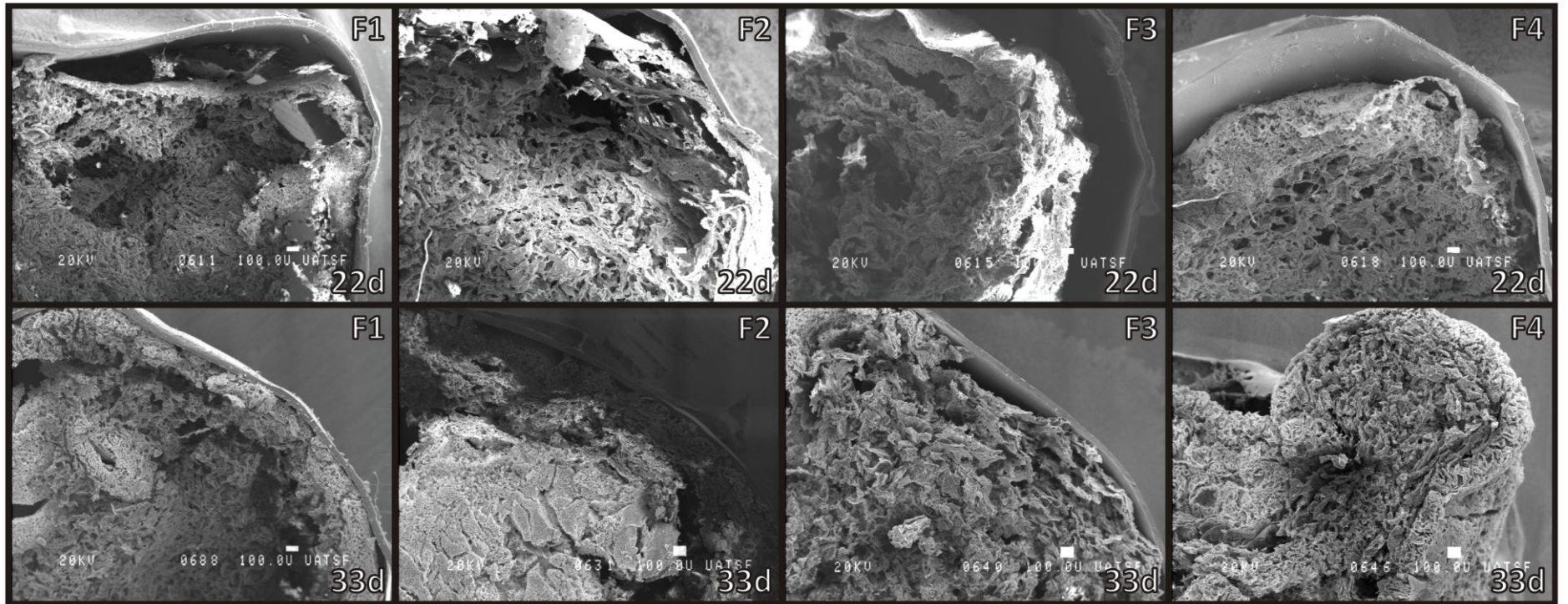


Figura 4.23. Fotomicrografías SEM de implantes F1-4 formados in situ de 22 y 33 días de degradación in vitro. Las fotomicrografías están tomadas a 40X, la barra indica 100 μm .

A los 22 días de degradación, los cuatro implantes estudiados presentan su estructura más degradada, tanto en el interior como en la capa superficial. Se puede apreciar también la reducción en el diámetro de alguno de los implantes. A los 33 días, todos los implantes estudiados presentan una estructura macroscópica similar a la de los 22 días, con un proceso de degradación/erosión más avanzado a lo largo de toda la sección transversal.

En la **Figura 4.24** y la **Figura 4.25** se presentan fotomicrografías tomadas a mayor aumento de los implantes degradados *in vitro* de 3 y 12 días y de 22 y 33 días, respectivamente. Los implantes preparados a partir de DMSO puro de tres días de incubación presentaron una estructura con poros esféricos de tamaño no homogéneo. A los 12 días, la estructura de F1-2 es similar que a los 3 días, mientras que F3 presenta poros no esféricos de diferentes tamaños. La morfología de F4 es diferente, con pocos poros no esféricos de mayor tamaño, con pliegues cuyas paredes poseen gran cantidad de nanoporos, y regiones abiertas o “huecos”. A los 22 días de degradación (**Figura 4.25**), la morfología que presentaron los implantes F1-3 fue similar. Los poros adquieren una estructura amorfa y comienzan a fusionarse unos con otros. Mientras que F4 presenta una estructura con pliegues carente de cualquier tipo de poros. A los 33 días, las estructuras son semejantes a la de los 22 días de degradación, pero se evidencia claramente en los cuatro implantes el proceso erosional avanzado.

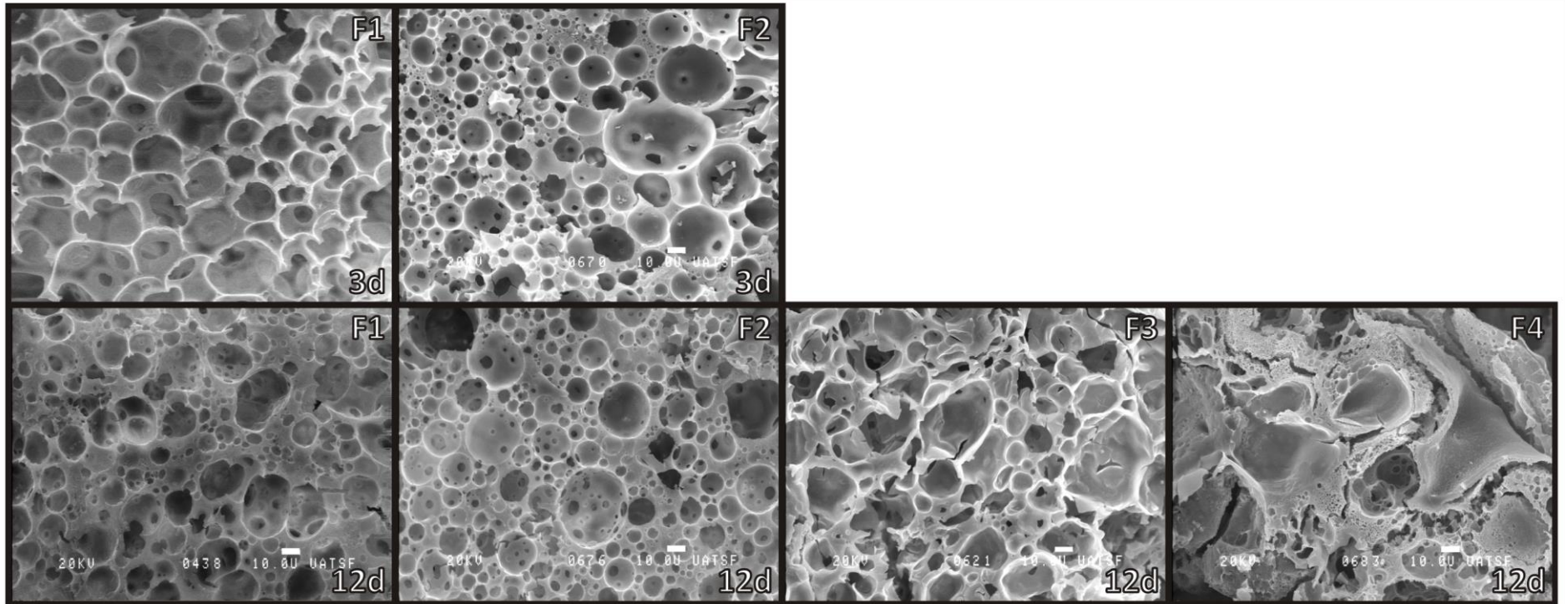


Figura 4.24. Fotomicrografías SEM de implantes F1-4 formados in situ de 3 y 12 días de degradación in vitro. Las fotomicrografías están tomadas a 600X, la barra indica 10 μm .

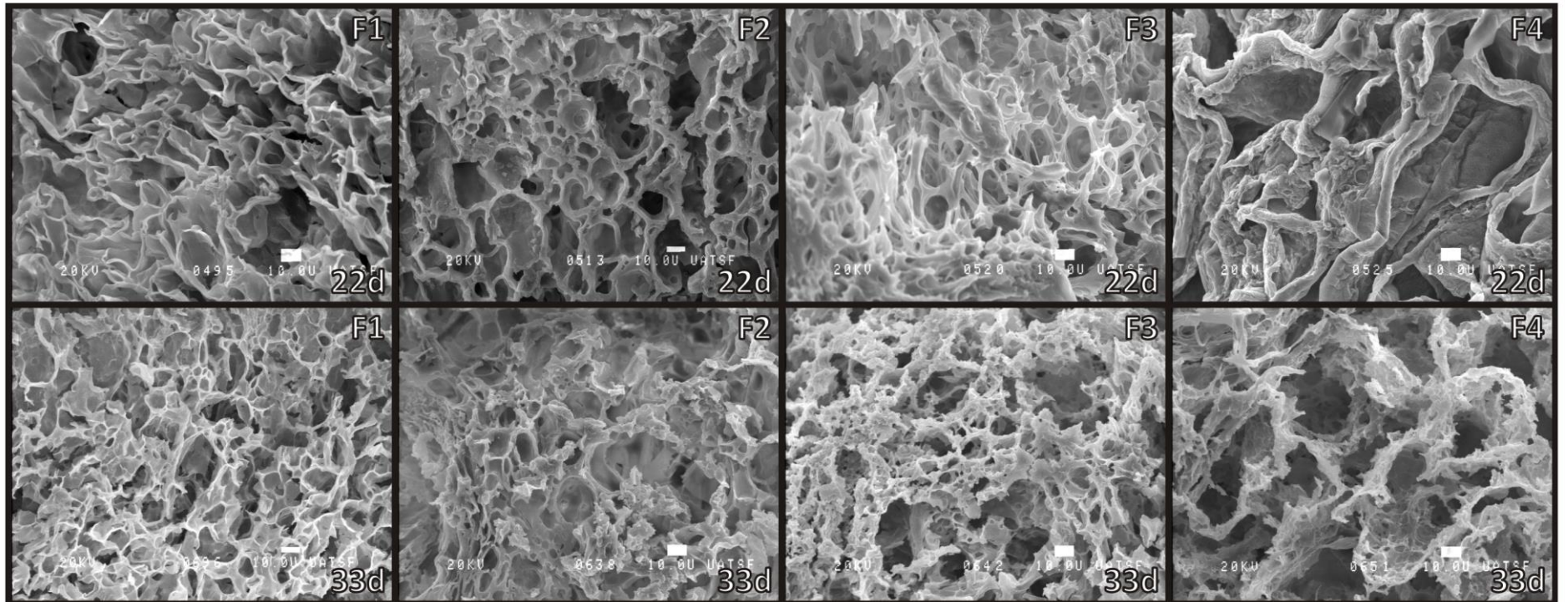


Figura 4.25. Fotomicrografías SEM de implantes F1-4 formados in situ de 22 y 33 días de degradación in vitro. Las fotomicrografías están tomadas a 600X, la barra indica 10 μm .

La evaluación por SEM de los implantes estudiados muestra como el proceso de inversión de fases afecta la morfología de los implantes y su evolución ayuda a entender los procesos de degradación/erosión involucrados. La estructura de tipo centro/coraza, más evidente en los implantes F1 y F2 que en F3, estaría indicando una degradación del tipo autocatalizada en el interior de la matriz. Los implantes preparados a partir de una mezcla DMSO:TR, sin una diferenciación centro/coraza, con estructuras abiertas, pliegues y huecos, se degradan de manera más homogénea.

Diversos autores han reportado que al aumentar el tamaño del dispositivo, disminuye la difusión de los productos de degradación hacia fuera de la matriz, aumentando la autocatálisis y, acelerando así la degradación/erosión del polímero en su conjunto (Dunne y col., 2000; Grizzi y col., 1995; Siepmann y col., 2005; Witt y Kissel, 2001). Sin embargo, en base a nuestros resultados, podemos decir que estas conclusiones son válidas para matrices compactas o cerradas, con una capa superficial que separe el interior del exterior (en nuestros experimentos, este es el caso claro de los implantes F1 y F2). En general, en los estudios que se realizan *in vitro*, los implantes se forman *in situ* colocando directamente la solución polimérica en el medio. Estos implantes presentan estructuras más cerradas, debido a que el contacto directo con gran cantidad de medio acuoso lleva rápidamente a la formación de una capa externa. En nuestro caso, los implantes se formaron dentro de bolsas de diálisis, donde en el contacto de la solución polimérica con el medio acuoso interviene también la membrana de diálisis. Por lo que estos implantes se forman de una manera más regulada, donde el intercambio solvente/no-solvente no es tan inmediato. Esto permite que soluciones poliméricas conteniendo mezcla de solventes, donde el proceso de inversión de fases es más lento (DMSO:TR<<DMSO:2P), mantengan por más tiempo un estado fluido. En el caso de F3, esto da lugar a la formación de algunos pliegues en la superficie, y a una estructura no tan marcada centro/coraza, pero que no se pudo relacionar con cambios en la erosión de la matriz. Mientras que F4 presenta una matriz abierta, con pliegues y regiones huecas, que probablemente permiten un mejor flujo y escape de los productos de degradación, degradándose de forma homogénea. Que estas matrices presenten perfiles de degradación (PM en función de t) y erosión (MR en función de t) más pronunciados, probablemente se deba a un efecto inicial de la TR, que en medio acuoso se degrada a glicerol y ácido acético. Este ácido acético, entrampado en la matriz, podría estar catalizando de manera preferencial la hidrólisis de las cadenas poliméricas más largas (ver desplazamiento del modo principal en **Figura 4.16 d**). Esta hidrólisis diferencial culmina en DPM unimodales al final del ensayo, debido a la homogeneización de la población de cadenas poliméricas. De este modo, el pool de cadenas disponibles para la

hidrólisis es de menor peso molecular, acelerando así la formación de oligómeros capaces de desprenderse de la matriz, lo que termina resultando en una cinética de erosión mayor.

4.2.3 Conclusiones

Se ha confirmado entonces que la erosión se ajusta bien a una cinética de pseudo primer orden en los sistemas estudiados. Que la degradación de las cadenas poliméricas ocurre por sus extremos los primeros días, y luego de manera aleatoria. Que existe una preferencia del de agua por hidrolizar primero enlaces que contengan AG que AL, probablemente debido a que la lactida repele (debido a su menor hidrofiliidad) y dificulta el ingreso (debido al impedimento estérico de su grupo metilo) de estas moléculas. Que los implantes con mezcla de solventes presentaron caídas más pronunciadas de M_w y M_n , respecto de los implantes formados a partir de DMSO puro, pero que sólo F4 presentó una constante cinética de erosión mayor. Esto probablemente se deba a un efecto inicial de la TR, cuyo producto de degradación, ácido acético, cataliza la hidrólisis de las cadenas poliméricas más largas. Así, las cadenas disponibles para la hidrólisis son de menor peso molecular, acelerando la formación de oligómeros capaces de desprenderse de la matriz y provocar la erosión. Además, el uso de TR como co-solvente para la formación *in situ* de implantes en nuestro sistema, permite la obtención de matrices abiertas, con pliegues y regiones huecas, que resultan en la ausencia o disminución del efecto autocatalítico, presente en los otros implantes.

4.3 Caracterización de los implantes formados *in situ* y de su degradación *in vivo*

4.3.1 Introducción y objetivos

La degradación de PLGA en entornos biológicos comúnmente procede a mayor velocidad que *in vitro*. En la bibliografía, se encuentran reportadas velocidades de degradación 2-2,5 veces más rápidas *in vivo* versus *in vitro* (Flandroy y col., 1997; Menei y col., 1993; Spenlehauer y col., 1989; Tracy y col., 1999). Esto es debido a que la degradabilidad del polímero se ve afectada no sólo por las propiedades intrínsecas del material (peso molecular, relación de copolímero, cristalinidad, forma, entre otras), sino también por su medio externo, tal como el pH, la temperatura, y la presencia o concentración de compuestos biológicos. Dentro de los factores biológicos que afectan la biodegradación del PLGA, podemos enumerar: i) lípidos u otros compuestos que actúan como plastificantes, favoreciendo la ganancia de agua dentro de la matriz polimérica; ii) respuesta inflamatoria del cuerpo, que resulta en la acumulación de células como macrófagos alrededor del cuerpo extraño; iii) radicales libres, productos ácidos o enzimas, producidas por estas células durante la respuesta inflamatoria, que catalizan la hidrólisis de las uniones éster de la estructura polimérica; iv) temperatura local y cambios de pH más pronunciados producto de la inflamación, a causa del transporte restringido de oligómeros ácidos, otros ácidos y radicales libres fuera de la región; y v) forma y estructura dependiente de la densidad del tejido (una densidad limitada permite que el implante se expanda, debido a que la presión que ejercen los tejidos sobre el sitio de inyección es baja) (Ali y col., 1994; Menei y col., 1993; Patel y col., 2010; Tracy y col., 1999). Uno de los sitios más comunes de colocación de implantes es en la capa subcutánea. Ésta es la capa más profunda de la piel debajo de la epidermis y la dermis (Xu y col., 2008). La implantación subcutánea se refiere al método por el que los medicamentos se implantan en el tejido adiposo y conectivo debajo de la capa dérmica. Por lo tanto, un implante es rodeado generalmente por tejidos relacionados con el sitio de implantación. Diferentes fenómenos se producen en comparación con lo que ocurre en ensayos *in vitro*, donde se coloca un implante directamente en un medio de incubación.

En esta sección se presenta una contribución sobre algunos de los ítems estudiados en la sección anterior para la degradación *in vitro* de PLGA, pero en este caso en el estudio de implantes formados *in vivo*. Para este fin, se evaluó la degradación de implantes formados *in situ* en el tejido subcutáneo de ratas Wistar. Se evaluó como afectan los factores biológicos antes mencionados en: el contenido residual de solvente en la matriz, la pérdida de masa $MR(t)$ (%), la fracción de

agua F_{H2O} , la DPM, el M_w y el M_n , y en la morfología de los implantes y su evolución durante la degradación, y se realizó una comparación *in vitro-in vivo* de los resultados.

4.3.2 Resultados y discusión

En primer lugar, se determinó el remanente de solvente en los implantes y se calculó el solvente residual según la **Ecuación 3.3** de la **Sección 3.2.9 de Materiales y Métodos**. En la **Figura 4.26** se presenta el *Solvente residual (%)* de los implantes F1-4 de tres días post inyección.

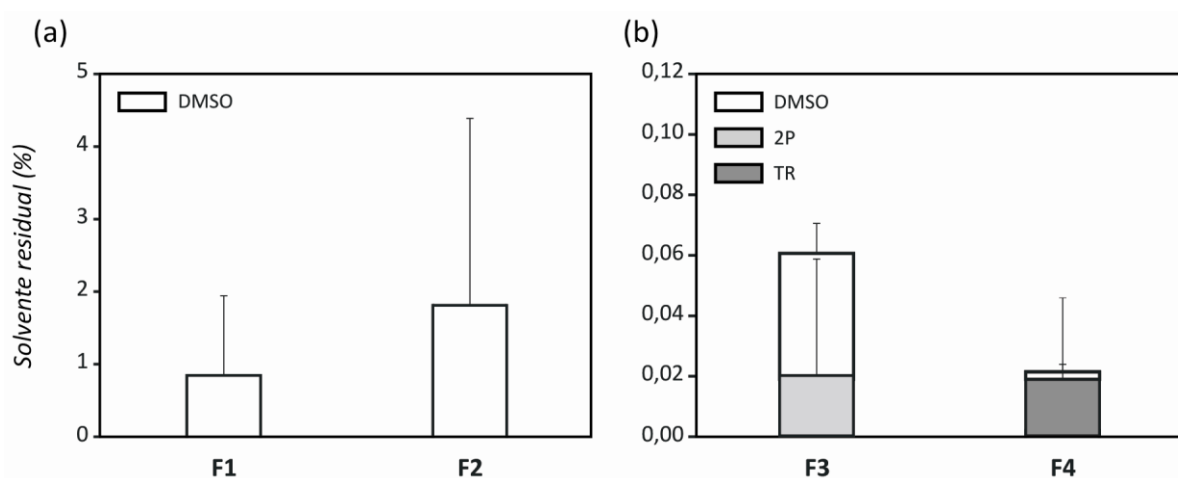


Figura 4.26. Solvente residual (%) de los implantes formados *in vivo* a) F1 y F2, y b) F3 y F4, de tres días post-inyección.

El contenido de solvente en los implantes F1 y F2 fue del 1 y 2% a los tres días post inyección (**Figura 4.26 a**), mientras que en los implantes F3 y F4 fue del orden de la centésima (**Figura 4.26 b**). Comparando estos resultados con los obtenidos para los implantes *in vitro* (ver **Figura 4.12**), se deduce que el proceso de inversión de fases *in vivo* culmina en menor tiempo. En los implantes de 8 días de degradación *in vivo*, no se detectó solvente residual por la técnica analítica utilizada.

En la **Figura 4.27** se presentan los perfiles de erosión de los implantes a lo largo de la degradación *in vivo*. Se observa que a los 22 días post inyección, la masa remanente de los implantes fue prácticamente nula (cerca al 3% del PLGA inicial inyectado).

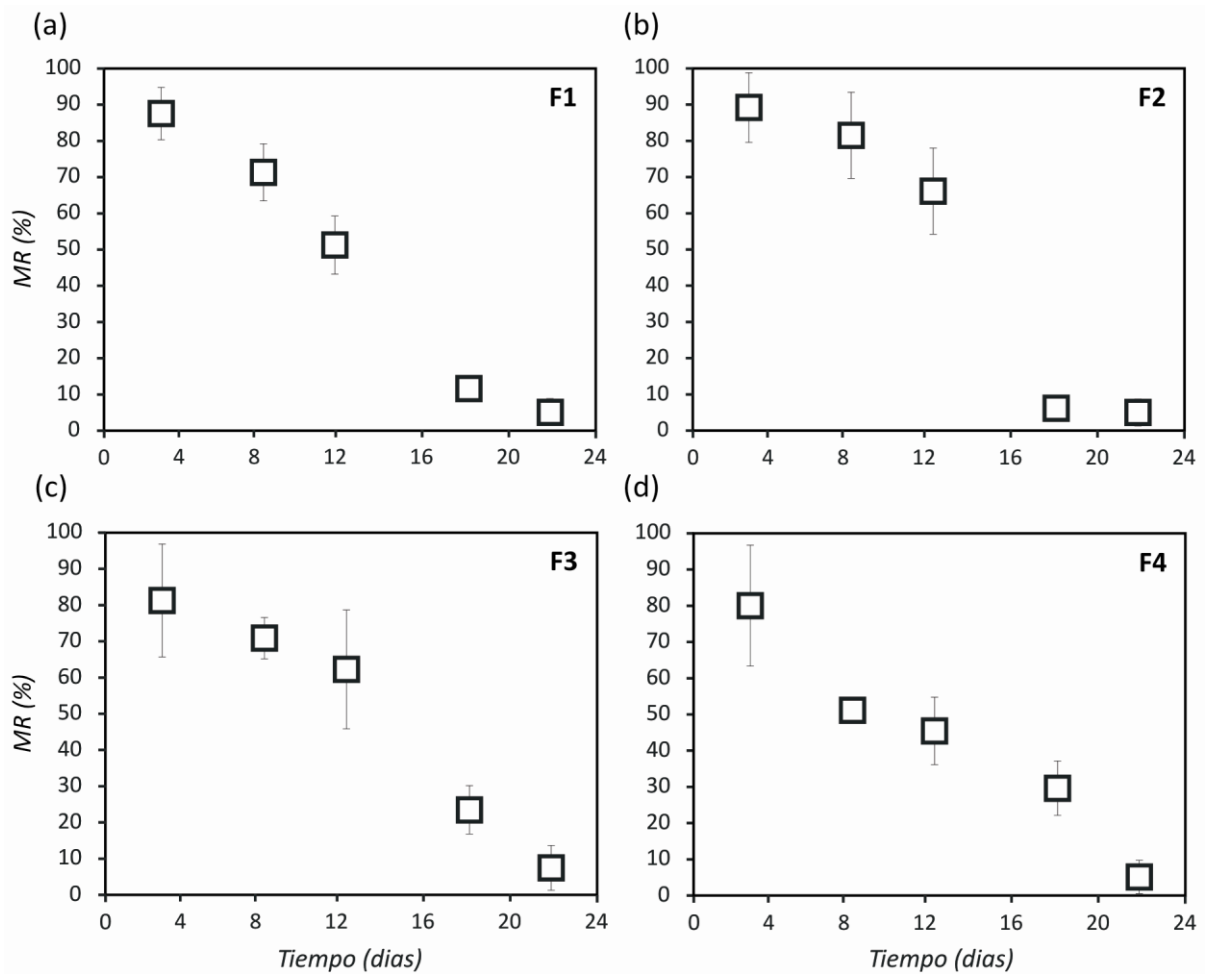


Figura 4.27. Evolución de la Masa remanente (MR) de los implantes formados *in situ* a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación *in vivo*.

La fracción de agua (F_{H_2O}) en los implantes degradados *in vivo* no presentó ninguna tendencia clara durante todo el ensayo. En todos los casos, F_{H_2O} varió entre 0,66 y 0,80, como se muestra en el diagrama de cajas de la **Figura 4.28**.

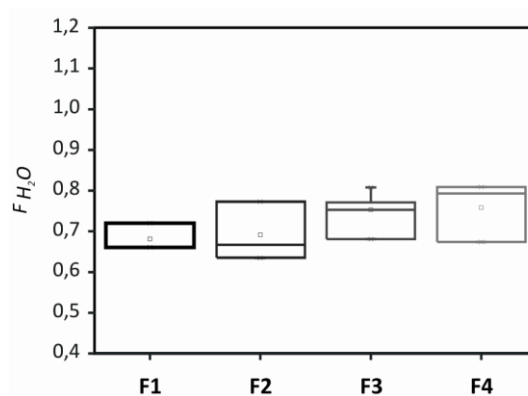


Figura 4.28. Fracción de agua F_{H_2O} de los implantes formados *in situ* F1-4 degradados *in vivo*.

Comparado con los implantes *in vitro*, que comienzan con un fracción de agua de 0,75 (0,6 para F4) y finalizan el ensayo con una fracción de agua de 0,93 (equivalente a una masa de agua 17 veces mayor que la masa de implante seco), *in vivo*, el hinchamiento de PLGA se encuentra restringido por los tejidos circundantes y la tensión mecánica debido a los movimientos del animal (siendo sólo tres veces mayor al implante seco). Resultados similares fueron reportados previamente por otros autores (Kunou y col., 1995; Mäder y col., 1997).

La **Figura 4.29** presenta la evolución de las DPM normalizadas a la masa remanente de los implantes F1-4 degradados *in vivo*.

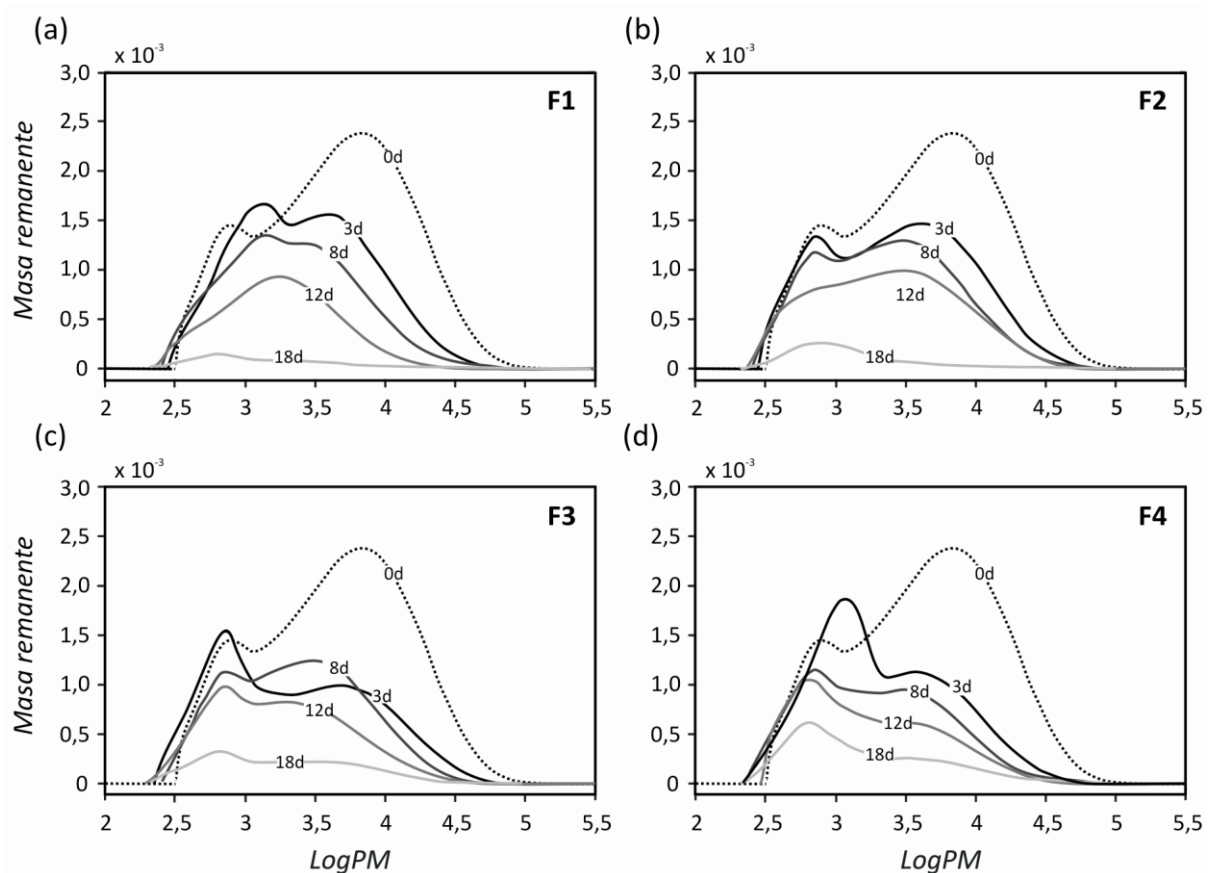


Figura 4.29. Evolución de la distribución de peso molecular normalizadas a la masa remanente de los implantes formados *in situ* a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación *in vivo*. La línea de puntos (0d) corresponde al PLGA de partida.

Al igual que las curvas presentadas para los implantes *in vitro*, se puede apreciar el decrecimiento de las áreas bajo la curva a medida que el proceso erosional avanza. Durante los primeros días de degradación, se produce en los cuatro sistemas estudiados una pérdida en la fracción másica del modo de alto peso molecular y un incremento relativo en el modo de bajo peso molecular. A los

18 días post inyección, los cuatro implantes F1-4 poseen una fracción másica mayor de polímero de bajo peso molecular. A diferencia de lo observado *in vitro*, donde F4 presentó una unificación del modo de alto y bajo peso molecular, *in vivo* el perfil cromatográfico fue similar al resto de los implantes estudiados, indicando la presencia de otros mecanismos involucrados en la degradación de dicho implante. Las DPM de los implantes degradados *in vivo* presentaron mayor variabilidad, probablemente debido al origen biológico de las muestras. Por esta razón se decidió no realizar un análisis exhaustivo de los picos ($\log PM_p$), para no caer en errores de interpretación.

A partir del análisis de las DPM se determinaron el M_w y el M_n para los sistemas estudiados. La **Figura 4.30** presenta la variación de M_w , M_n e I_p para F1-4 durante la degradación *in vivo*.

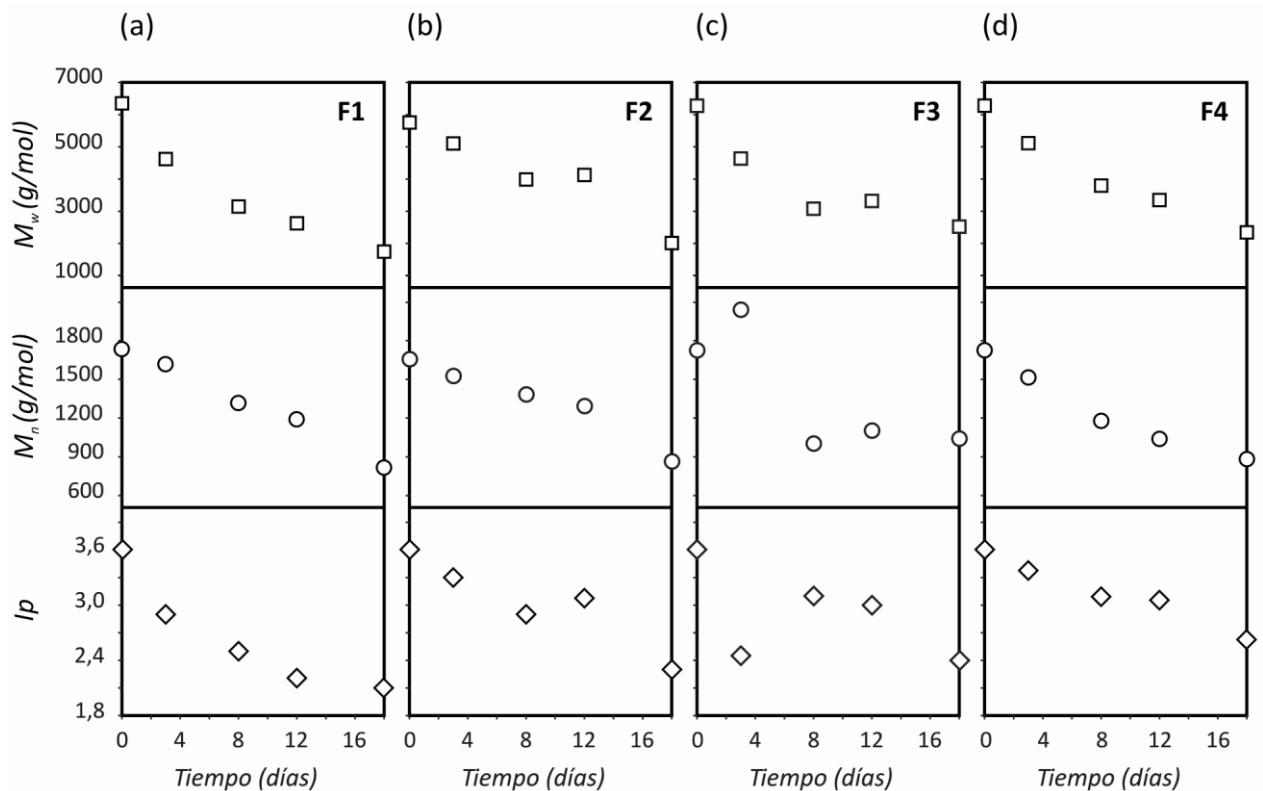


Figura 4.30. Evolución de los pesos moleculares promedio en peso M_w (\square) y en número M_n (\circ), y del índice de polidispersidad (I_p) (\diamond) de los implantes formados *in situ* a) F1, b) F2, c) F3 y d) F4 durante la degradación *in vivo*.

Se observa que los tres perfiles de los implantes estudiados caen durante todo el ensayo. Los implantes alcanzan valores cercanos a 2000 y 900 g/mol para M_w y M_n , respectivamente. Estos resultados, perfiles de peso molecular sin plateau y valores de peso molecular al final del ensayo por debajo de los obtenidos *in vitro*, probablemente sean causa de una o ambas de las siguientes razones:

i) Oligómeros de bajo peso molecular que en el sistema *in vitro* son capaces de difundir y continuar con la degradación fuera de la matriz polimérica, *in vivo* se encuentran presentes en el implante dado que su difusión está restringida. Esta restricción está dada por un menor contenido de agua en los implantes, y por la presencia de material biológico recubriendo los implantes (células fibrosas y células del sistema inmune).

ii) *In vivo*, se encuentran presentes enzimas, radicales libres, lípidos, ácidos, macrófagos y otras células del sistema inmune que podrían estar involucrados en el proceso degradativo del PLGA (Ali y col., 1994; Menei y col., 1993; Patel y col., 2010; Tracy y col., 1999), generando un polímero de menor peso molecular al que se obtiene *in vitro*.

Como se comentó anteriormente para los implantes *in vitro*, que el *Ip* de los implantes degradados *in vivo* disminuya en el tiempo es un indicador de que las cadenas poliméricas de PLGA se hidrolizan preferentemente de manera aleatoria, independientemente del sistema estudiado.

Para finalizar el estudio de la degradación *in vivo* de los cuatro implantes estudiados en esta tesis, se analizó la morfología de los implantes formados *in situ* tras la inyección subcutánea de las formulaciones F1-4 en ratas Wistar. La **Figura 4.31** presenta los implantes formados *in vivo* a partir de la formulación F2, cuyo aspecto fue similar al de F1 y F3, y de la formulación F4.

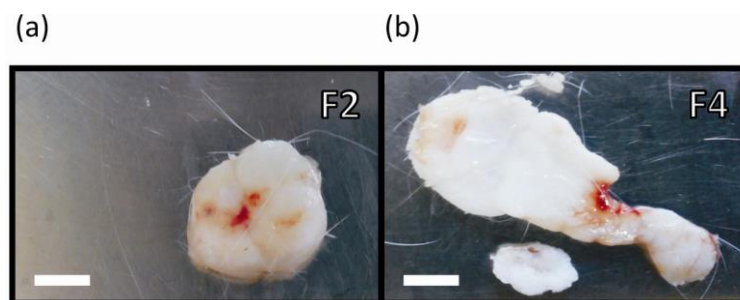


Figura 4.31. Fotos de implantes formados *in situ* por inyección subcutánea de a) F2 y b) F4, a los 8 días de degradación *in vivo*. La barra indica 0,5 cm

Los implantes F2 (**Figura 4.31 a**) presentaron una estructura similar a la de un botón, como resultado de la presión ejercida sobre cada formulación durante el proceso de precipitación del polímero. En cambio, F4 presentó una estructura irregular, de menor espesor y extendida (ocupando una mayor área) (**Figura 4.31 b**). Este resultado probablemente se deba al proceso de precipitación más lento que ocurre en los implantes conteniendo TR.

En la **Figura 4.32**, se observan secciones transversales de los implantes formados *in vivo* a tres días de degradación. A fin de comparar, se presentan SEM de los implantes F2 (cuya morfología fue semejante a los implantes F1 y F3) y de los implantes F4.

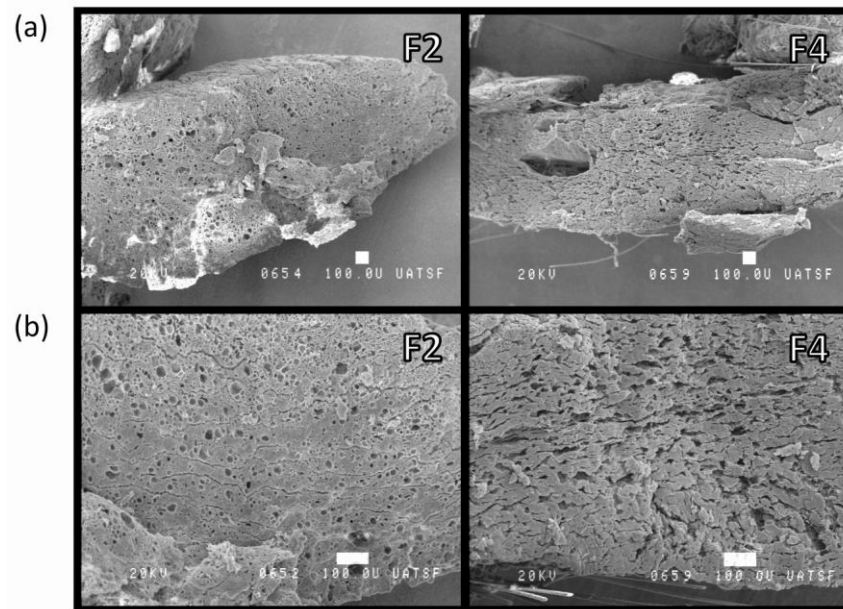


Figura 4.32. Fotomicrografías SEM de implantes F2 y F4 formados *in situ* a los 3 días de degradación *in vivo*. Aumento: a) 40X y b) 100X, la barra indica 100 μm .

En las fotomicrografías sacadas a 40X (**Figura 4.32 a**) se puede observar que el espesor de los implantes F4 es menor comparado con el de F2. A 100X (**Figura 4.32 b**) se observa que, mientras que el implante F2 fue poroso, F4 presenta una estructura con pliegues y regiones huecas. Las estructuras de ambos implantes fueron más densas y con canales, comparadas con los implantes *in vitro*. La deformación plástica observada en los implantes, y la mayor densidad de las matrices están en concordancia con el poco agua que estos dispositivos captan *in vivo*.

La **Figura 4.33** presenta fotomicrografías a mayor aumento de los implantes de formación *in situ* F1-4 degradados *in vivo*.

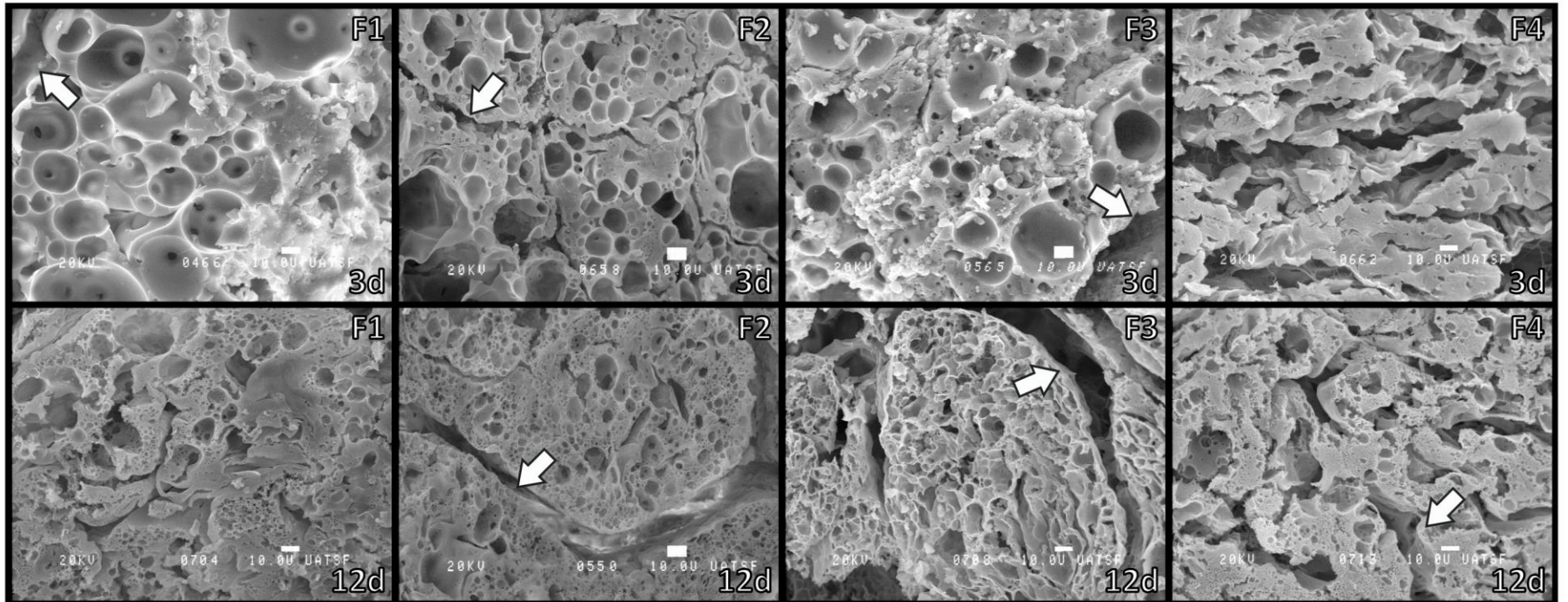


Figura 4.33. Fotomicrografías SEM de los implantes F1-4 formados in situ en ratas Wistar de 3 y 12 días de degradación in vivo. Las flechas indican los canales. Aumento: 600X. La barra indica 10 μ m

A los 3 días post inyección, los implantes F1-3 presentaron una matriz porosa, con poros esféricos de diversos tamaños y con canales, mientras que F4 presenta, de manera similar a los implantes *in vitro*, muy pocos poros no esféricos, pliegues y regiones abiertas. A diferencia de los otros implantes, F2 presenta a los 3 días pequeños poros en su estructura. Esto probablemente debido a que, al ser la solución polimérica menos viscosa, el solvente haya difundido más rápidamente fuera del implante, generando estos pequeños poros. A los 12 días post inyección, se presentan en los cuatro implantes estudiados una serie de cambios morfológicos que se enumeran a continuación: i) aparecen gran cantidad de pequeños poros (en F3 más amorfos y menor cantidad); ii) disminuye el tamaño de los poros existentes, probablemente debido a la presión ejercida en el espacio subcutáneo sobre el implante (la Tg de los implantes degradados es menor, perdiendo resistencia mecánica); iii) aumenta el área ocupada por canales.

A fin de comparar los cambios morfológicos asociados a la degradación *in vitro* versus la degradación *in vivo* se llevó a cabo el análisis de las imágenes SEM de los implantes F2. Las fotomicrografías SEM fueron analizadas con un programa de procesamiento de imágenes. Los resultados obtenidos del análisis morfométrico se detallan en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Análisis morfométrico de los implantes F2 formados *in situ* degradados *in vitro* e *in vivo*

	<i>In vitro</i>			<i>In vivo</i>	
	3d	12d	22d	3d	12d
Área de poros (μm^2)^a	64,1 (15,7-167,4)*	141,5 (46,3-361,4)*	140,9 (45,3-358,8)*	6,9 (2,1-34,5)♦	2,4 (1,1-6,1)†
Diámetro de poros (μm)^a	9,0 (4,5-14,6)*	13,4 (7,7-21,5)*	--	3,0 (1,6-6,6)♦	1,7 (1,2-2,8)†
Densidad de poros ($\cdot 10^3$ poros/mm^2)^b	20,2 (18,6)*	14,4 (5,9)*	5,5 (1,7)*	5,6 (2,4)*	40,5 (21,2)*
Área porosa relativa% (área ocupada por poros/área total $\cdot 100$)^b	86,2 (15,1)**	70,4 (8,0)**	65,5 (6,2)♦	37,9 (5,2)†	31,7 (5,1)†
Área de canales relativa% (área ocupada por canales/área total $\cdot 100$)^b	--	--	--	12,5 (2,6)*	21,9 (7,4)*

^a Resultados expresados como *mediana (RI)*; ^b Resultados expresados como *media (DE)*.

Análisis estadístico: para distribuciones normales, se utilizó el test t de Student ó ANOVA y posterior test de Bonferroni; para distribuciones que no presentaron una distribución normal se utilizó el test de Kruskal Wallis y posterior test de Dunn. Se consideró diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$. Símbolos iguales indican $p > 0,05$, símbolos distintos indican $p < 0,05$.

El tamaño de los poros de los implantes *in vitro*, medido como *Área de poros* y *Diámetro de poros*, creció significativamente de los 3 a los 12 días de degradación. A los 22 días, los poros mantuvieron su tamaño pero adquirieron una estructura no esférica. Por lo tanto, en ese caso se

midió el área y no el diámetro de los poros. La cuantificación a los 33 días de degradación no fue posible debido al alto grado de erosión de la matriz.

Respecto de los implantes formados *in vitro*, el tamaño de los poros de los implantes *in vivo*, medida como *Área de poros* y *Diámetro de poros*, fue significativamente menor, en concordancia con la mayor densidad de estas matrices, y dado el espacio restringido que tenían para precipitar. Ambas mediciones decrecieron significativamente de los 3 a los 12 días post inyección ($p < 0,05$), relacionado con la formación de nuevos pequeños poros. Este fenómeno podría estar asociado a un proceso degradativo más que a un proceso erosional.

Mientras que *in vitro* el *Área de poros* aumentó durante la degradación, éste parámetro decreció *in vivo*. De manera inversa esto se ve reflejado en la *Densidad de poros* (cantidad de poros por unidad de área). Este parámetro decreció *in vitro* debido a un aumento del tamaño de poros existentes, mientras que *in vivo* aumentó a causa de la aparición de un gran número de pequeños poros, siendo este aumento estadísticamente significativo. Los cambios en la densidad de poros no son estadísticamente significativos, debido a la gran dispersión de los datos.

A medida que la degradación avanzó, el *Área porosa relativa%* (área ocupada por poros/área total) disminuyó *in vitro* ($p < 0,05$, día 3 versus día 22), mientras que *in vivo* esta disminución no fue estadísticamente significativa. Esta disminución puede apreciarse en las fotomicrografías (**Figura 4.23** y **Figura 4.24**), donde los poros comienzan a fusionarse y sus estructuras no son fácilmente diferenciables. Por otro lado, el *Área de canales relativa%* en los implantes *in vivo* aumentó del día 3 al día 12 de degradación (pero sin ser esta diferencia estadísticamente significativa).

Los canales de los implantes formados *in vivo* probablemente permitan al medio fisiológico fluir a través de la matriz polimérica, manteniendo el pH y previniendo la acumulación de productos de degradación, que podrían estar ejerciendo un efecto autocatalítico. Esta condición fisiológica fue simulada *in vitro* a través del control riguroso del pH del medio y su reemplazo cada vez que el pH del medio cayó media unidad. Por otra parte, los canales *in vivo* podrían facilitar la degradación al aumentar el área de contacto con los fluidos fisiológicos permitiendo la entrada de enzimas hidrolíticas y células del sistema inmune a toda la matriz.

Los cambios morfológicos observados *in vitro* durante la degradación fueron asociados a un aumento en el tamaño de poros y una disminución en su densidad, mientras que *in vivo* fueron

asociados a la aparición de gran cantidad de nuevos pequeños poros y de un incremento en el área ocupada por canales.

4.3.3 Conclusiones

Los resultados experimentales muestran claramente que una correlación *in vitro-in vivo* no es sencilla. A diferencia de los implantes degradados *in vitro* en un medio fosfato mantenido a pH fisiológico, los implantes *in vivo* presentaron: i) contenido de solvente residual casi nulo a los tres días, permitiendo su estudio morfológico por SEM; ii) hinchamiento restringido y sin cambios durante el ensayo; iii) perfiles de erosión que culminaron en 22 días, siendo la vida media *in vivo* de los implantes ~ 2,5 veces menor que *in vitro*; iv) ausencia de comportamiento cromatográfico diferencial en implantes F4; v) perfiles de peso molecular sin plateau; y vi) menores valores de peso molecular alcanzados. Las características morfológicas de los implantes *in vivo* dan cuenta de los resultados disímiles encontrados con respecto de la degradación *in vitro*. El hinchamiento restringido a causa de la presión ejercida por los tejidos circundantes y la tensión mecánica debido a los movimientos del animal, dieron lugar a la formación de implantes más densos y con cierta deformación. Si bien la presencia de canales podría evitar un efecto autocatalítico único en el centro del implante, las matrices más compactas podrían dificultar la salida de los productos de degradación ácidos, pudiendo existir pequeños focos autocatalíticos a lo largo de la matriz. Por otro lado, estos canales aumentan el contacto de la matriz con fluidos fisiológicos, que a su vez facilitan el acceso de enzimas hidrolíticas y células del sistema inmune al implante entero. Esto explicaría la más rápida erosión/degradación de los implantes *in vivo*. Perfiles que no presentan diferencias debido a cambios a nivel de la hidrofobicidad del solvente (implante F4), excepto en su morfología. Estos resultados destacan la importancia de los mecanismos biológicos implicados en la degradación de implantes de PLGA.

4.4 Estudio de la degradación heterogénea de implantes a través de microesferas

4.4.1 Introducción y objetivos

Como se comentó en la **Introducción General**, generalmente se acepta que las matrices de PLGA sufren erosión de matriz o *bulk* en medio acuoso (Li y col., 1990; Tamada y Langer, 1993), a pesar de que algunos autores han reportado que el PLGA también es capaz de erosionarse por superficie (Burkersroda y col., 2002; Yoshioka y col., 2008). Además, la degradación de matriz del PLGA puede ser homogénea o heterogénea, dependiendo del tamaño del dispositivo estudiado.

Diversos autores han reportado que la degradación heterogénea afecta en mayor medida a matrices de mayor tamaño, y justifican estos resultados con el modelo de difusión-reacción (Dunne y col., 2000; Grizzi y col., 1995). Un espécimen más grande se degrada más rápido que uno más pequeño debido a que los productos de degradación encuentran más dificultad para difundir hacia el exterior de la matriz, produciéndose un efecto autocatalítico mayor. Por lo que la difusión de los oligómeros fuera del polímero juega un rol clave en el control de la velocidad de degradación (Dunne y col., 2000; Han y Pan, 2011). Estudios experimentales han mostrado que el tamaño crítico de la matriz polimérica que permite una degradación sin efecto autocatalítico se encuentra en el rango de 10-50 μm (Chen y col., 2011).

Las matrices de los implantes F1 y F2 presentaron una aparente degradación heterogénea, dado que los cambios morfológicos durante el tiempo de incubación estuvieron asociados a un centro degradado y una capa externa que conservó durante más tiempo su estructura.

Algunos autores han asociado la degradación heterogénea del PLGA con perfiles bimodales de DPM (Grizzi y col., 1995; Li y col., 1990; Zolnik y Burgess, 2007), donde los modos de alto y de bajo peso molecular se corresponderían con las cadenas poliméricas que se encontraban en la superficie y en el centro de la matriz, respectivamente. En nuestro caso, el PLGA de partida posee una DPM bimodal, por lo que resulta difícil asociar cada modo a una región del implante determinada. Otros autores no han encontrado esta bimodalidad y en su lugar han encontrado en el polímero dos Tg (Park, 1994; Park, 1995; Vey y col., 2008). Como se dijo antes, esta temperatura involucra el paso de un estado rígido vidrioso a un estado móvil gomoso, vinculado al volumen libre asociado al final de las cadenas poliméricas. Cuando el peso molecular decrece, están presentes mayor cantidad de terminales poliméricas, por lo que se genera mayor volumen libre. Las cadenas poliméricas tienen, por lo tanto, más espacio para moverse y el estado gomoso se alcanza antes, esto es, a una temperatura más baja (Pethrick, 2002; Vey y col., 2008). La Tg más

baja se correspondería a un pool de cadenas poliméricas más degradadas (en el centro de la matriz), y la otra Tg se correspondería al polímero de la capa superficial, menos degradado.

En esta parte de la tesis, se propuso investigar el proceso de degradación de uno de los implantes de PLGA que venimos estudiando (F1, a partir de ahora Imp-PBS), como modelo de degradación de una matriz que sufre degradación heterogénea, en un medio fosfato salino regulado a pH fisiológico (pH 7,4, 37 °C). Para un mejor entendimiento del fenómeno de degradación que ocurre en las dos regiones morfológicas encontradas de este dispositivo polimérico (centro y superficie), se plantearon dos sistemas límites. Estos sistemas, consistieron en microesferas de PLGA (fabricadas a partir del mismo polímero de partida) sin problemas difusionales (de un tamaño menor a 10 μm), para garantizar una degradación *bulk* homogénea en los mismos. Las microesferas, se incubaron en dos medios bien diferenciados, que se aproximan al entorno en el que se degrada el centro y la superficie del implante:

- Un medio acuoso a pH no regulado que acumule productos de degradación de las microesferas, disminuyendo el pH (condiciones de autocatálisis), al igual que ocurre en el centro del implante
- Un medio mantenido a pH fisiológico, impidiendo la acidificación (condiciones no catalíticas), al igual que ocurre en la pared del implante.

En todos los experimentos, las DPM, el M_w y la masa remanente de los sistemas poliméricos se utilizaron como medida de los procesos de degradación/erosión a lo largo del tiempo, y sirvieron para proponer un modelo simple del mecanismo de degradación.

4.4.2 Resultados y discusión

La **Figura 4.34** muestra la fotomicrografía SEM de las microesferas preparadas por el método descrito en la **Sección 3.2.18** de **Materiales y Métodos**.

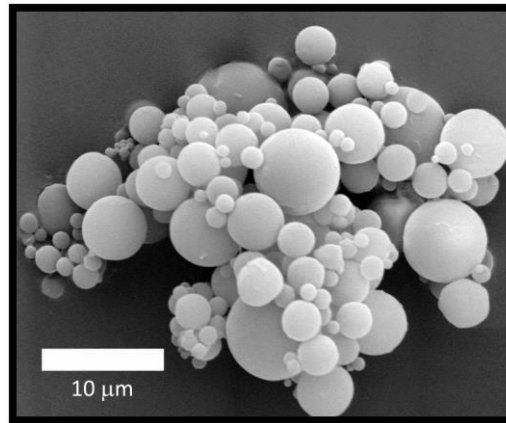


Figura 4.34. Fotomicrografía SEM de microesferas de PLGA antes de la degradación.

Las microesferas presentaron una superficie suave y regular, y un diámetro de $3,0 (0,7) \mu\text{m}$ (distribución normal, $p > 0,05$).

La ganancia de agua y las propiedades de degradación pueden ser modificadas con la concentración y tipo de sales involucradas en los estudios de degradación de PLGA o PLA (Dong y col., 2006; Gasparini y col., 2010; Mobedi y col., 2006). En los ensayos realizados, el aspecto visual de las microesferas en los dos medios de degradación (PBS y SS) fue diferente (**Figura 4.35**).

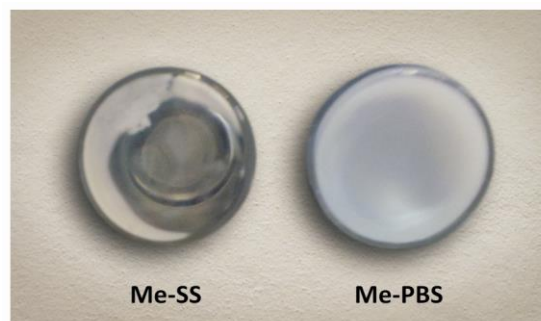


Figura 4.35. Fotos del fondo de los frascos donde se encontraban las microesferas degradadas en SS y PBS a los 6 días de incubación *in vitro*.

Mientras que las microesferas degradadas en solución salina (Me-SS) presentaron una apariencia blancuzca y opaca, aquellas degradadas en solución buffer fosfato salina (Me-PBS) fueron translúcidas, probablemente como consecuencia de su mayor capacidad de ganar agua (el agua actúa como plastificante, decreciendo la Tg del polímero y clarificando la masa polimérica (Blasi y col., 2005)).

De igual manera a lo descrito en la **Sección 4.2** de este capítulo, el pH del medio se monitoreó en los tres sistemas estudiados (**Figura 4.36**). Además, en Imp-PBS y Me-PBS, se mantuvo de manera estricta en 7,4 (pH fisiológico), realizando recambios de medio cada vez que el pH del mismo bajó media unidad. Este monitoreo riguroso del pH del medio de degradación, se realizó con el objeto de obtener información acerca de la liberación de productos ácidos de las matrices estudiadas.

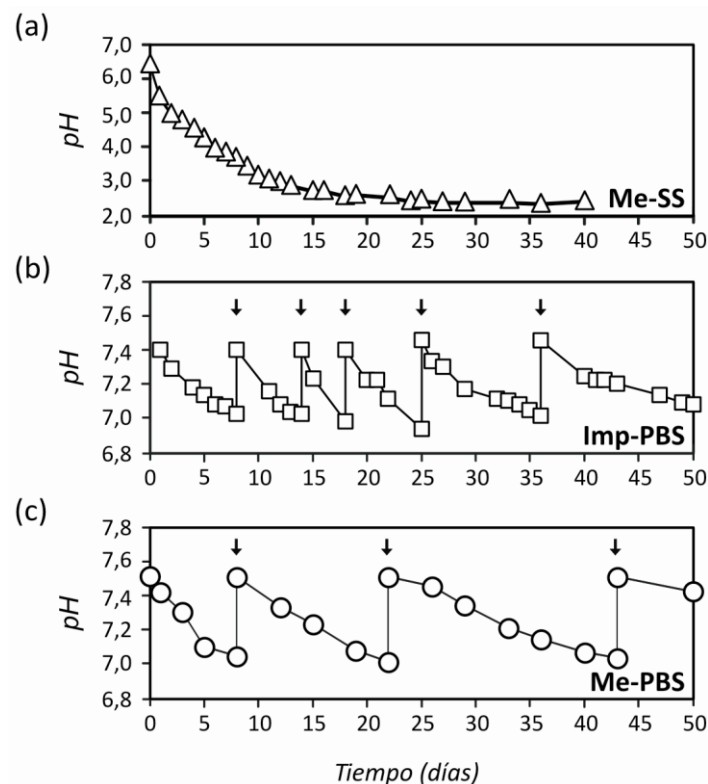


Figura 4.36. Variación del pH del medio de incubación durante la degradación in vitro de los tres sistemas investigados a) Me-SS, b) Imp-PBS, c) Me-PBS. Las flechas indican recambios de medio.

Como se observa en la **Figura 4.36 a**, durante los primeros 15 días de degradación, el pH del medio de las Me-SS disminuyó a 2,7. Luego, el pH sufrió una caída adicional gradual alcanzando un valor de 2,4 a los 25 días, que fue mantenido hasta finalizar el ensayo. Este pH final de 2,4 probablemente se deba a la regulación debido al AL y AG que tamponaron el medio impidiendo una disminución mayor de éste parámetro. Para Imp-PBS y Me-PBS, la variación del pH a lo largo del tiempo y los cambios por medio fresco se muestran en la **Figura 4.36 b** y **Figura 4.36 c**, respectivamente. Para mantener el pH en el rango 7,0 – 7,4, Me-PBS necesitó sólo tres recambios de medio de degradación, a los 8, 22 y 43 días. Mientras que a Imp-PBS fue necesario hacerle 5 recambios de medio (a los 8, 14, 18, 25 y 36 días), siendo más frecuentes entre el día 14 y 18.

En la **Figura 4.37** se muestran las fotomicrografías de los implantes tomadas a los 3, 12, 22 y 33 días de degradación, conteniendo en un solo panel lo presentado en la **Sección 4.2**.

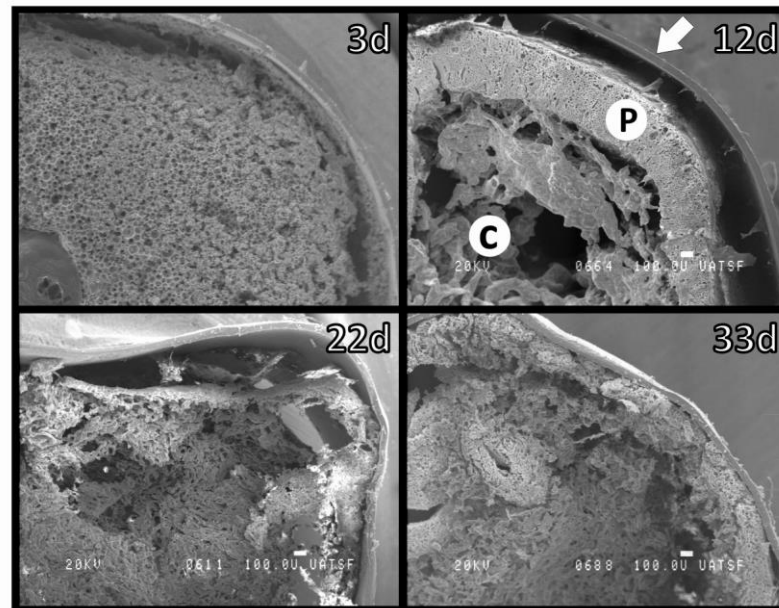


Figura 4.37. Fotomicrografías SEM de Imp-PBS formados *in situ* a los 3, 12, 22 y 33 días de incubación. Las áreas indicadas por C y P corresponden al centro y a la pared del implante, respectivamente. La flecha señala a la bolsa de diálisis. Las fotomicrografías están tomadas a 40X, la barra indica 100 μm .

Como se comentó anteriormente, los implantes presentan: i) a los 3 días de incubación, una estructura porosa, con poros uniformemente distribuidos a lo largo de la matriz, ii) a los 12 días, un centro colapsado con paredes que conservaban su estructura, iii) a los 22 días, paredes que han perdido su integridad. Este rompimiento de la pared podría explicar la más rápida caída de pH observada entre los días 14 y 18 en Imp-PBS. Al romperse la pared de los implantes, se produce un escape de productos ácidos solubles que estaban atrapados dentro de la matriz, decreciendo rápidamente el pH del medio. A los 33 días de incubación, los implantes continúan su proceso erosional, presentando una estructura aún más dañada.

Los perfiles de masa remanente, $MR(t)$ (%), de los tres sistemas estudiados se presentan en la **Figura 4.38**.

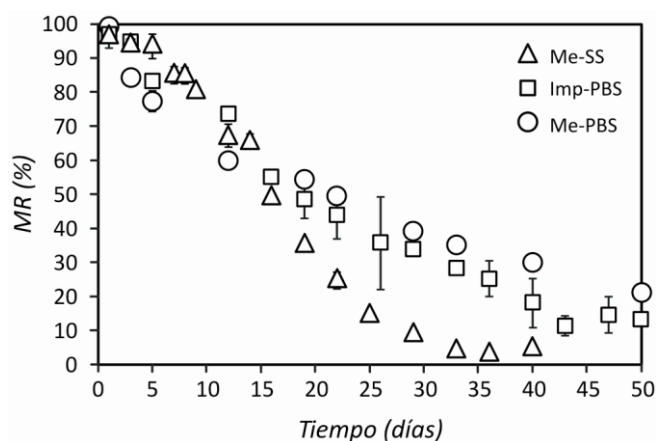


Figura 4.38. Evolución de la Masa remanente (MR) durante la degradación in vitro de los tres sistemas investigados.

Durante los primeros cinco días de degradación, Me-SS no presentó cambios en MR (fase *lag*). A partir del séptimo día, la masa remanente de microesferas decreció significativamente, y luego del día 40 de degradación, sólo el 4% de masa inicial se detectó en Me-SS. Este perfil de erosión, que tiene una pérdida de masa despreciable en el primer período seguido por una reducción rápida de la masa, es típica de polímeros que sufren erosión *bulk* (Göpferich, 1997b).

Imp-PBS y Me-PBS presentaron una reducción de la masa desde el primer día, quedando sólo el 15 y el 20% de la masa inicial a los 50 días de incubación, respectivamente. La ausencia de fase *lag* probablemente se deba a la liberación de oligómeros solubles cuando el polímero se puso en contacto con el medio PBS. En el caso de Imp-PBS, como se dijo en la **Sección 4.2**, los oligómeros disueltos en el solvente difundirían fuera de la solución polimérica durante el proceso de inversión de fases. En cambio, los oligómeros solubles atrapados en Me-PBS durante el proceso de síntesis de las microesferas podrían liberarse fácilmente como consecuencia de la falta de problemas difusionales de estos pequeños dispositivos. A diferencia de las microesferas degradadas en PBS (Me-PBS), creemos que la pobre ganancia de agua de las Me-SS podría llevar a estas microesferas a una liberación más lenta de estos oligómeros de la matriz polimérica, justificando la fase *lag*.

La cinética de pseudo primer orden propuesta en la **Sección 4.2** para la MR (**Ecuación 4.1**) permitió discriminar claramente los tres sistemas estudiados en esta sección, como se muestra en la **Figura 4.39**.

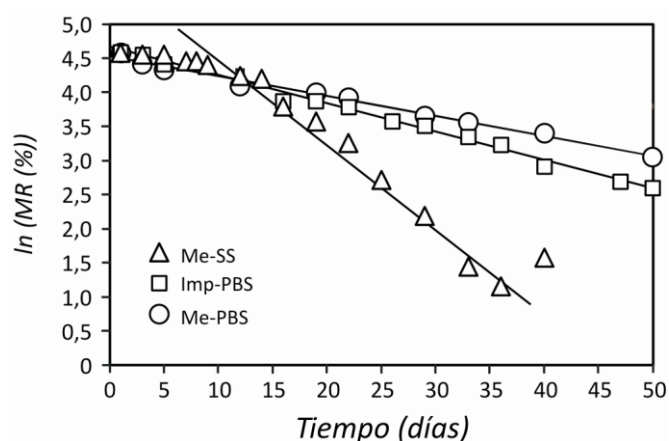


Figura 4.39. Ajuste de la Ecuación 4.1 a los datos experimentales MR, para los tres sistemas investigados.

Los datos de Me-SS se ajustaron desde el día 8 en adelante (esto es, dejando fuera la fase *lag*). De la **Ecuación 4.1**, se calcularon las constantes cinéticas de pseudo primer orden así como también sus correspondientes valores de R^2 , presentados en la **Tabla 4.7**.

Tabla 4.7. Parámetros de la erosión obtenidos del ajuste de la **Ecuación 4.1** a la MR medida, para los tres sistemas investigados

	Me-SS ^a	Imp-PBS	Me-PBS
Puntos experimentales (n)	11	17	12
k (día ⁻¹) ^b	-0,124 (0,011)*	-0,044 (0,004)*	-0,030 (0,002)*
R^2	0,976	0,993	0,990

Se utilizó el coeficiente de correlación estándar R^2 para la bondad de ajuste.

^a El ajuste se aplicó desde el día 8 de degradación en adelante. ^b Los resultados se expresan como: *valor del ajuste (DE)*.

Test estadístico: ANOVA y posterior test de Bonferroni. Símbolos distintos indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Como era de esperar, las microesferas se erosionaron más rápido en el medio a pH no regulado (autocatalizado) que en el medio mantenido a pH 7,4 (no catalizado). Los implantes, que presentaron un comportamiento de degradación intermedio (autocatalizado en el centro y no catalizado en la superficie), presentaron un perfil de erosión entre los dos perfiles de microesferas (**Figura 4.39**). Las constantes cinéticas de erosión muestran una tendencia razonable: $k_{Me-SS} > k_{Imp-PBS} > k_{Me-PBS}$ ($p < 0,001$ en todos los casos).

Se analizaron las DPM para los tres sistemas estudiados, cuyas áreas se normalizaron a la masa remanente correspondiente (**Figura 4.40**).

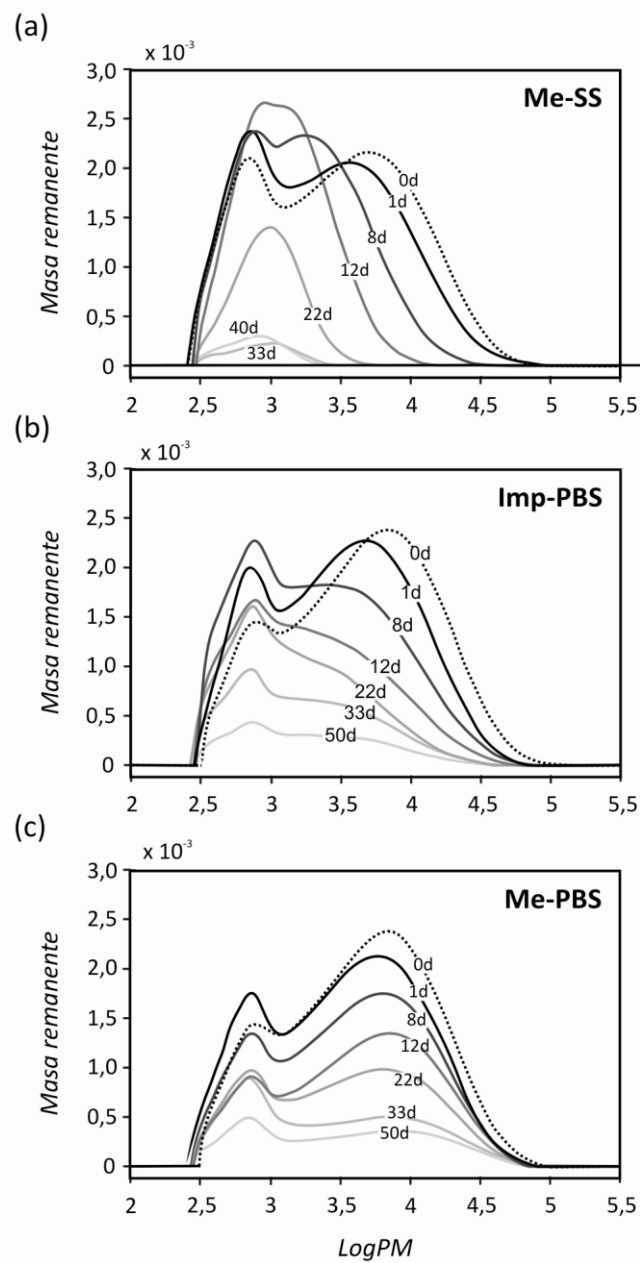


Figura 4.40. Evolución de las distribuciones de peso molecular normalizadas a la masa remanente para los tres sistemas investigados. La línea de puntos (0d) corresponde al PLGA de partida.

La **Figura 4.41** muestra la evolución de ambos máximos $\log PM_p$ a lo largo del tiempo de degradación.

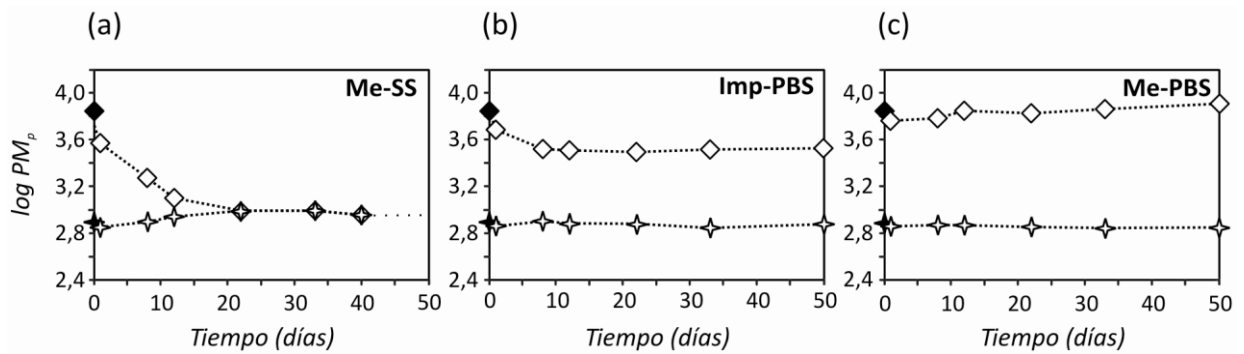


Figura 4.41. Evolución del pico del logaritmo de peso molecular ($\log PM_p$) para los tres sistemas investigados a) Me-SS; b) Imp-PBS, y c) Me-PBS, en función del tiempo de degradación. Los símbolos ($\cdots\diamond\cdots$) y ($\cdots\eta\cdots$) corresponden a los modos de alto y bajo peso molecular, respectivamente. Los símbolos rellenos corresponden a los $\log PM_p$ del PLGA de partida.

El modo de bajo peso molecular de las Me-SS exhibió un pequeño corrimiento hacia valores de peso molecular mayor, mientras que el modo de alto peso molecular presentó un rápido desplazamiento hacia pesos moleculares más bajos. A los 22 días, los modos de bajo y de alto peso molecular se fusionaron, produciendo una DPM unimodal centrada en alrededor de $\log PM_p$ 3,0. (**Figura 4.40 a** y **Figura 4.41 a**). El modo de alto peso molecular de Imp-PBS presentó un desplazamiento hacia pesos moleculares bajos, hasta alcanzar un $\log PM_p$ de aproximadamente 3,5 a los 12 días, mientras que el modo de bajo peso molecular no presentó desplazamientos manteniéndose en un valor de 2,9 (**Figura 4.40 b** y **Figura 4.41 b**). A lo largo de los primeros días, el área relativa del modo de alto peso molecular presentó una reducción pronunciada, mientras que la del modo de bajo peso molecular aumentó. A partir de los 12 días, las DPM no presentaron diferencias en cuanto a las áreas relativas de ambos modos, sólo se observa el proceso erosional caracterizado por una reducción del área absoluta bajo las curvas (**Figura 4.40 b**). Las Me-PBS presentaron DPM similares durante todo el período de degradación (**Figura 4.40 c**), con dos modos a 3,8 y 2,9 $\log PM_p$ (**Figura 4.41 c**). Como en el caso de Imp-PBS, el modo de bajo peso molecular presentó un incremento en su área relativa a lo largo de los primeros días de degradación.

Para los tres sistemas estudiados, la evolución de M_w durante el tiempo de degradación se muestra en símbolos en la **Figura 4.42**.

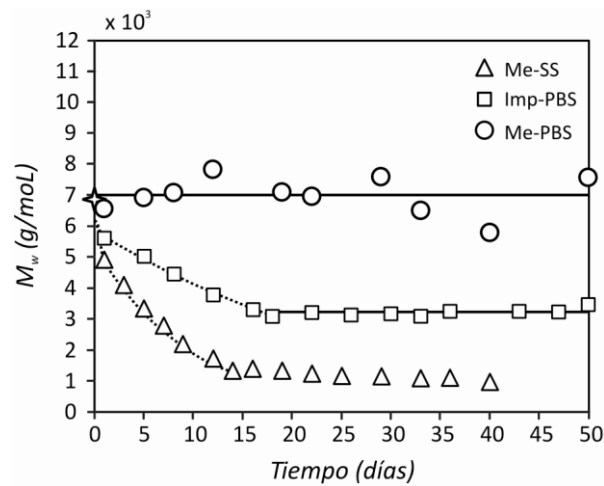


Figura 4.42. Evolución de los pesos moleculares promedio en peso (M_w) durante la degradación de los tres sistemas investigados. Ajuste de los datos experimentales con el modelo de la **Ecuación 4.2**. La degradación autocatalizada se indica con línea punteada, la degradación no catalizada se indica con línea continua. El símbolo η corresponde al M_w del PLGA de partida.

A pesar de que durante los primeros días la pérdida de masa de Me-SS fue despreciable, la M_w disminuyó inmediatamente al ponerse en contacto con el medio acuoso, hasta alcanzar un plateau a los 1000 g/mol después de 14 días de degradación. Algunos autores sugieren que este valor de M_w corresponde a oligómeros de PLGA lo suficientemente pequeños como para ser disueltos en el medio (esto es, tornando el proceso de hidrólisis en un proceso disolutivo) (Körber, 2010; Park, 1994), estando de esta manera ausentes en los cromatogramas SEC. Como en el caso de Me-SS, el M_w de Imp-PBS presentó una disminución hasta el día 15, seguido de un valor prácticamente constante de 3300 g/mol. A pesar de la dispersión, Me-PBS presenta un perfil de M_w sin tendencia durante los 50 días de estudio, lo que es consistente con la ausencia de cambios cromatográficos (ver **Figura 4.40 c**).

Se buscó desarrollar un modelo simple capaz de describir el patrón de degradación, $M_w(t)$, de implantes en un medio isosmótico mantenido a pH fisiológico (Imp-PBS), como un caso intermedio entre los perfiles de degradación de Me-SS y Me-PBS. Dado que el PLGA de partida presentó una DPM bimodal, no fue posible asignar a los modos de bajo y alto peso molecular la degradación del centro y la superficie, respectivamente, como lo reportado en la literatura (Grizzi y col., 1995; Li y col., 1990; Tamada y Langer, 1993). En su lugar, se presenta un patrón de las DPM asociado al pH del medio circundante. Cuando los productos de degradación disminuyen el pH (como en Me-SS), las moléculas poliméricas de alto peso molecular son rápidamente hidrolizadas a cadenas más cortas, desplazando así el modo de alto peso molecular hacia pesos moleculares menores (**Figure 4.40 a**). Por el contrario, a pH fisiológico (esto es, como en Me-PBS) la hidrólisis del

polímero no ocurre sólo a nivel de las cadenas de alto peso molecular, por lo que estas cadenas están presentes durante toda la degradación. Las DPM no presentan corrimientos significativos, sólo cambios en la proporción de las diferentes cadenas poliméricas (aumenta la población de cadenas de bajo peso molecular en detrimento de una disminución de la población de cadenas más largas). Típicamente, un polímero que sufre erosión de superficie exhibe una DPM invariante durante toda su degradación. Esto es debido a que la degradación ocurre gradualmente en la superficie del polímero, y las cadenas poliméricas de bajo peso molecular (oligómeros) son liberadas al medio, estando ausentes en los cromatogramas SEC (Lam y col., 2008). De acuerdo con los perfiles de DPM presentados en la **Figura 4.40 c**, las microesferas de PLGA degradadas en un medio mantenido a pH fisiológico (Me-PBS) sufren una degradación tipo superficial. Este resultado probablemente se deba a nuestras condiciones experimentales particulares, que involucran pequeñas matrices poliméricas y un estricto control del pH del medio.

Entonces, el proceso de degradación de Imp-PBS puede ser modelado a través de dos fases consecutivas. La primera, gobernada por un proceso autocatalítico que ocurre al pH del centro del implante (similar al patrón Me-SS). La segunda, correspondiente al proceso no catalizado que ocurre luego de que la pared del implante se daña, en un medio mantenido a pH fisiológico (similar al patrón de degradación tipo superficial de Me-PBS). La ruptura de la pared del implante fue corroborada por el perfil de pH y las fotomicrografías de Imp-PBS (**Figura 4.36 b** y **Figura 4.37**).

La mayoría de las publicaciones reportan que la degradación *bulk* de dispositivos de PLGA a pH 7,4 y 37 °C esta dominada por un proceso autocatalítico que ocurre a lo largo de toda la degradación. Sin embargo, se ha reportado en la bibliografía un proceso que combina mecanismos de erosión de matriz con erosión de superficie para *scaffolds* porosos de PLGA de alto peso molecular, bajo un control semanal del pH del medio (Yoshioka y col., 2008). En ése trabajo, los autores reportan un mecanismo de degradación basado en un primer período de degradación *bulk* autocatalizada, seguido de una liberación de productos ácidos acumulados y un segundo período de degradación superficial. En nuestro trabajo, observamos un patrón de degradación similar para otro sistema a base de PLGA: implantes formados *in situ*, con una relación de copolímeros y peso molecular diferentes. Además, encontramos que la degradación tipo superficial del PLGA ocurre cuando hay un pH fisiológico controlado de manera rigurosa y en ausencia de productos ácidos acumulados en el medio circundante. Las microesferas degradadas en PBS y en SS fueron útiles para elucidar el mecanismo de degradación, lo que nos permitió asociar el medio de degradación con dos períodos de degradación observados en los Imp-PBS.

Así, el modelo matemático para la degradación de los implantes puede concebirse como una simple combinación de los procesos de Me-SS y de Me-PBS. Si se asume que cada proceso individual sigue una cinética de primer orden, el modelo global propuesto es:

$$M_w(t) = \begin{cases} M_w(0) \cdot A \cdot e^{-\lambda t} & \text{reacción autocatalizada} \\ M_w(0) \cdot A \cdot e^{-\lambda t_{ri}} & \text{reacción no catalizada} \end{cases} \quad (4.2)$$

Donde A y λ son parámetros que deben ser determinados con los datos experimentales, y t_{ri} es el tiempo correspondiente a la ruptura de la pared del implante.

La **Figura 4.42** muestra las predicciones del modelo de acuerdo a los parámetros ajustados indicados en la **Tabla 4.8**.

Tabla 4.8. Parámetros de degradación obtenidos del ajuste de la **Ecuación 4.2** a los datos de M_w , para los tres sistemas investigados

	Ms-SS ^b	Imp-PBS		Ms-PBS
		degradación autocatalizada ^c	degradación no catalizada ^d	
Puntos experimentales (n)	7	7	11	10
λ (día ⁻¹)	0,101 (0,002)	0,036 (0,001)	≈0	≈0
A	0,78 (0,01)	0,86 (0,01)	0,46 (0,01)	1,02 (0,07)

Se utilizó el test de Chi cuadrado para la bondad de ajuste, con un nivel de significancia de $\alpha=0,01$

^a Los resultados se expresan como: *valor del ajuste (DE)*; ^b Ajuste realizado hasta el día 14 de degradación; ^c Ajuste realizado hasta el día 16 de degradación; ^d Ajuste realizado desde el día 18 de degradación

El tiempo t_{ri} resultante de nuestro sistema fue 17,4 días, calculado de la intersección de las curvas de degradación catalizada y no-catalizada. El modelo también puede describir adecuadamente los casos límites de Me-SS y Me-PBS. Para Me-PBS, el modelo directamente predice una constante para $M_w(t)$.

La **Figura 4.43 a** muestra un esquema de los procesos de erosión *bulk* y superficial, y el proceso propuesto para Imp-PBS.

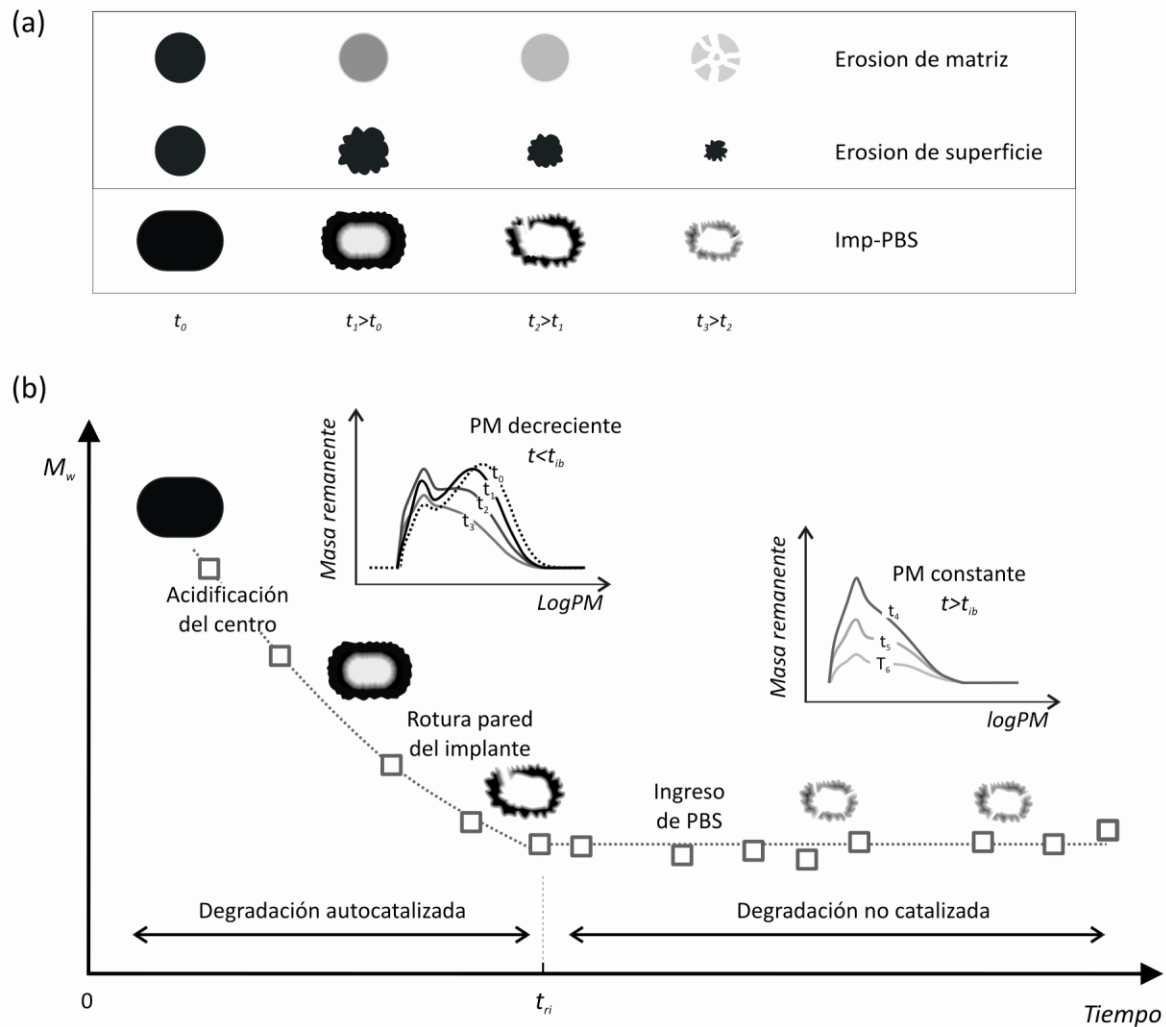


Figura 4.43. Visualización esquemática de los diferentes procesos de degradación a lo largo del tiempo (mayor densidad de color representa menor grado de degradación). a) Procesos de degradación/erosión típicos de matriz (bulk) y de superficie, y la propuesta del proceso de degradación/erosión para implantes en PBS; b) Tiempo de evolución de DPM y M_w del implante degradado en un medio mantenido a pH fisiológico (Imp-PBS). El tiempo t_{ri} representa el momento de la rotura del implante.

Como un caso intermedio, Imp-PBS exhiben una combinación de ambos procesos de degradación/erosión. Inicialmente, un proceso ácido autocatalizado en el centro del implante gobierna la degradación, hasta que las paredes del implante se rompen ($t=t_{ri}$). Durante este período, las DPM presentan un desplazamiento gradual hacia pesos moleculares bajos, resultando así en una disminución en los valores de M_w (fase de degradación autocatalizada). Durante la segunda fase de la degradación (a $t > t_{ri}$), no ocurre acumulación significativa de productos ácidos en el implante, siendo la hidrólisis gobernada por un proceso tipo superficial. Durante esta fase, las DPM permanecen sin desplazamientos, resultando en valores de M_w alrededor de una constante. La **Figura 4.43 b** resume los dos pasos del proceso de degradación de un implante mantenido en condiciones fisiológicas (Imp-PBS).

4.4.3. Conclusiones

En esta sección se busco elucidar algunos aspectos del proceso de degradación de implantes de PLGA formados *in situ* en un medio a pH fisiológico, usando como modelo la formulación polimérica F1. El monitoreo del pH, la pérdida de masa, la DPM, y el M_w a lo largo del tiempo probaron ser útiles para evaluar los procesos de erosión/degradación, así como para inferir los mecanismos de degradación involucrados. Dado que el PLGA utilizado presentó una DPM bimodal, no se pudo asociar la degradación de la superficie y del centro del implante con un modo característico. En cambio, se relacionó el patrón de DPM con un comportamiento temporo-espacial del implante asociado a su vez con el pH del medio circundante.

Los Imp-PBS sufrieron un proceso dependiente del tiempo caracterizado por dos fases bien diferenciadas: i) una fase gobernada por la degradación *bulk* autocatalítica del centro del implante, que ocurre antes de la rotura del implante (durante las primera dos semanas), ii) una fase de degradación tipo superficial que ocurre una vez que se rompe la pared del implante. Ambas fases se justifican independientemente por un perfil decreciente de pérdida de masa polimérica. El uso de microesferas de PLGA degradadas en los medios SS y PBS, fueron útiles para estudiar la degradación de áreas afectadas por diferentes pH de dispositivos con problemas difusionales, y para interpretar los fenómenos de degradación. La metodología basada en el análisis de sistemas auxiliares de microesferas se presenta como una herramienta prometedora que podría permitir una mejor comprensión del proceso de degradación de otros sistemas de PLGA.

4.5 Liberación *in vitro* de paclitaxel a partir de implantes formados *in situ*

4.5.1 Introducción y objetivos

Asegurar que la liberación de una droga a partir de una formulación de liberación controlada se deba, exclusivamente, a propiedades de los excipientes y la droga, es fundamental para caracterizar el sistema y lograr una mejor correlación entre lo que sucede en un medio artificial y en un medio fisiológico-biológico real. Si un principio activo es poco soluble en el medio de liberación y logra saturarlo al cabo de un determinado tiempo, la liberación se detendrá y no representará de ninguna manera lo ocurrido *in vivo*, donde la circulación sanguínea y un metabolismo eficiente mantendrán depurado de droga liberada los sitios de inyección.

Mantener la dilución infinita o *sink conditions* es una limitación importante para la realización de ensayos de liberación. Para drogas de carácter hidrofóbico, esta situación es más crítica, dado que la solubilidad de la droga en un medio acuoso es extremadamente baja y se necesitarían grandes volúmenes de medio de liberación para cumplir con el criterio de dilución infinita. Comúnmente se recomienda un volumen tres veces mayor al volumen necesario para disolver completamente la dosis (3X), y algunas fuentes recomiendan incluso 5X y hasta 10X (Rohrs, 2001).

El paclitaxel (PTX) (**Figura 4.44**) es un agente antitumoral efectivo poco soluble en agua. Diferentes trabajos reportan datos de solubilidad en agua de esta droga en el rango 3-6 ppm (Singla y col., 2002; Swindell y col., 1991; Tarr y Yalkowsky, 1987).

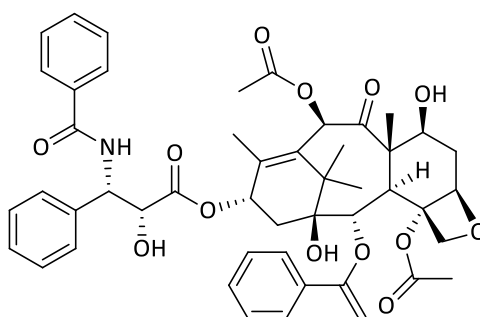


Figura 4.44. Estructura química del paclitaxel.

Para aumentar su solubilidad en medios de liberación *in vitro* de base acuosa, se han estudiado el agregado de surfactantes, proteínas y solventes no acuosos (Cho y col., 2004). Si bien se sabe que variar el pH puede favorecer la solubilidad de ciertas drogas hidrofobicas, en este caso al ser el PXT una molécula no ionizable, la modificación de éste parámetro no tiene efecto alguno sobre la

miscibilidad en agua de esta droga. Actualmente, la adición de surfactantes al medio de liberación es el método más utilizado, y está catalogada por algunos autores como fisiológicamente relevante ya que podría imitar la acción solubilizante de algunos componentes plasmáticos, como las proteínas (Turino, 2012).

Una vez seleccionadas las condiciones adecuadas para el ensayo de liberación *in vitro*, y habiéndolos llevado a cabo, se puede centrar el análisis en los fenómenos de liberación involucrados en la formulación en estudio como disolución, difusión, velocidad de degradación de la matriz, hinchamiento, entre otras.

Según la literatura, durante la liberación total de una droga atrapada en una matriz de PLGA intervienen tres procesos: la hidratación e hinchamiento de la matriz polimérica, la disolución y difusión de la droga a través de dicha matriz, y la erosión del polímero (Schliecker, 2003), todas representadas en la **Figura 4.45**.

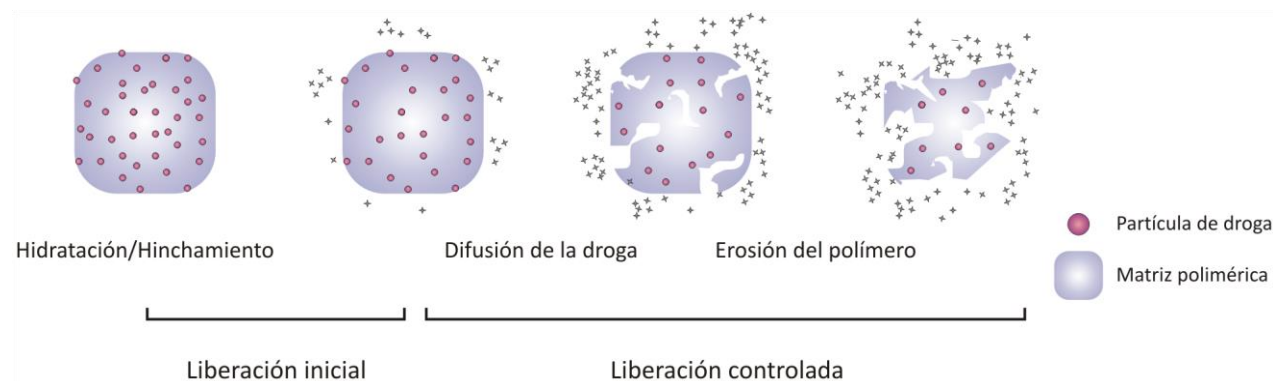


Figura 4.45. Mecanismos involucrados en la liberación de un fármaco a partir de una matriz de PLGA. Adaptado de O'Neil (O'Neil, 2010)

Una vez que la droga se solubiliza en la superficie exterior, la droga en las capas interiores empieza a difundir fuera de la matriz y, posteriormente, se solubiliza también. Al mismo tiempo, la matriz de polímero experimenta degradación hidrolítica y empieza a erosionarse físicamente, permitiendo que las capas del centro expulsan su carga de fármaco, hasta que el dispositivo se degrada completamente y el efecto terapéutico disminuye. (O'Neil, 2010).

La manera en que ocurre cada una de estas tres fases (hidratación, difusión y erosión), definirá los perfiles de liberación de la droga. Por ejemplo, la magnitud de la liberación inicial va a depender de factores como la velocidad de formación *in situ* del implante (proceso de inversión de fases) y la viscosidad de las soluciones poliméricas, entre otros.

El mecanismo de liberación de la droga desde sistemas de formación *in situ*, como los implantes de PLGA empleados en esta tesis, es complejo. La velocidad de liberación va a depender de características de la droga y de un gran número de parámetros de la formulación. Entre estos parámetros se encuentran: el tipo, concentración y peso molecular del polímero, tipo y cantidad de solvente, así como la presencia de aditivos, tales como tensioactivos o co-solventes. También tienen un impacto sobre la liberación características de la droga tales como: hidrofiliidad y lipofiliidad, miscibilidad en agua y peso molecular (Sautter, 2006).

Las formulaciones seleccionadas en este trabajo de tesis F1-4 presentan, como se estudió en las secciones anteriores, características diferenciales dependientes del tipo de sistema solvente utilizado. En esta sección se investigará el efecto de estos sistemas solventes en el entrapamiento, los perfiles de liberación y la evolución de los implantes formados *in situ* a partir de las formulaciones F1-4 conteniendo PTX al 10 y al 40% p/p de PLGA.

4.5.2 Resultados y discusión

Entre los agentes solubilizantes de PTX reportados en la bibliografía, el detergente no iónico Tween 80 se ha agregado al 0,05-0,1% p/v en el medio de liberación de matrices poliméricas conteniendo PTX (Nsereko y Amiji, 2002; Ranganath y Wang, 2008). El tensioactivo dodecilsulfato sódico (SDS) es recomendado por la FDA para aumentar la solubilidad de drogas insolubles o poco solubles en agua (*FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, 1997) y esta reportado su uso en ensayos de liberación de PTX al 0,3% p/v (Ruel-Gariépy y col., 2004). La *N,N*-dietilnicotinamida es un agente hidrotrópico eficaz, capaz de aumentar hasta 100 veces la solubilidad de PTX en agua (Lee y col., 2003). Entonces, ensayamos la solubilidad de la droga en solución buffer fosfato salina (PBS pH 7,4) conteniendo Tween 80, SDS y *N,N*-dietilnicotinamida. Los resultados se presentan en la **Tabla 4.9**.

Tabla 4.9. Solubilidad de PTX a 37 °C en diferentes medios de liberación basados en PBS

Medio	Solubilidad PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
PBS	4,9 (1,1)
PBS-Tween 80 0,5% p/v	18,9 (4,5)
PBS- <i>N,N</i> -dietilnicotinamida 1M	>100
PBS-SDS 0,3% p/v	61,9 (1,7)

Los resultados se presentan como *media* (DE)

Si bien de todas las condiciones ensayadas, el medio PBS conteniendo *N,N*-dietilnicotinamida 1 M resultó en la mayor solubilidad de PTX, se decidió no trabajar con dicho excipiente por estar reportado en la bibliografía una degradación acelerada del PLGA en su presencia (Baek y col., 2004). Por otro lado, la adición de 0,3% de SDS al PBS permitió solubilizar aproximadamente 62 μg de PTX por cada mililitro de medio, frente a 20 μg que solubilizó el Tween 80 al 0,5% (siendo ésta una concentración mucho mayor a la comúnmente reportada). Es por esto que se optó por trabajar con PBS-SDS 0,3% p/v como medio de liberación de PTX en los ensayos a realizar.

Normalmente, se reporta una carga de PTX de 10% p/p en dispositivos preformados implantables para la liberación de droga (Lee y col., 2009; Ong y col., 2009; Ranganath y Wang, 2008). Por otra parte, para poder administrar una dosis de PTX (comúnmente de 10-20 mg/kg de peso corporal) sin producir injuria en el tejido por el uso de grandes volúmenes de formulación, se deberían inyectar dosis de mayor carga de droga. De manera tal de permitir un mejor ajuste en los volúmenes de inyección en caso de ser necesario, se eligieron concentraciones de la droga en la formulación de 10 y 40% p/p de PLGA, a las que llamaremos PTX10 y PTX40, respectivamente.

Ahora bien, se determinó la solubilidad de PTX en los solventes DMSO, 2P y TR, para conocer si la droga se solubilizaba o quedaba dispersa a la máxima concentración de trabajo. Para los tres solventes (y mezclas de solventes 50:50 DMSO:2P y DMSO:TR), el PTX quedó totalmente disuelto a la concentración ensayada (una única fase homogénea).

Las formulaciones seleccionadas para los estudios de liberación *in vitro* de PTX, el entrapamiento (*En*) y la eficiencia de entrapamiento (*Ee*) se detallan en la **Tabla 4.10**.

El entrapamiento de PTX fue del 100% en todos los casos, probablemente por la baja solubilidad de esta droga en agua. La molécula hidrofóbica de PTX queda atrapada totalmente dentro de la matriz polimérica, también hidrofóbica, durante el proceso de inversión de fases.

Tabla 4.10 Formulaciones para la liberación *in vitro* de PTX. Preparación, concentración de PLGA y PTX, entrapamiento (*En*) y eficiencia de entrapamiento (*Ee*)

Formulación	Preparación				[PLGA] (% p/p)	[PTX] inicial (% p/p PLGA)	<i>En</i> (%) ^a	<i>Ee</i> (%) ^a
	PLGA (mg)	DMSO (mL)	2P ó TR (mL)	PTX (mg)				
F1/PTX10	400	1		40	26,1	10	9,7 (0,5)	99,7 (0,3)
F1/PTX40	400	1		160	23,9	40	40,3 (0,7)	100,6 (1,7)
F2/PTX10	300	1		30	20,8	10	10,2 (0,2)	102,1 (2,1)
F2/PTX40	300	1		120	19,9	40	40,3 (3,7)	100,8 (9,3)
F3/PTX10	300	0,5	0,5	30	20,7	10	10,1 (0,1)	101,4 (1,1)
F3/PTX40	300	0,5	0,5	120	19,7	40	40,5 (1,1)	101,2 (2,7)
F4/PTX10	300	0,5	0,5	30	20,5	10	10,5 (0,6)	105,1 (5,8)
F4/PTX40	300	0,5	0,5	120	19,2	40	39,7 (6,6)	99,4 (16,6)

^a Los resultados se expresan como *media* (*DE*)

Los ensayos de liberación de PTX de implantes formados *in situ* de PLGA en un medio PBS-SDS no se pudieron realizar utilizando bolsas de diálisis, dado que la droga no difundió a través de la misma al medio de liberación. Creemos que esto puede deberse a algún tipo de interacción entre el PTX, el SDS y la membrana, y/o la formación de miscelas que impidan el transporte a través de los poros de la membrana, de 12 kDa. Es por esta razón que los implantes se prepararon como se detalla en la **Sección 3.2.26 de Materiales y Métodos**, formándolos en viales, para colocarlos luego sueltos en los frascos de liberación. Los implantes de 1 día de incubación tuvieron una estructura de disco, de diámetro promedio 1,8 (0,1) cm.

En la **Figura 4.46** y **Figura 4.47** se presenta la evolución de los implantes F1-4 conteniendo PTX10 y PTX40, respectivamente. Como se puede observar, a los 183 días de incubación dichos implantes aún conservaban masa remanente. Dado que en estos implantes no se realizó un seguimiento de la erosión por gravimetría, se midieron las áreas de los mismos a partir de las fotografías, y se calculó la variación del área porcentual, *Área (%)*, como una medida de la evolución de los implantes, según la **Ecuación 4.3**.

$$\text{Área (\%)} = \frac{\text{Área (t)}}{\text{Área inicial}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

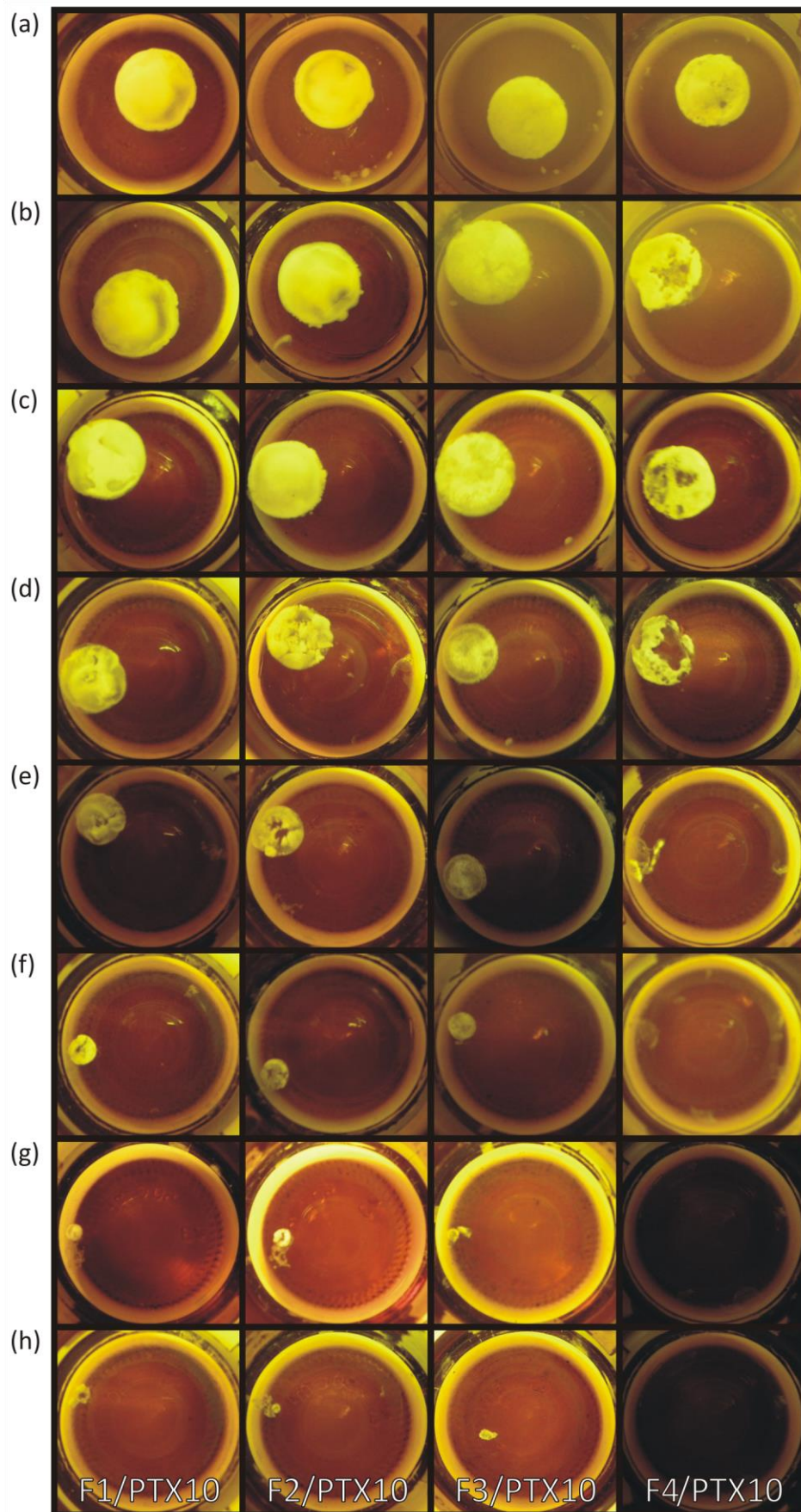


Figura 4.46. Fotografías de los implantes F1-4/PTX10 formados *in situ* a los a) 3 días, b) 12 días, c) 47 días, d) 75 días, e) 96 días, f) 124 días, g) 160 días, h) 183 días de la liberación *in vitro* de PTX.

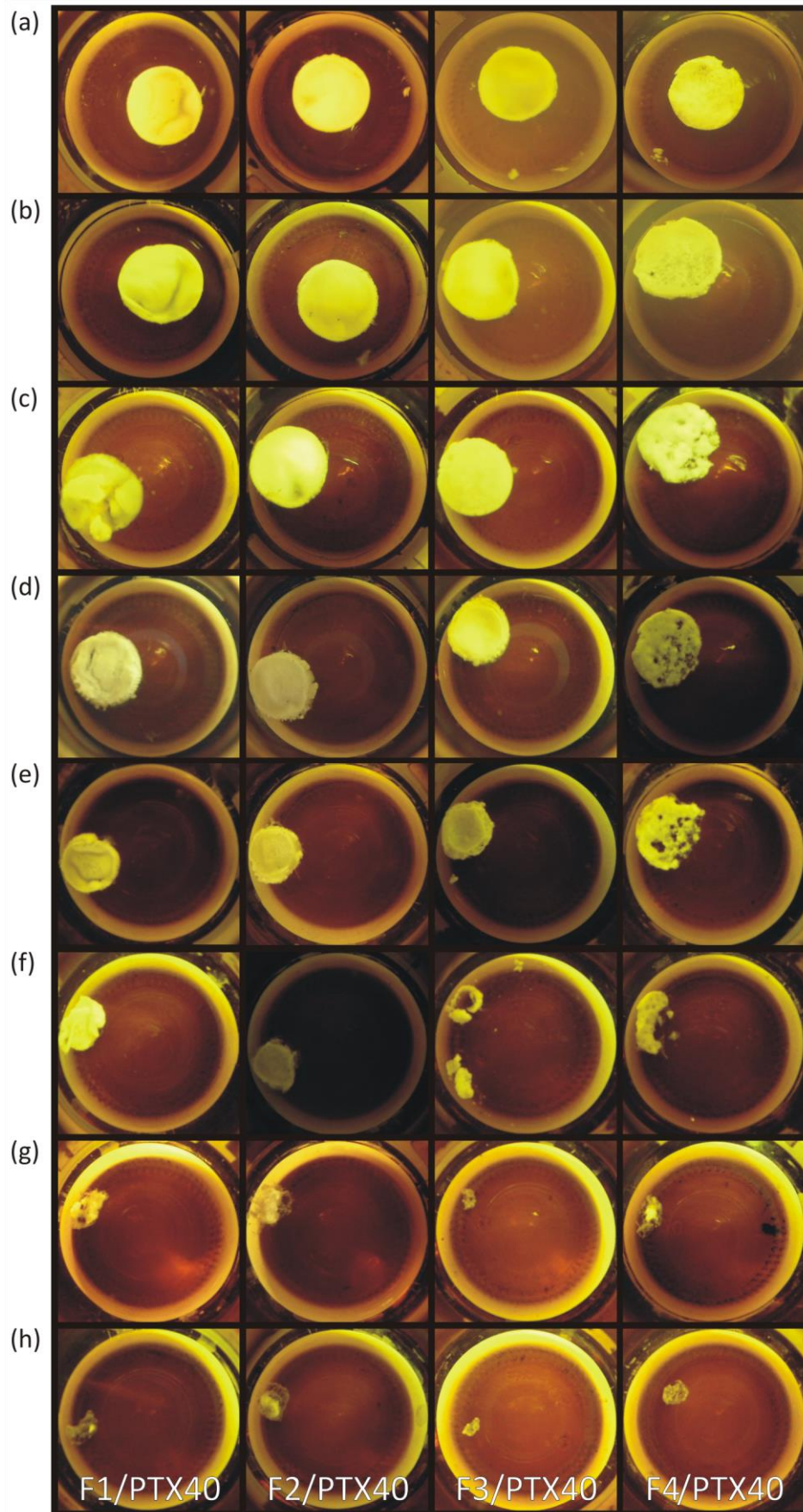


Figura 4.47. Fotografías de los implantes F1-4/PTX40 formados *in situ* a los a) 3 días, b) 12 días, c) 47 días, d) 75 días, e) 96 días, f) 124 días, g) 160 días, h) 183 días de la liberación *in vitro* de PTX.

Donde $\text{Área}(t)$, es el área del implante a un tiempo t , y Área inicial es el área del implante al inicio del ensayo. La evolución del $\text{Área}(\%)$ en función del tiempo se presenta en la **Figura 4.48**.

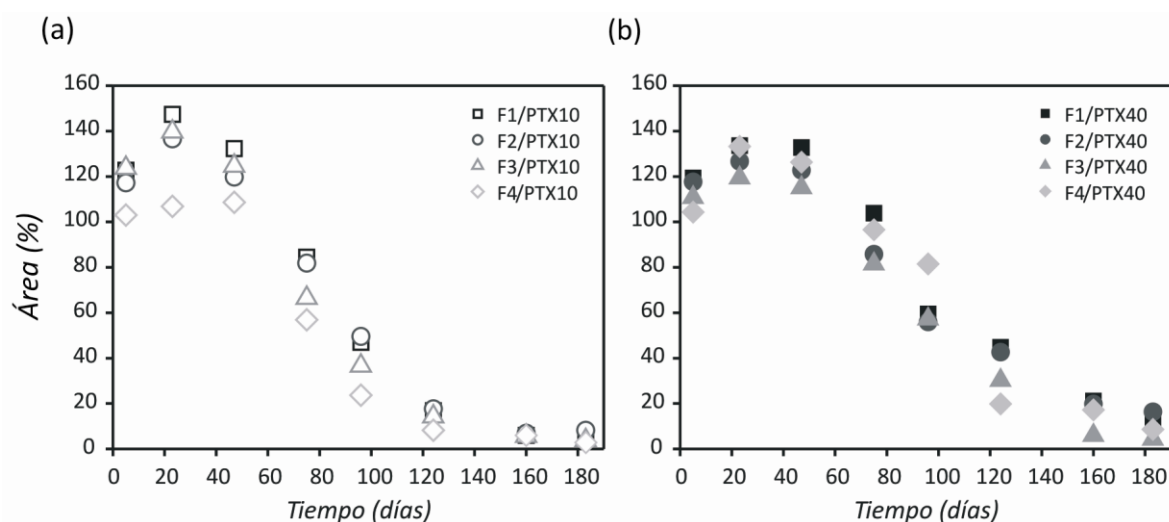


Figura 4.48. Evolución de $\text{Área}(\%)$ durante el ensayo de liberación in vitro de PTX para los implantes F1-4, con una carga de PTX inicial de a) 10%, y b) 40% p/p de PLGA.

Tanto en las fotografías como en la **Figura 4.48**, se aprecia cómo durante los primeros 25-30 días de ensayo los implantes F1-3 aumentan su tamaño, siendo mayor el aumento en los implantes conteniendo PTX10. También se puede observar en dichos implantes el borde irregular, producto del hinchamiento o hidratación de la matriz. Esto probablemente se deba a una menor hidrofobicidad de la matriz conteniendo PTX10 respecto de PTX40, por el menor contenido de droga hidrofóbica. De manera contraria, el aumento en el área de los implantes F4/PTX10 fue menor que en los implantes F4/PTX40.

Luego de este hinchamiento, comienza una reducción sostenida en el tamaño de todos los implantes, siendo este resultado más pronunciado en las matrices con PTX10, resultado coherente con su menor hidrofobicidad. En los implantes F4/PTX10, esta reducción de tamaño es aún más pronunciada. Además, se puede apreciar en las fotografías cómo los implantes conteniendo TR (F4/PTX10 y F4/PTX40) se erosionan de manera diferente al resto. Mientras que los implantes F1-3 conservan una estructura aproximadamente circular y van disminuyendo su tamaño, F4 presenta una matriz que se va “carcomiendo” con el correr del tiempo. Este resultado podría explicarse a través de la formación de estructuras más cerradas en F1-3 por el más rápido intercambio de solvente (como se estudió en la **Sección 4.2**). Este hecho, sumado a la hidrofobicidad aumentada de la matriz por la presencia de PTX, podría lograr que la difusión de agua dentro de la matriz

polimérica ocurra de manera lenta, degradándose y erosionándose más rápido en la superficie que en el interior. Mientras que F4, al formar matrices más abiertas debido a un más lento proceso de inversión de fases (por el contenido de TR de estas formulaciones, como se estudió en la **Sección 4.1**), permitiría un mejor acceso del agua a toda la matriz. Así, la hidrólisis de las uniones éster y, posteriormente, la erosión, puede ocurrir en igual proporción en la superficie, como dentro del implante, generando así el aspecto carcomido observado en estos implantes.

El ensayo de liberación de PTX se llevó a cabo durante 200 días, tiempo en el que los implantes completaron la liberación total de la droga, coincidiendo con su casi completa erosión. La vida media de estos implantes fue ~ 4 veces mayor respecto de los implantes degradados *in vitro* sin droga (resultados **Sección 4.2**). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores (Li y col., 1996; Siegel y col., 2006), que indicaron que la presencia de drogas en matrices poliméricas de PLA y PLGA modifica su velocidad de degradación.

Comúnmente, los perfiles de liberación de droga de dispositivos poliméricos biodegradables presentan un perfil trifásico, con una primera liberación rápida (fase I), donde se libera la droga débilmente retenida o adsorbida en la matriz que puede liberarse fácilmente al exterior (en el caso de dispositivos de formación *in situ*, esto ocurre mayoritariamente durante el proceso de inversión de fases). Luego, sigue una etapa de liberación lenta (fase II), donde la droga difunde lentamente a través de la matriz polimérica densa. La última etapa (fase III), es un período de liberación rápida, habitualmente atribuido al comienzo de la erosión del polímero (Fredenberg y col., 2011).

Los perfiles de liberación *in vitro* de PTX a partir de implantes formados *in situ* F1-4, con una carga inicial de droga de PTX10 y PTX40, se presentan en la **Figura 4.49**. Como se mencionó anteriormente, y se observa en los perfiles de liberación, durante los 200 días que tardaron los implantes en erosionarse, hubo liberación de droga, llegando casi al 100% de liberación. El hecho de que la liberación dure lo que la matriz tarda en erosionarse, habla de la fuerte influencia de la erosión del polímero sobre los mecanismos de liberación de PTX (ver **Figura 1.11** de **Introducción General**); y de la influencia de la droga en la erosión de la matriz – aumenta 4 veces el tiempo de degradación de la matriz–.

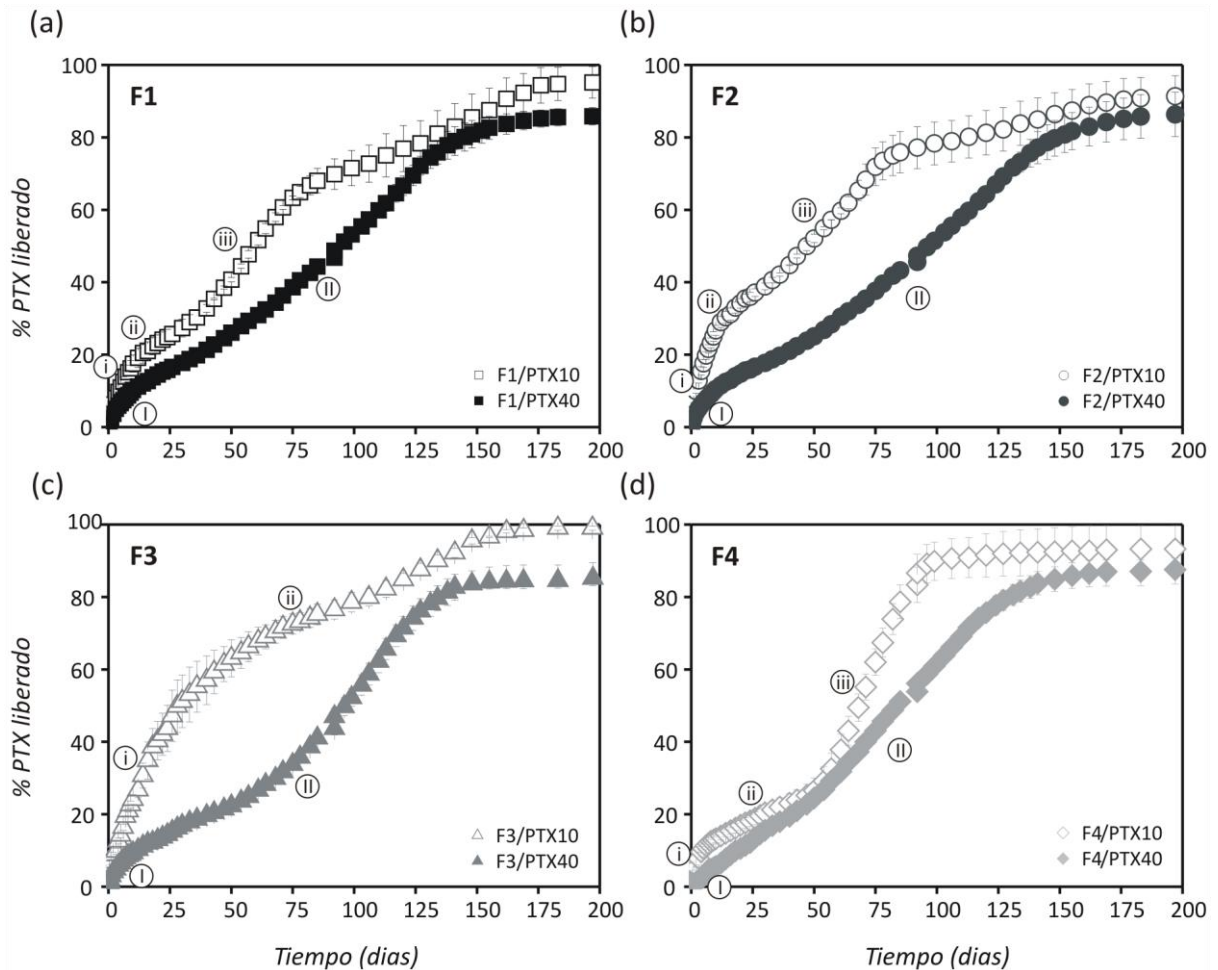


Figura 4.49. Perfil de liberación in vitro de PTX en implantes formados in situ, a) F1, b) F2, c) F3, y d) F4, con una carga de PTX inicial de 10% y 40% p/p de PLGA, indicados con símbolos vacíos y llenos respectivamente. Las letras i, ii y iii, indican la fase I, II y III de la liberación de los implantes con PTX10. Las letras I y II indican la fase I y II de los implantes con PTX40.

Como se puede observar, en todos los casos, los implantes conteniendo menor carga de droga (PTX10) presentaron un efecto *burst* inicial mayor, que fue de 4, 6, 7 y 4% de liberación a las 24 h de comenzado el ensayo para las formulaciones F1, F2, F3 y F4, respectivamente. El menor efecto en la liberación inicial de PTX observado en los implantes conteniendo PTX40 podría deberse a un aumento en la Tg. Un mayor número de interacciones droga-polímero debido a un aumento en el contenido de droga, aumenta la Tg del polímero haciéndolo más rígido, y disminuyendo el efecto *burst* inicial (Miyajima y col., 1998). También se puede apreciar que el efecto *burst* es más pronunciado en F2 que en F1. Esta liberación inicial más pronunciada a causa de una menor proporción de polímero en la matriz esta reportado en la bibliografía para otros sistemas a base de PLGA (Lambert y Peck, 1995). Esto probablemente se deba a que en matrices con mayor proporción de polímero, y, por ende, más hidrofóbicas y más viscosas, la barrera de difusión del

fármaco hacia el medio de liberación sea mayor. Es de esperar, que en formulaciones cuyo proceso de inversión de fases es más lento, se produzca una liberación inicial más lenta, dado que parte de la droga débilmente retenida se libera junto con el solvente.

Como se observa en la **Figura 4.49 a y b**, F1/PTX10 y F2/PTX10 presentaron perfiles de liberación trifásicos. Luego de la liberación inicial, los implantes presentaron una fase de retardo corta (fase II), para luego liberar el ~70% de la droga a los 80 días (fase III). Luego, la liberación del resto de la droga ocurre de manera más lenta, alcanzando el ~90% de liberación al final del ensayo. Esta etapa posterior de liberación en perfiles con fase II rápidas se ha reportado previamente en la bibliografía (Fredenberg y col., 2011). Probablemente la fase III esté asociada a la degradación de la matriz polimérica, mientras que la etapa posterior corresponda a la erosión física del dispositivo (observar como en la **Figura 4.46 d** F1/PTX10 y F2/PTX10, correspondiente al día 75 de incubación, donde ocurre el cambio entre estas dos fases, ya se empieza a observar éste fenómeno).

A diferencia de los otros implantes PTX10, que presentaron perfiles trifásicos de liberación de droga, se puede observar en la **Figura 4.49 c**, el perfil bifásico de liberación para F3/PTX10. Una primera fase inicial de difusión de la droga, que se mantiene hasta aproximadamente el día 25, liberando el 50% de la carga inicial de droga. Luego, una fase de liberación sostenida, que dura hasta finalizar el ensayo. Creemos que en estos implantes, esta primera etapa de difusión estaría asociada a la hidratación de la matriz, y que estaría enmascarando la fase II que se observan en los otros implantes con igual carga de PTX. Este supuesto lo basamos en el hecho de que, de los cuatro implantes, F3 presentó el mayor hinchamiento, en cuanto al espesor de los discos (datos no mostrados). Probablemente esto se deba a la presencia de 2P fuertemente retenida en los implantes, solvente prótico polar capaz de formar puentes hidrógeno con el agua, aumentando así la hidratación de la matriz. Además, el cambio de fases ocurre aproximadamente a la altura del cambio en el perfil de *Área (%)*. Así, una vez que la hidratación de la matriz cesa, es sólo el proceso erosivo el que estaría involucrado en la liberación.

Por su parte, F4/PTX10 resultó en un perfil trifásico (**Figura 4.49 d**), con una liberación inicial de menor duración respecto al resto de los implantes, una fase de retardo, que dura aproximadamente 50 días, y que involucra probablemente una difusión retardada de la droga a través de la matriz, y una tercer fase de liberación más rápida, asociada a la erosión del implante. Comparando los tres implantes que presentaron un perfil trifásico, se puede apreciar que, mientras que el comienzo de la tercera fase, asociada a un proceso erosivo, comienza a los 15-20 días en F1/PTX10 y F2/PTX10, en F4/PTX10 ocurre alrededor de los 50 días. Al analizar las

correspondientes curvas de *Area (%)*, podemos ver que estos tiempos se correlacionan con el comienzo de decaimiento del área porcentual, indicando que esta tercera fase estaría asociada a un proceso erosivo. Diversos autores asocian esta fase de liberación rápida a la degradación/erosión del PLGA (Desai y col., 2008; O'Neil, 2010).

El hecho de que la liberación de la droga ocurra principalmente durante la degradación/erosión del polímero, podría estar indicando una fuerte interacción polímero-droga y/o droga-droga, que hace necesario que la matriz polimérica comience a disolverse para que el PTX pueda difundir al medio. Esta interacción probablemente no sea tan fuerte en los implantes F3/PTX10, por la acción solvatante de la 2P, lo que resulta en una fase difusiva más importante.

Como se observa en la **Figura 4.49 a-d**, los perfiles de liberación de droga de los implantes conteniendo 40% de PTX inicial presentaron un efecto explosivo inicial casi nulo, aunque mayor en los implantes que presentan una liberación de solvente más explosiva F1 y F2 (ver **Sección 4.1**). Luego, la liberación de la droga presentó una cinética de orden cero hasta los 140-150 días de ensayo, alcanzando un 80-85% de liberación. Este perfil monofásico de liberación, ha sido asociado a una superposición de curvas de primer orden de difusión y erosión (Okada, 1997). Aunque es raro encontrar este perfil de liberación en dispositivos para la LCD a base de PLGA, es el que comúnmente se prefiere (Fredenberg y col., 2011). Los implantes F3, presentaron un retardo en este perfil, aunque al superponer las curvas PTX40 se observó que fueron todas similares.

4.5.3 Conclusiones

Implantes formados *in situ* a partir de las formulaciones F1-4 conteniendo la droga hidrofóbica PTX al 10 y 40% p/p en base PLGA, aumentó, en primer lugar, el tiempo de vida media *in vitro* de dichos implantes aproximadamente cuatro veces. La matriz generada, entrampó durante el proceso de inversión de fases la totalidad de la droga que se encontraba en las formulaciones iniciales. Esta droga cambió las características de la matriz, aumentándole la hidrofobicidad de manera tal que los implantes se erosionaron principalmente por los bordes, a excepción de los implantes F4, debido a su contenido de TR.

Respecto a los perfiles de liberación obtenidos con las dos cargas de droga investigadas, los diferentes sistemas solventes utilizados dan lugar a perfiles de liberación diferenciales en los implantes conteniendo PTX10, no así en los implantes con PTX40.

Los perfiles diferenciales obtenidos con los implantes PTX10 permitirían modular la liberación de la droga de acuerdo al requerimiento farmacológico. Al utilizar una alta carga de droga, como PTX40, se suprime el efecto del sistema solvente, obteniendo en todos los casos cinéticas de liberación de orden cero. Este tipo de perfil es deseado en muchos programas de dosificación de fármacos, evitando efectos explosivos iniciales, y con una liberación constante hasta el vaciamiento del dispositivo.

Si bien los perfiles presentaron un efecto *burst* o explosivo inicial, este no fue significativo en relación a lo reportado en otros dispositivos de liberación de fármacos, posiblemente debido a la preferencia del PTX por permanecer dentro de la matriz polimérica hidrofóbica.

El hecho de que estos implantes cargados con PTX se erosionen mucho más lento que los implantes sin droga, es un punto importante a tener en cuenta en el desarrollo de dispositivos de LCD, dado que la elección inicial del polímero se hizo en base a la corta vida media del PLGA 502 H.

4.6 Estudio en animales de formulaciones de PLGA de precipitación *in situ*

4.6.1 Introducción y objetivos

La biocompatibilidad de los dispositivos farmacéuticos y/o biomédicos son un punto clave en el desarrollo de estos sistemas. En el desarrollo de formulaciones poliméricas de precipitación *in situ* se debe poner atención en la selección del polímero y del sistema solvente.

Como se dijo en la **Introducción General**, el PLGA utilizado en éste trabajo de tesis es uno de los polímeros más ampliamente investigados y avanzados en lo que a datos toxicológicos y clínicos se refiere, aprobado por la FDA para uso en varios dispositivos farmacéuticos (Lewis, 1990).

Respecto al sistema solvente, éste debe ser bien tolerado y biocompatible, y hemocompatible en el caso de ser utilizado en líquidos embolizantes. No debe causar dolor luego de la administración, ni irritación del tejido o necrosis en el sitio de inyección. (Dunn y col., 1990; Kranz y col., 2001; Mottu y col., 2000). En el caso de uso vascular, si las lesiones causadas por el solvente son graves, podría verse comprometido el vaso embolizado, aún usando agentes biodegradables, con la formación de un trombo permanente en respuesta al daño causado

En el caso de implantes poliméricos para la LCD, una desventaja es la encapsulación fibrosa creada por la reacción de cuerpo extraño, causando un efecto indeseable en la liberación del fármaco. Esta cápsula fibrosa es una barrera de difusión, resultando en una liberación impredecible de la droga (Hetrick y col., 2007; Ratner, 2002).

Por último, en el desarrollo de formulaciones inyectables para uso como agente embolizante, se debe prestar especial atención en la penetrabilidad de las formulaciones. Por un lado, porque cuan distal viaje una solución hasta precipitar va a definir su aplicabilidad (algunos tratamientos embolizantes requieren de la oclusión hasta un determinado grado en la rama arterial). Por el otro, porque la penetración del agente embolizante no debe ser tan profunda que traspase al sistema venoso. Esto trae aparejado un inminente embolismo pulmonar, que desencadena, en la mayoría de los casos, en la muerte del paciente por paro respiratorio (Bilbao y col., 2006).

En esta sección, se presenta una compilación de los estudios realizados en animales de experimentación a lo largo de esta tesis. Se evaluó en primer lugar, la biocompatibilidad de la formulación en la subcutis de ratas, y la evolución del tejido a lo largo del tiempo. Luego, se realizaron ensayos concernientes a la vía endovascular. Primero, usando como modelo la arteria femoral de cerdos, realizando el acceso a la vía corriente abajo, se estudió: i) el efecto radiográfico, esto es, vasoconstricción en respuesta a la irritación provocada por el solvente y ii) la

recanalización de una arteria ocluida con una de las formulaciones poliméricas. Luego, en el árbol arterial renal de conejo, se estudió iii) la penetrabilidad de la formulación polimérica. Los resultados obtenidos, se presentan a continuación.

4.6.2 Resultados y discusión

En la **Figura 4.48** se presenta la evolución durante el ensayo *in vivo* de los implantes subcutáneos formados *in situ* en ratas Wistar.

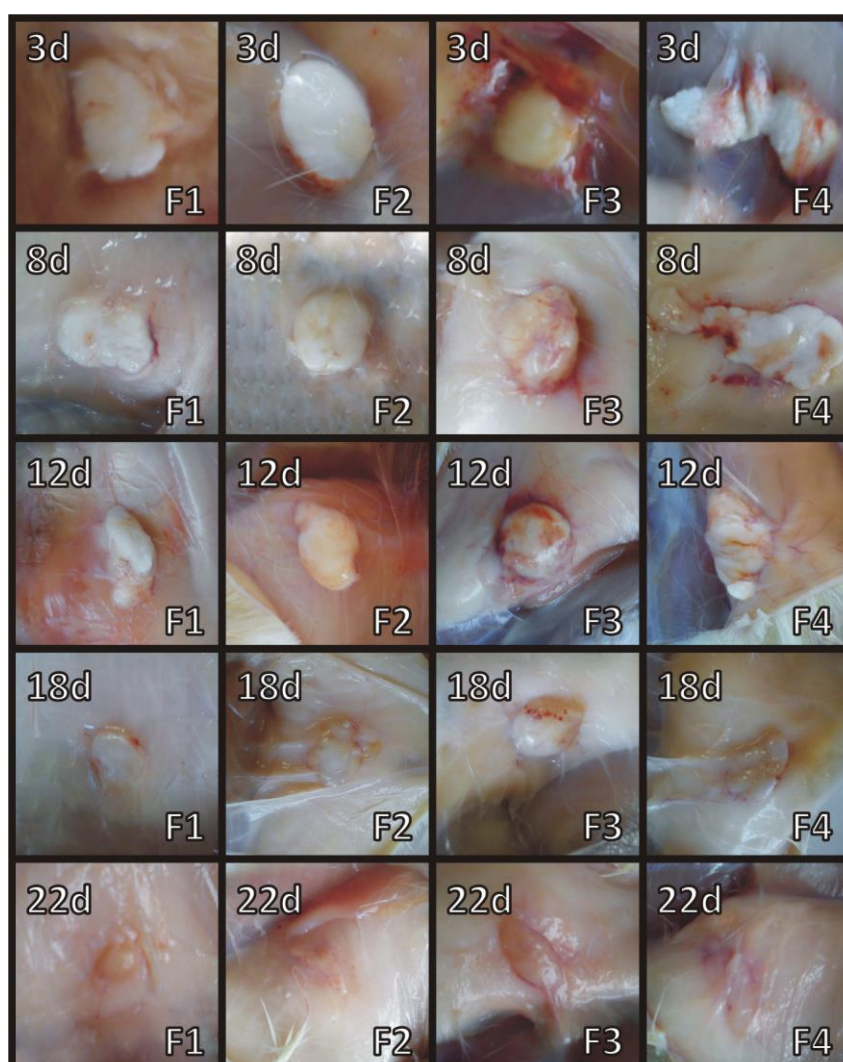


Figura 4.48. Evolución del sitio de inyección subcutáneo de los implantes formados *in situ* F1-4 en ratas Wistar.

A los 3 días post inyección, se observa el aspecto más aplanado y de forma más irregular de los implantes F4, del que se habló en la **Sección 4.3**. En los cuatro implantes ocurrió una reducción de la masa de implante del día 3 al día 22 post-inyección. Mientras que los implantes F1, F2 y F3 se

achicaron durante los 22 días de ensayo, F4, primeramente perdió espesor (del día 3 al 8, no mostrado), para luego achicarse. A los 18 y 22 días, en el sitio de inyección se observó la presencia de cápsula fibrosa en los cuatro implantes, siendo ésta de grosor mayor en los implantes F3. A los 18 días post inyección, dentro de estas cápsulas encontramos poco material polimérico granulado, con contenido de líquido linfático. A los 22 días, el material polimérico se había reabsorbido prácticamente por completo, y sólo había en el sitio de implantación tejido fibroso y restos de tejido conectivo. Por otro lado, de los cuatro implantes, F3 presentó una mayor vascularización en la zona de implantación, principalmente en los tiempos muestrales 3, 8 y 12 días. Esto podría explicar que la cápsula fibrosa sea de mayor grosor en los sitios donde se inyectó F3, siendo éste producto de la respuesta del tejido a una mayor irritación causada por el sistema solvente.

Frente a la presencia de un cuerpo extraño, se produce una respuesta protectora del tejido conocida como inflamación, que trata de restaurar los tejidos lesionados, y de neutralizar la presencia del cuerpo extraño. Este proceso complejo produce el acúmulo de fluidos y leucocitos en el espacio extravascular. En la inflamación, se produce una destrucción de las células del parénquima y del estroma. El tejido lesionado se repara mediante tejido conectivo que va a producir la fibrosis y la escarificación. En este proceso ocurre la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), la migración y proliferación de fibroblastos, y la maduración y organización del tejido fibroso. Los fibroblastos y las células del endotelio vascular comienzan a proliferar formando el tejido de granulación en el cual se forman nuevos vasos (angiogénesis) (Celada, 2013).

Para conocer la respuesta de los tejidos, donde se formaron *in situ* y se degradaron los implantes, se estudió por histopatología la sección transversal de las pieles afectadas. Se examinó la infiltración de células del sistema inmune, la presencia de fibrina, exudado y la inducción de vascularización y estroma (matriz extracelular con vasos sanguíneos y fibroblastos). Se estudiaron los cambios a nivel de la epidermis, la dermis, el músculo cutáneo, y el tejido conjuntivo subcutáneo.

A los tres días post inyección, los tejidos afectados por los implantes presentaron reacción inflamatoria exudativa reversible, ligero engrosamiento de la capa externa de la piel (hiperqueratosis) con infiltración de células del sistema inmune (linfocitos, mastocitos, eosinófilos, macrófagos, plasmocitos), inflamación del tejido conjuntivo (celulitis), y leve edema. Las lesiones más significativas se correspondieron con la piel inyectada con F3, que presentó restos celulares (detritus), una inflamación más marcada del tejido y necrosis de la fibra muscular.

En la **Figura 4.49** se presentan microscopías ópticas de corte transversal de tejido afectado por la formulación F2, como ejemplo de lo que ocurre a los tres días post inyección.

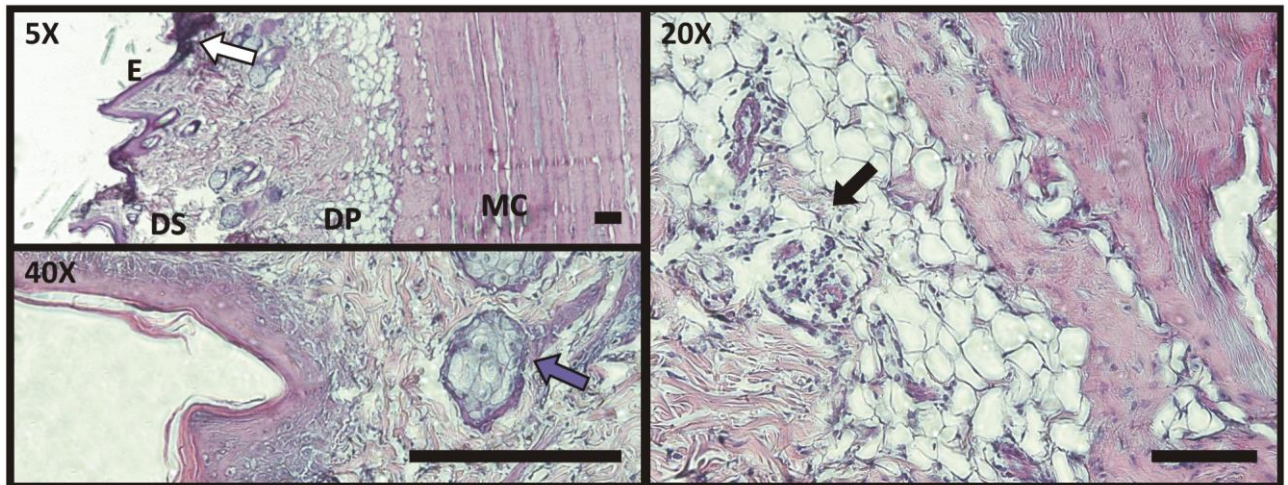


Figura 4.49. Corte transversal de piel de rata inyectada con F2, a los 3 días post inyección. A la izquierda arriba están indicados la epidermis (E), la dermis superficial y profunda (DS y DP), y el músculo cutáneo (MC). Se observan áreas de necrosis del epitelio, con abundantes detritus (flecha blanca). A la izquierda abajo, se observa un detalle de la epidermis y dermis superficial. Se observa engrosamiento de la epidermis (hiperqueratosis). La flecha azul indica una glándula sebácea. A la derecha se presenta otro detalle, donde se observa infiltración leucocitaria perivascular (flecha negra) entre el músculo y el tejido adiposo. La barra indica 100 μm .

A los 8 días post inyección, la reacción inflamatoria y de cuerpo extraño continuó similar a los 3 días, empezando a observarse la proliferación de tejido de granulación con angioblastos (formación de nuevos vasos sanguíneos) y, en ciertos casos, fibroblastos.

En la **Figura 4.50** se presentan microscopías ópticas de corte transversal de tejido afectado por la formulación F3, como ejemplo de lo que ocurre a los 8 días post inyección.

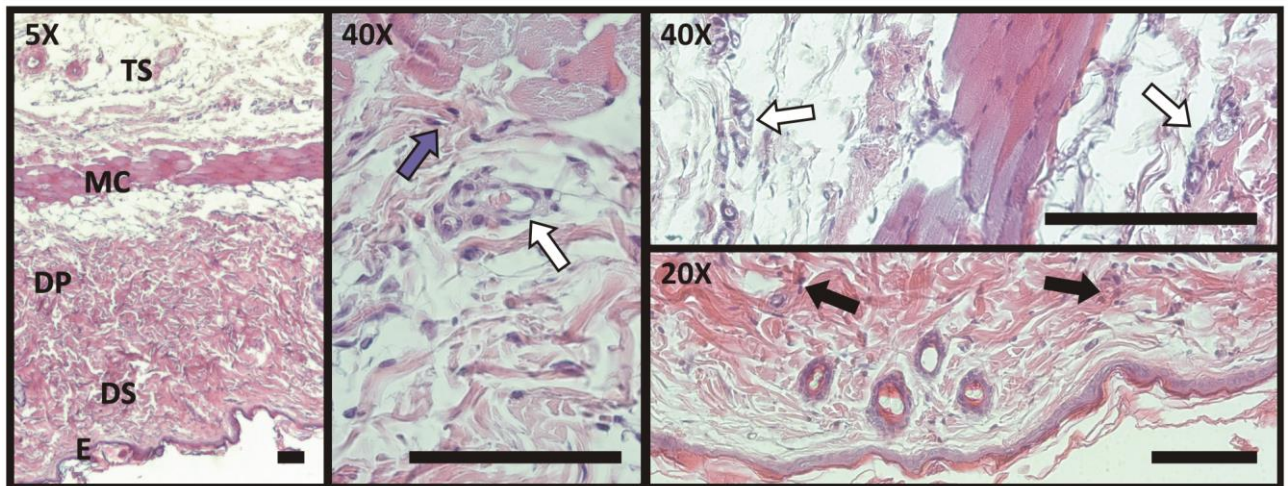


Figura 4.50. Corte transversal de piel de rata inyectada con F3, a los 8 días post inyección. A la izquierda están indicados la epidermis (E), la dermis superficial y profunda (DS y DP), el músculo cutáneo (MC), y el tejido conectivo subcutáneo (TS). Se indican vasos sanguíneos (con flechas blancas), fibroblastos (con flecha azul), e infiltrados leucocitarios (con flechas negras). Se observa leve engrosamiento de la epidermis, acumulación de líquidos en la dermis superficial, e infiltrados leucocitarios en el tejido conjuntivo. La barra indica 100 μm .

A los 12 días, los tejidos afectados presentan regiones con necrosis y detritus celulares, y otras con atrofia de la epidermis. Además de la infiltración leucocitaria perivascular, aparecen regiones con glóbulos rojos. La dermis se presenta sin lesiones, con algunos casos de desorden en las fibras colágenas de la capa dérmica profunda, y formación de nuevos vasos. Las lesiones, aunque reversibles, se encuentran en el orden $F3 > F4 > F1 \sim F2$. El proceso inflamatorio en los tejidos afectados por F3 es más marcado.

En la **Figura 4.51** se presentan microscopías ópticas de corte transversal de tejido afectado por la formulación F4, como ejemplo de lo que ocurre a los 12 días post inyección.

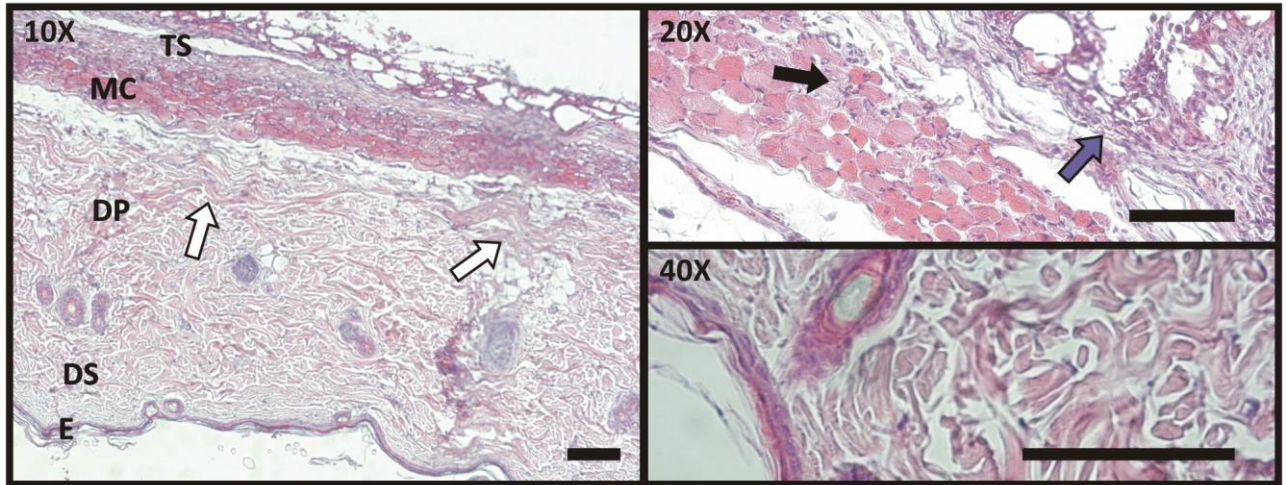


Figura 4.51. Corte transversal de piel de rata inyectada con F4, a los 12 días post inyección. A la izquierda están indicados la epidermis (E), la dermis superficial y profunda (DS y DP), el músculo cutáneo (MC), y el tejido conectivo subcutáneo (TS). Se observa desorden de colágeno en la dermis profunda (flechas blancas). A la derecha, se observa atrofia del epitelio y dermis sin lesiones, y músculo con infiltrados linfocitarios (flecha negra), inflamación del tejido conjuntivo, focos de exudado leucocitario, hemorragia y formación neovascular (flecha azul). La barra indica 100 μ m.

A los 18 días, en las secciones afectadas por los cuatro tejidos estudiados se presentan lesiones con inflamación del tejido conjuntivo y reacción granulomatosa de cuerpo extraño. Los tejidos presentan: focos de engrosamiento de la capa epidérmica; dermis sin lesiones, tejido conjuntivo con inflamación, presencia de glóbulos rojos, gran proliferación de vasos sanguíneos, material eosinofílico, fibrosis e infiltración adiposa, y, en algunos casos, presencia de granulomas con gran cantidad de macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño.

En la **Figura 4.52** se presentan microscopías ópticas de corte transversal de tejido afectado por la formulación F3, como ejemplo de lo que ocurre a los 18 días post inyección.

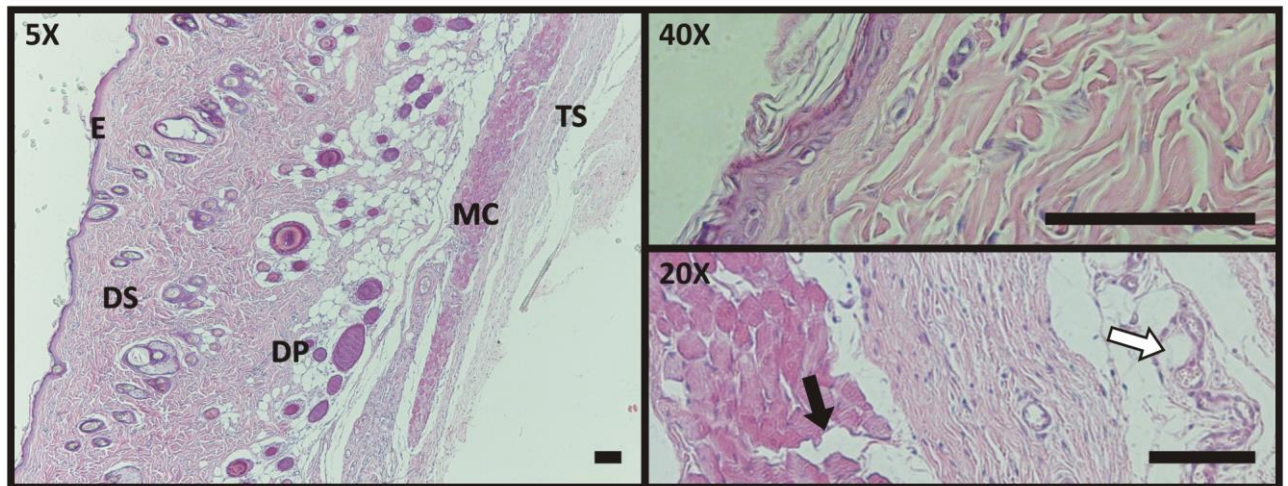


Figura 4.52. Corte transversal de piel de rata inyectada con F3, a los 18 días post inyección. A la izquierda están indicados la epidermis (E), la dermis superficial y profunda (DS y DP), el músculo cutáneo (MC), y el tejido conectivo subcutáneo (TS). A la derecha se observa: arriba, ligero engrosamiento de la epidermis y dermis sin lesiones; abajo, músculo con infiltración de adipocitos (flecha negra), proliferación de vasos sanguíneos (flecha blanca) y fibrosis en el tejido conjuntivo. La barra indica 100 μ m.

A los 22 días, los tejidos presentan atrofia del epitelio por sectores, y ligero engrosamiento, dermis superficial sin lesiones, con algunos focos de desorden de colágeno y escasos infiltrados leucocitarios, músculo subcutáneo y tejido conectivo subcutáneo inflamados, con presencia de abundantes glóbulos rojos, fibrosis y material eosinofílico. Las lesiones más significativas se corresponden con los tejidos inyectados con F3 y F4 (en el orden $F3 > F4$), que presentan mayor acumulación de líquidos, gran cantidad de tejido fibroso denso y proliferación vascular.

En la **Figura 4.53** se presentan microscopías ópticas de corte transversal de tejido afectado por la formulación F1, como ejemplo de lo que pasa a los 22 días post inyección.

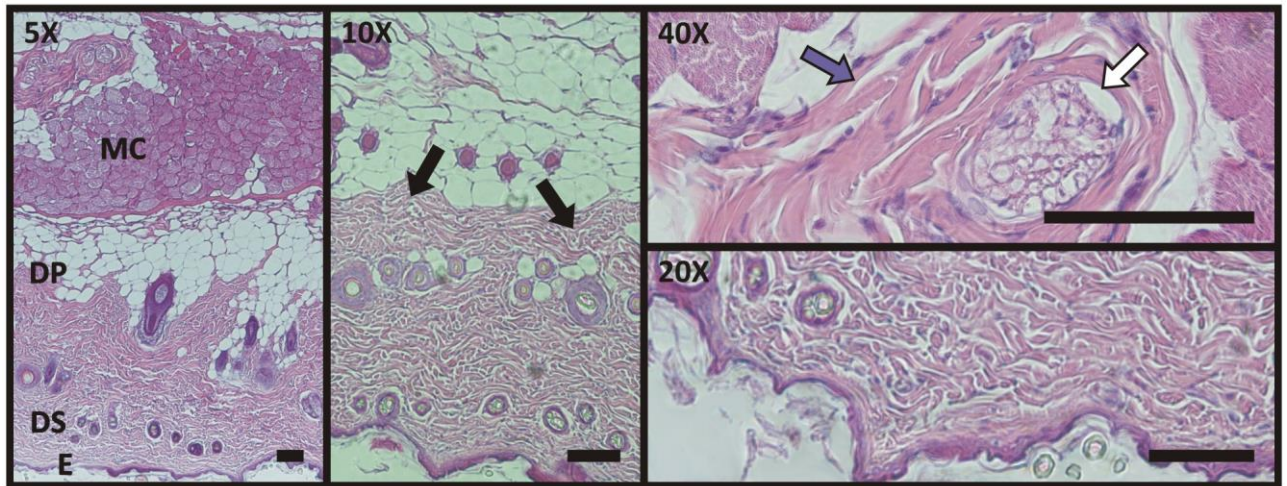


Figura 4.53. Corte transversal de piel de rata inyectada con F1, a los 22 días post inyección. En la foto de la izquierda están indicados la epidermis (E), la dermis superficial y profunda (DS y DP), y el músculo cutáneo (MC). Se observa reacción fibrosa alrededor de material eosinófilo en el músculo. En la foto central se encuentra marcado con flechas negras el desorden de colágeno. A la derecha arriba, reacción granulomatosa de cuerpo extraño en el músculo, con células gigantes (flecha blanca) y fibrosis (flecha azul). A la derecha abajo, se observa atrofia del epitelio por sectores. La barra indica 100 μm .

La respuesta observada en los tejidos fue, como se comentó anteriormente, una respuesta protectora a la presencia de los implantes, que buscó restaurar los tejidos lesionados, y de neutralizar la presencia del cuerpo extraño. La mayor respuesta inflamatoria de los tejidos afectados por la formulación F3, probablemente esté asociada a una mayor irritación a causa del sistema solvente conteniendo 2P. Sin embargo, el proceso inflamatorio observado en los tejidos estudiados es respuesta no sólo a la liberación de los solventes que, aunque son biocompatibles y utilizados en formulaciones de uso farmacéutico, generan cierto grado de irritación. Sino también a los ácidos liberados durante la degradación del polímero, proceso que dura hasta su completa erosión, y a la presencia en sí de la masa polimérica extraña en el tejido.

A pesar de las controversias que existen acerca del uso de DMSO para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, resultó ser el solvente que presentó los cuadros inflamatorios más leves a lo largo del ensayo, siendo el orden de gravedad de las lesiones $F3 > F4 > F2 \sim F1$. De todas maneras, las lesiones observadas en los tejidos son reversibles, y normales en un proceso de inflamación por presencia de cuerpo extraño. Se observó la formación de cápsula fibrosa, comúnmente reportada en la bibliografía en implantes, efecto generalmente indeseado en dispositivos de LCD, dado que actúa como barrera en la liberación del fármaco. Sin embargo, el aumento en la presencia de fibras colágenas se observó más cerca del final del ensayo, en respuesta a la lesión provocada por los implantes, y como un proceso de reparación fibrosa del tejido dañado.

Dado que la formulación que mayor irritación generó en estos ensayos fue F3, se estudió el efecto radiográfico de la mezcla de solventes de ésta formulación 2P:DMSO 50:50 sobre la arteria femoral de cerdos. Para esto, se realizaron inyecciones directas de 400 μL de esta mezcla solvente en la arteria femoral de cerdos, a una velocidad lenta (90 s), como se detalla en la **Sección 3.2.30**. En la **Figura 4.54** se presentan las radiografías durante la inyección de líquido de contraste, a los 3 min de la inyección de solución fisiológica como control, a los 3 y a los 5 min de la inyección de la mezcla solvente correspondiente a F3 (**a**, **b**, y **c**, respectivamente).

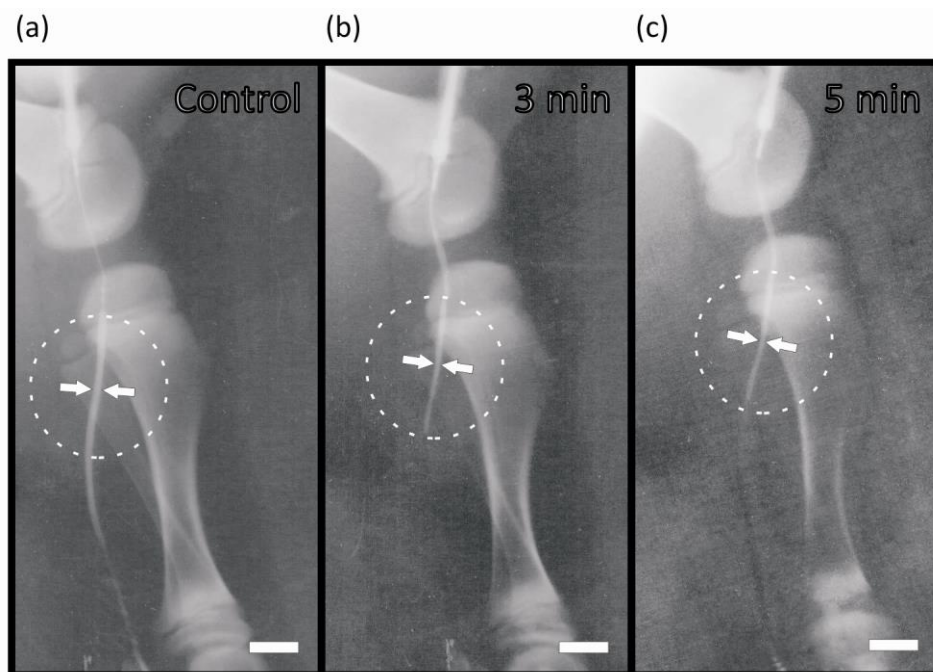


Figura 4.54. Radiografías de arteria femoral de cerdos durante la inyección de líquido de contraste, a) a los 3 min de la inyección de solución fisiológica, b) a los 3 min y c) a los 5 min de la inyección de 2P:DMSO (50:50). El círculo punteado indica la zona analizada. Las flechas indican el diámetro arterial. La barra indica 2 cm.

A los 3 min de la infusión de solución fisiológica, las placas radiográficas no documentaron ningún cambio en el diámetro de la arteria femoral estudiada. Sin embargo, luego de la infusión de la mezcla solvente estudiada, se identificó estrechamiento del calibre arterial (vasoespasma) de las arterias estudiadas, de grado 2 a los 3 min (38%) y de grado 1 a los 5 min (26%) (comparar la **Figura 4.54 a** con la **b** y la **c**), indicando vasoespasmos transientes, que probablemente se hayan terminado de resolver completamente luego de unos minutos. En la bibliografía, se encuentra reportado que una inyección lenta de DMSO (500 μL en 90 s), genera a los 3 min post inyección un vasoespasma promedio de 1,5 grados, y una recuperación total a los 10 minutos, en arteria de la rete mirabile de cerdos (Chaloupka y col., 1999). Comparando los resultados obtenidos con los

obtenidos por Chaloupka, podemos pensar que la mezcla solvente investigada tendría un comportamiento similar al de DMSO puro, indicando que la 2P, solvente que presentó la reacción inflamatoria más marcada en los estudios histopatológicos, no genera perturbaciones significativas en el vaso. Esto resulta en una prueba más a favor del uso de solventes alternativos, al menos en la vía vascular.

Que el sistema solvente de F3 haya presentado bajo grado de vasoespasmó con buena recuperación, nos alentó a seguir trabajando con esta formulación como material embolizante, para realizar ensayos en animales de experimentación. Se realizaron inyecciones de formulación polimérica en la arteria femoral de cerdos, ejerciendo presión corriente arriba de la inyección, de manera de provocar la precipitación cercana a la zona inyectada, como se detalla en la **Sección 3.2.31**.

La **Figura 4.55** presenta las radiografías con inyección de líquido de contraste previo, a los 15 min y a los 5 días de la inyección de la formulación polimérica (**a**, **b** y **c**, respectivamente).

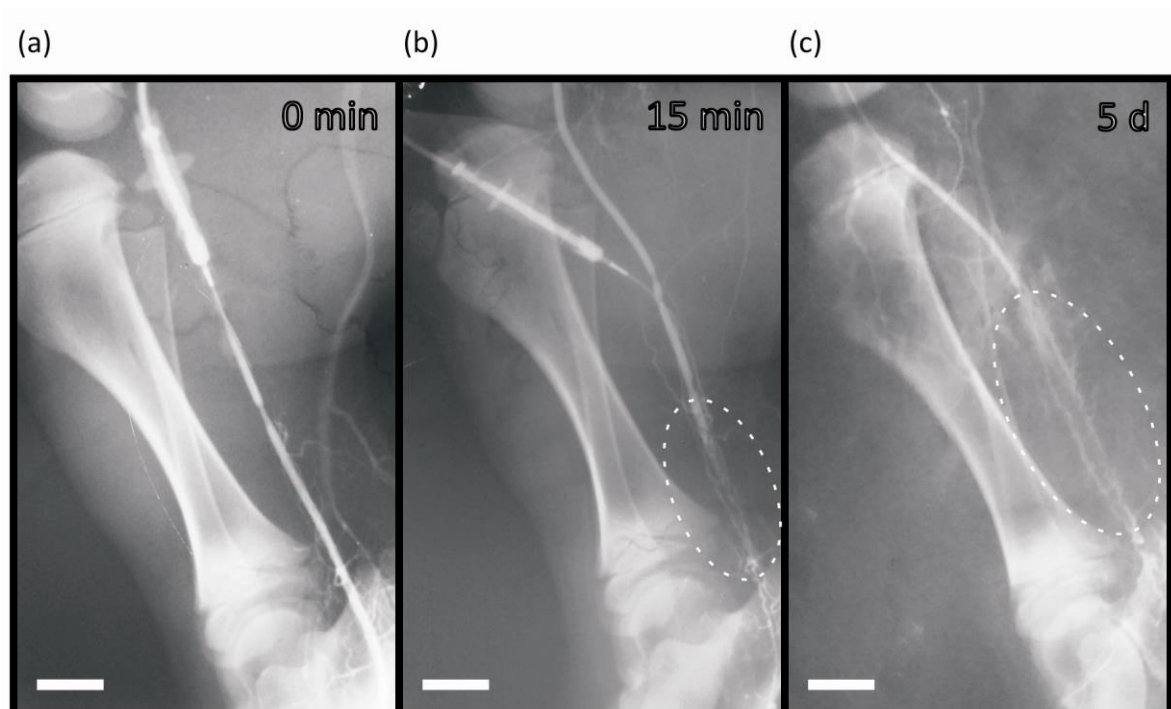


Figura 4.55. Radiografías de arteria femoral de cerdos durante la inyección de líquido de contraste, a) previo a la inyección, b) a los 15 min y c) a los 5 días de la inyección de F3. El círculo punteado indica la zona embolizada en la figura (b) y el trombo formado en la figura (c). La barra indica 2 cm.

Como se puede observar en las radiografías, a los 15 min posteriores a la inyección de la solución polimérica, se formó a los 4,4 cm de la punción de la arteria, una oclusión de 4,5 cm de longitud. Al

inyectar el líquido de contraste en la vía ocluída, se observa flujo retrógado (corriente arriba del sitio de punción) y el paso de líquido de contraste por arteriolas anexas, las que probablemente aseguren la irrigación sanguínea a la extremidad del animal. Otra observación que es importante realizar, es que, la precipitación del polímero ocurre corriente abajo del sitio de inyección. Esto permitiría que la inyección de la solución se realice “bajo flujo”. Este concepto se refiere a que la embolización ocurra distal respecto de la punta del catéter. Esto probablemente ocurra dado que la precipitación del polímero no ocurre de manera explosiva en esta formulación, como se estudio en la **Sección 4.1**. A los 5 días post inyección (**Figura 4.55 a**), la oclusión ocupa una mayor proporción de la arteria (6,5 cm), siendo esta extensión hacia arriba del émbolo formado inicialmente. Los primeros centímetros de esta oclusión, presentan leve radiopacidad debida al líquido de contraste, indicando cierta permeabilidad. Esta extensión del coágulo ocurre minutos posteriores a la inyección (observado en radiografías tomadas a los 22 min post inyección, no mostrado), y probablemente se deba a la acumulación de material biológico, formando parte del trombo.

A los 16 y 25 días no se tomaron placas radiográficas con infusión de líquido de contraste. Pero macroscópicamente se observó en la región afectada una importante circulación colateral, con formación de neovasculatura. La arteria embolizada conservaba pulso corriente arriba y corriente abajo del polímero, aunque más débil que el pulso normal de esa arteria, probablemente debido a la circulación sanguínea a través de los vasos colaterales formados.

La extremidad intervenida de todos los animales presentó una buena evolución clínica. Se observó un leve enrojecimiento e inflamación local que disminuyeron hasta ser prácticamente nulos a los 10 días de intervención. No se observó isquemia del tejido. Tampoco se observaron cambios en la conducta de los animales, ni malestar, presentando un crecimiento similar al de animales controles.

Las arterias embolizadas, se extrajeron, se fijaron y se incluyeron en parafina para su estudio histopatológico. Las fotomicrografías a 10X y a 40X de secciones transversales de las arterias a los 5, 15 y 26 días post intervención se presentan en la **Figura 4.56 a, b, y c**, respectivamente.

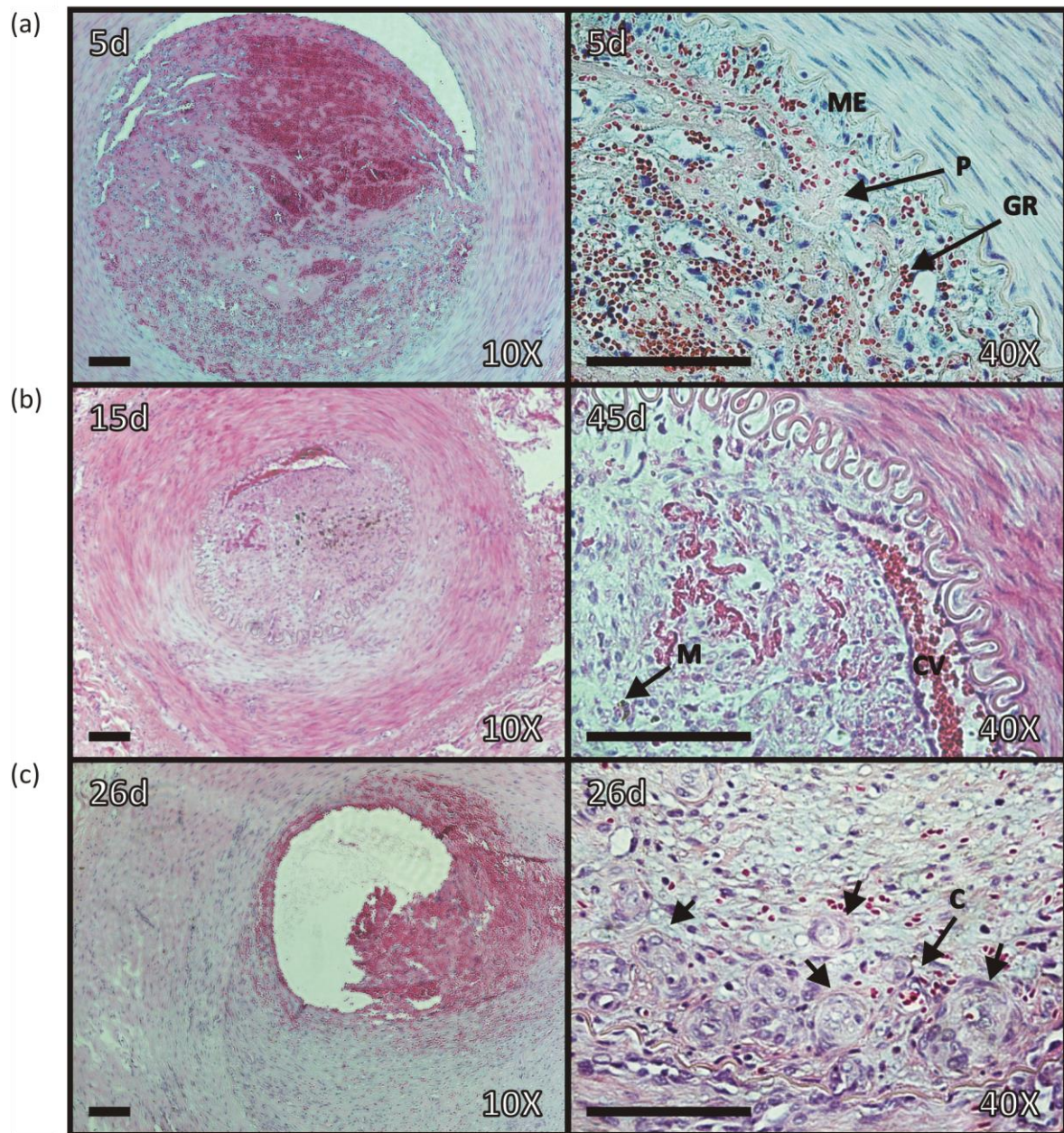


Figura 4.56. Sección transversal de arteria femoral de cerdo embolizada con la formulación F3, a los a) 5 días, b) 15 días, y c) 26 días post inyección. Fotomicrografías a a izquierda y a la derecha corresponden a los aumentos 10X y 40X, respectivamente. Con letras se indica: ME: membrana limitante interna o membrana elástica, GR: glóbulo rojo, P: material polimérico, CV: canal vascular, M: macrófago con hemosiderina, C: neocapilares. La barra indica 100 μm .

A los 5 días post intervención (**Figura 4.56 a**), la oclusión de la luz es prácticamente total, habiendo ocurrido la separación con la membrana interna limitante durante el procesamiento de la muestra (obsérvese la ausencia de glóbulos rojos). El trombo formado presenta gran cantidad de lagunas de glóbulos rojos entre el material polimérico. La membrana limitante interna presentó, en algunos sectores, una leve pérdida de su integridad, con un endotelio conservado.

Como se observa en la **Figura 4.56 b**, a los 15 días post intervención se evidencia la presencia de un canal vascular reducido (con glóbulos rojos en su interior), recubierto por endotelio. Comienza a aparecer tejido conectivo y de granulación, rico en fibras, indicador de una reorganización del trombo. También se observaron macrófagos con hemosiderina (de tonalidad oscura), indicadores de la reabsorción de coágulos por estas células del sistema inmune. El material polimérico se encuentra en menor proporción.

A los 26 días post intervención (**Figura 4.56 c**), el trombo formado por el material polimérico presenta la presencia de una canal vascular mayor. El resto de la luz se encuentra ocluída con un trombo más organizado, con abundante tejido de granulación con agregados de fibrina, y células endoteliales que forman pequeños capilares atravesando el trombo.

Si bien la reabsorción del coágulo no es total a los 26 días, la presencia de material polimérico es escasa sino nula por histología, indicando una completa o casi completa degradación del PLGA, resultado que está en concordancia con los de la **Sección 4.3**. El resto del trombo corresponde a material biológico (tejido conectivo y fibroso, glóbulos rojos, células linfocitarias), resultado de la organización del tejido en respuesta a la oclusión vascular. En unas semanas más, probablemente la vía se encuentre recanalizada, debido a una reabsorción total del trombo o reincorporación a la pared en forma de engrosamiento fibroso.

Por las observaciones clínicas de los animales intervenidos, junto con el estudio histopatológico realizado, donde no se observó proceso inflamatorio, y se evidenció un proceso normal de formación y recanalización de trombos, podemos decir que la formulación de PLGA estudiada resultó ser biocompatible a nivel endovascular. Es por estos resultados que decidimos realizar pruebas en animales de experimentación, utilizando la formulación F3 como formulación embolizante en riñones de conejos, como se detalla en la **Sección 3.2.32** de **Materiales y Métodos**.

Dependiendo de la penetrabilidad de las formulaciones, su aplicación. Así, por ejemplo, el uso de agentes embolizantes capaces de penetrar diámetros de arterias de hasta 700 micras, se utilizan comúnmente para el tratamiento de miomas uterinos (Dominguez y col., 2009). Además, se cree que el poder antitumorogénico de un agente embolizante también depende de su capacidad de penetración (Brown, 2004). Es por esta razón que decidimos investigar cuan distal la formulación F3 precipitaba, siendo esta cuestión dependiente tanto de factores propios de la circulación, como de factores intrínsecos del agente embolizante. Dentro de las características del agente embolizante que afectan su penetrabilidad, se encuentran la velocidad de precipitación y la viscosidad de la formulación. A menor viscosidad y a menor velocidad de precipitación, la solución

polimérica “navega más” desde la punta del catéter, pudiendo precipitar más profundo en el árbol arterial que se quiere embolizar. El límite está puesto en el paso del sistema arterial al venoso a través de las pequeñas arteriolas que conectan ambos sistemas.

Para estudiar la penetrabilidad de la formulación endovascular investigada en éste trabajo de tesis, se realizó la embolización en el riñón derecho de un conejo, utilizando como agente embolizante la formulación F3 cargada con TA en polvo como agente radiopaco al 30% (proporción elegida en la **Sección 4.1**). Como se puede observar en la **Figura 4.57 a**, previo a la embolización, una arteriografía celíaca de control, muestra todo el árbol vascular del riñón derecho. Luego de la embolización (**Figura 4.57 b**), sólo la arteria renal común se tiñe con líquido de contraste (se observa el corte a la entrada del riñón), mientras que la radiopacidad observada en el árbol renal es producto del TA de la formulación. Esto indica la oclusión completa del árbol vascular con la inyección bajo flujo de 500 μ L de F3 con TA al 30%. Durante la inyección, la proporción de TA adicionada a la formulación polimérica permitió un correcto monitoreo (no mostrado).

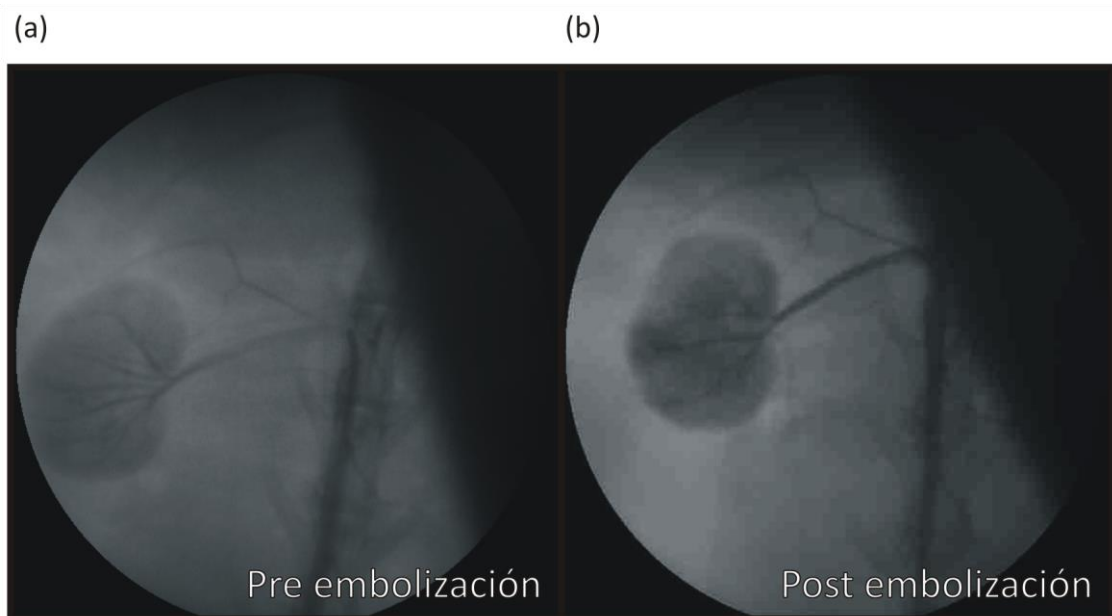


Figura 4.57. Imagen tomada de la arteriografía celíaca de control a) pre y b) post embolización de riñón derecho de conejo con la formulación F3 con TA al 30%.

La **Figura 4.58** presenta los riñones del conejo, extraídos 2 h luego de la intervención. Se puede observar como el riñón embolizado (derecha) presenta un color amarillento, producto de la anemia causada por la oclusión de la arteria renal.



Figura 4.58. Fotografía de riñón izquierdo (izquierda) y derecho (derecha) (embolizado), a las 2 h post-embolización. La barra indica 1 cm.

El riñón derecho se analizó por radiografía de tejido blando, para evaluar la distribución y penetración del material embolizante en las arterias renales (**Figura 4.59**).

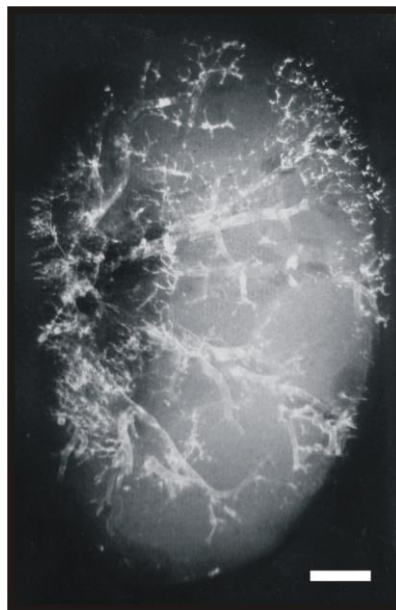


Figura 4.59. Radiografía de tejido blando de riñón derecho de conejo embolizado con la formulación F3 con TA al 30%. La barra indica 0,5 cm. Condiciones de exposición: 28 kV, 1 mseg

Se observa en la radiografía que el TA tiñe de manera continua el árbol arterial hasta la cuarta rama, y que, desde la cuarta rama hasta la periferia del riñón, la mayoría del material radiopaco se encuentra de manera fragmentada. El mínimo diámetro de arteria renal embolizada (periferia) fue 13 (1) μm , detectado por el análisis de fotografías de las radiografías de tejido blando, utilizando con un programa de procesamiento de imágenes.

Los cortes histológicos del riñón embolizado también evidenciaron la presencia de material embolizante en las arterias renales, como se muestra en la **Figura 4.60**, encontrándose también

con vasos de pequeño calibre (13-15 μm) embolizados con material radiopaco (foto superior derecha de la **Figura 4.60**).

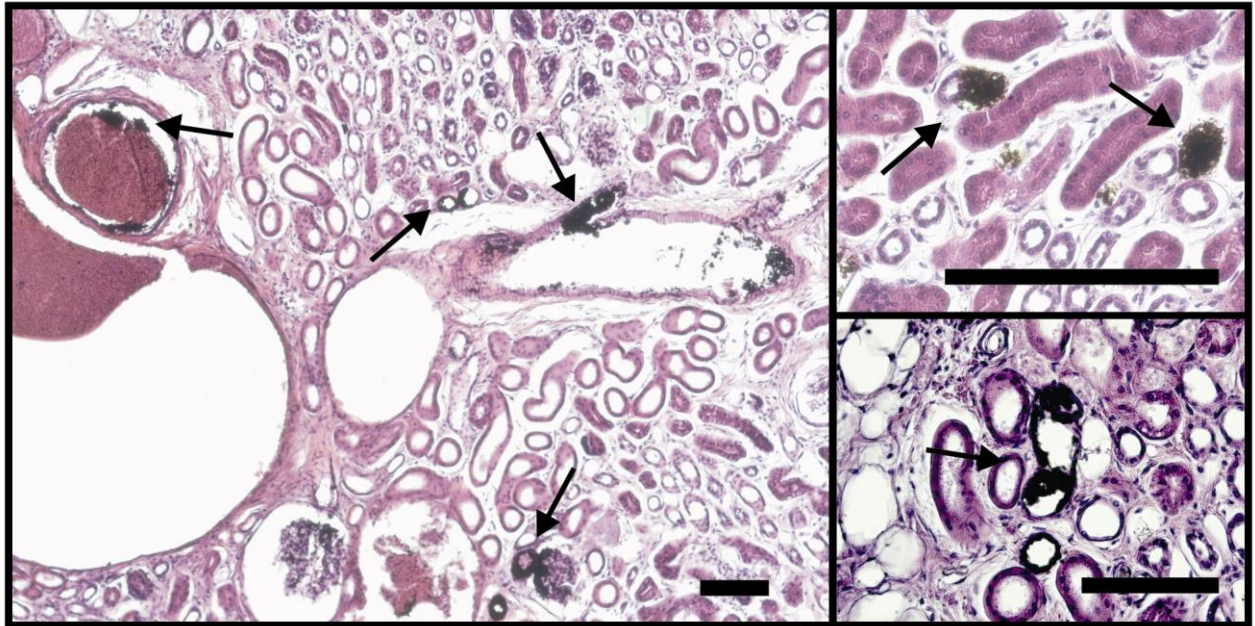


Figura 4.60. Sección transversal de riñón derecho de conejo embolizado con la formulación F3 con TA al 30%. La barra indica 100 μm .

Un punto importante a tener en cuenta cuando se trabaja con materiales embolizantes, es que el material depositado en una arteria no debe pasar al sistema venoso, porque si esto ocurre, existe un alto riesgo de producir un embolismo pulmonar, causante de muerte por paro respiratorio (Brown, 2004). De manera global, el riñón se encontró completamente cubierto de material radiopaco, desde la arteria renal común hasta la periferia. Es por esto que realizamos una radiografía de tejido blando de los pulmones de éste animal, para verificar ausencia de material radiopaco en los pulmones (**Figura 4.61**).



Figura 4.61. Radiografía de tejido blando de pulmón derecho (derecha) e izquierdo (izquierda) de conejo cuyo riñón derecho fue embolizado con la formulación F3 con TA al 30%. La barra indica 0,5 cm. Condiciones de exposición: 28 kV, 0,5 mseg

Como se puede observar, ambos pulmones presentaron restos de material radiopaco en la vena pulmonar, indicando que la formulación F3 traspasó al sistema venoso. Los cortes histológicos de pulmón también evidenciaron la presencia de material embolizante en las arterias pulmonares, como se muestra en la **Figura 4.61**.

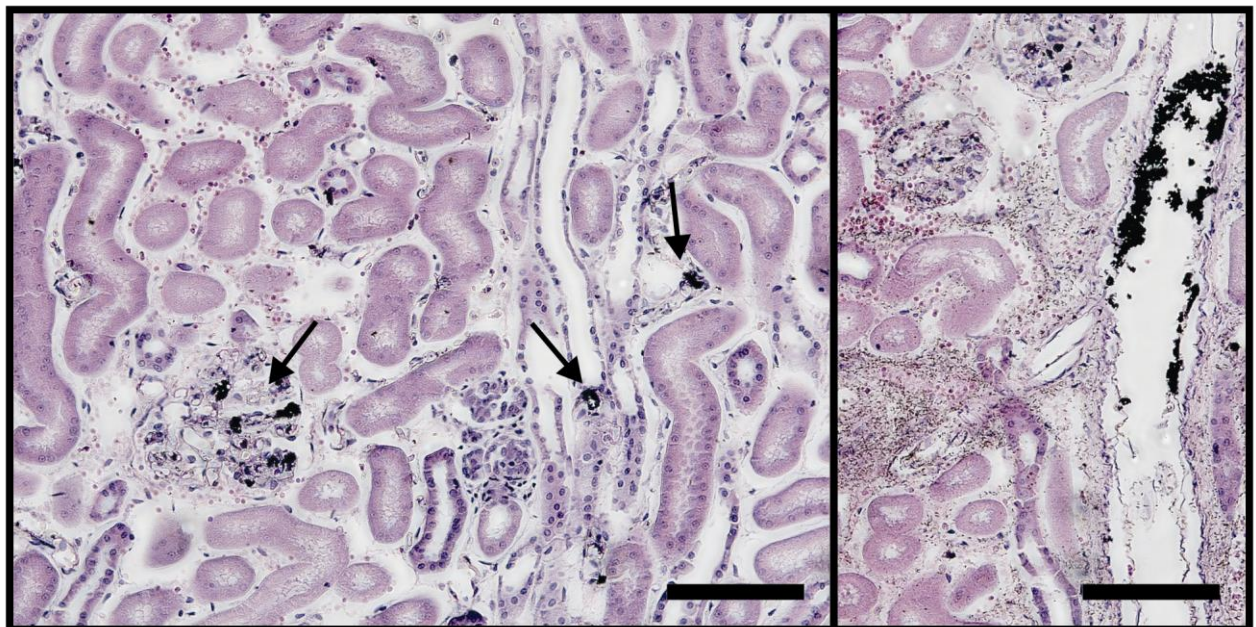


Figura 4.62. Corte transversal de pulmón izquierdo de conejo cuyo riñón derecho fue embolizado con la formulación F3 con TA al 30%. Las flechas indican material radiopaco. La barra indica 100 μ m

Se ha reportado el paso al sistema venoso de microesferas de 40-100 μ m de diámetro (Bonomo y col., 2010; Brown, 2004; Gupta y col., 2012). Por lo que la formulación F3 que, como vimos, emboliza arterias de hasta 13 μ m, tenía una alta probabilidad de alcanzar el sistema venoso. Este

resultado define la necesidad de ajustar los parámetros de las formulaciones para poder utilizarla como agente embolizante. Esto es, que la solución polimérica tenga una mayor velocidad de precipitación, para lo cual una alternativa sería aumentar la proporción de DMSO en la mezcla solvente. Como el DMSO disminuye la viscosidad de las formulaciones, podría ser necesario adicionar a la formulación un excipiente viscosante, tal como la PVP, investigada en la **Sección 4.1** de esta tesis.

4.6.3 Conclusiones

El estudio de la biocompatibilidad de los sistemas poliméricos, es un paso clave en el desarrollo de dispositivos para uso farmacéutico y/o biomédico. Es por esto que en esta sección hemos planteado, en primer lugar, el estudio de la biocompatibilidad de los implantes formados *in situ* investigados a lo largo de esta tesis. Alrededor de estos implante se observó la formación de una cápsula fibrosa, en respuesta a la reacción de cuerpo extraño. Sin embargo, el aumento de las fibras colágenas ocurrió cercano al final del ensayo, por lo que podría no intervenir en caso de utilizar estas formulaciones para la LCD. Las lesiones observadas en los tejidos afectados presentaron el orden F3>F4>F2~F1, pero en todos los casos reversibles. La respuesta inflamatoria protectora observada en el sitio de implantación, buscó restaurar los tejidos lesionados, y neutralizar la presencia del cuerpo extraño. Esta respuesta fue más pronunciada en F3, probablemente a causa de la 2P. Es por esto que decidimos evaluar el efecto radiográfico del sistema solvente 2P:DMSO 50:50, al parecer el más irritante, en arteria femoral de cerdos. Sorprendentemente, se observó vasoespasmo de bajo grado con buena recuperación. Este hecho, sumado a la necesidad de trabajar con formulaciones que no precipiten tan rápido como F1 y F2, de manera de poder realizar la inyección bajo flujo, en caso de utilizar la formulación para tratamientos embolizantes, es lo que nos llevó a continuar estudiando a la formulación F3 en el sistema vascular.

Primero, se evaluó la recanalización del vaso luego de una inyección de formulación polimérica, ejerciendo presión corriente arriba de la inyección, de manera de provocar la precipitación cercana a la zona inyectada. Así, se obtuvo una obstrucción que generó la formación de un trombo, con una evolución normal (aparición de tejido rico en fibras y tejido conectivo, formación de lagunas vasculares), que, a los 26 días ya no evidenciaba presencia de polímero, con una recanalización de aproximadamente 25%. Éste tiempo de recanalización se encuentra afectado no sólo por la degradación del polímero, sino también por la respuesta del organismo a dicho

polímero. Si el agente embolizante empleado es muy agresivo, puede generar un trombo fibroso en respuesta a ésta agresión, como es el caso de la embolización con etanol (Golzarian y col., 2006). La formulación estudiada, presentó una buena respuesta histopatológica, y un tiempo de degradación similar al observado en los implantes formados *in situ* en la subcutis de ratas (estudiado en la **Sección 4.3**).

Luego, se evaluó la penetrabilidad de F3 en el árbol arterial renal de un conejo. Se observó una completa embolización del riñón, siendo el mínimo diámetro de arterias embolizadas de 13 μm . El hecho de encontrar material embolizante en arterias de tan bajo calibre, nos llevó a evaluar que ocurrió en los pulmones, donde también se encontró material polimérico. Que la formulación F3 haya traspasado al sistema venoso, nos obliga a modificar parámetros de la formulación, en caso de utilizarla como agente embolizante.

Si bien los sistemas *in vitro* ayudan a definir algunas cuestiones relacionadas con el desarrollo de dispositivos biomédicos, es de importancia el estudio de la compatibilidad de los sistemas desarrollados, y del comportamiento del sistema en el medio circundante colocado. Para una aplicación subcutánea, por ejemplo, sería de interés el uso de formulaciones F1 ó F2, que presentaron la menor respuesta inflamatoria. Pero estas formulaciones por vía endovascular, producirían un embolo muy cerca de la punta del catéter, obligando a colocar el catéter lo más proximal posible al sitio de oclusión, e impidiendo una embolización distal. Resolver estos puntos a la hora de seleccionar los excipientes de una formulación es vital.

5 Conclusiones y Perspectivas Futuras

En los últimos 40 años, el uso de tecnologías para la liberación sitio-dirigida y controlada de drogas ha aumentado de manera sostenida, motorizado principalmente por los requerimientos de la clínica médica, atendiendo a una mejor efectividad y calidad del tratamiento de los pacientes. En el uso de estas terapias para el tratamiento del cáncer, esto tiene especial sentido, dado que las drogas antitumorogénicas ejercen su efecto carcinostático de igual manera sobre una célula tumoral como sobre una célula sana. Es por esto, que dirigir la droga a su sitio de acción y liberarla de manera controlada, asegura un efecto farmacológico óptimo y al mismo tiempo, una disminución en los efectos adversos de la droga.

La tecnología de solidificación *in situ* a base de polímeros biodegradables en el desarrollo de dispositivos de LCD ha atraído un especial interés ya que permite la colocación de dispositivos sólidos liberadores sin la necesidad de realizar una cirugía, y sin la necesidad de extraer el dispositivo luego de la terapia. En el tratamiento del cáncer, se puede así realizar terapias intratumorales (esto es, implantes intratumorales) o terapias locorregionales, tales como implantes formados en la región que contiene al tumor, en la zona de tejido conectivo que lo rodea o, como vimos en esta tesis, directamente como un émbolo en las arterias que lo irrigan (quimioembolización). El desarrollo de dispositivos para este último tratamiento pero sin carga de droga (embolización) también es de interés, dado que la oclusión de la arteria genera isquemia y muerte de las células tumorales irrigadas por el vaso ocluído. Que el material embolizante sea degradable, y conocer los tiempos de recanalización de las vías embolizadas es de especial interés para la repetición de la terapia.

En el presente trabajo de tesis, el poli(D,L-lactido-co-glicolido) fue seleccionado como matriz polimérica para el estudio de estas tecnologías, por su reconocida trayectoria en otras vías parenterales.

Un punto importante en el desarrollo de estos dispositivos inyectables es la viscosidad, que define la inyectabilidad de las soluciones poliméricas. De los datos recopilados de la literatura, se definió un rango de trabajo de 50-160 cP. En base a este rango, se seleccionaron cuatro formulaciones: i) conteniendo dos cargas distintas de polímero utilizando solvente puro DMSO, PLGA40 (F1) y PLGA30 (F2), ii) conteniendo una mezcla de DMSO con 2P ó TR como cosolventes en relación 50:50, PLGA30/2P50 (F3) y PLGA30/TR50 (F4). Se estudió el perfil de liberación de los solventes de estas cuatro formulaciones, como una medida de la velocidad del proceso de inversión de fases. Las formulaciones presentaron velocidades de liberación de solvente en el orden F2>F1>F3>>F4.

Por lo que mezclar el solvente DMSO con cosolventes como la 2P y la TR permite otorgarle características diferenciales a la formulación, sin comprometer su inyectabilidad.

En cuanto a la morfología de los implantes formados *in vitro*, hubo una diferenciación clara entre F1-3 y F4: mientras que F1-3 presentaron matrices más cerradas con poros de diferentes tamaños en toda su sección, F4 presentó una matriz abierta, con pliegues y regiones huecas. El centro de las matrices más cerradas presentó un efecto autocatalítico, más evidente en F1 y F2, que en F3. Mientras que F4, al tener una estructura más abierta, no presentó este efecto por permitir la difusión de los productos ácidos de degradación. *In vivo*, la morfología de los implantes es similar a la observada *in vitro*, pero más compacta, a causa de la presión ejercida por los tejidos circundantes y la tensión mecánica debido a los movimientos del animal, y con presencia de canales, por donde probablemente circulan los líquidos fisiológicos. Estos implantes no evidenciaron un efecto autocatalítico del tipo centro/coraza.

Las características morfológicas iniciales, y la evolución morfológica de los implantes estudiados *in vitro* permitirían pensar en perfiles de degradación/erosión en el orden $F4 < F3 \leq F2 \approx F1$. Sin embargo, los resultados fueron contrarios ($F4 > F3 \geq F2 \approx F1$). Si bien las diferencias observadas en la evolución de la masa remanente, la DPM y el peso molecular, tuvo sus orígenes en el tipo de solvente utilizado, la explicación encontrada fue más bien química que morfológica. En el caso de F4, la acción del ácido acético, producto de degradación de la TR, podría estar catalizando de manera preferencial la hidrólisis de las cadenas poliméricas más largas. De este modo, el pool de cadenas disponibles para la hidrólisis es de menor PM, acelerando así la formación de oligómeros capaces de desprenderse de la matriz, lo que termina resultando en una cinética de erosión mayor. El solvente prótico polar 2P contenido en F3, por su parte, probablemente forme puentes hidrógeno con las cadenas poliméricas, facilitando así la llegada del agua y posterior hidrólisis. Sin embargo, el perfil de peso molecular más pronunciado no resultó en cambios en la erosión.

La degradación y erosión de los implantes *in vivo* no se vio afectada ni por las características morfológicas de la matriz, ni por el origen químico de los solventes que componían las formulaciones. Sumado a esto, la completa erosión de estos implantes culminó en un tiempo 2,5 menor que las formulaciones incubadas *in vitro*, con perfiles de peso molecular sin plateau, y con valores de peso molecular finales mucho menores. Las matrices presentaron durante su degradación *in vivo* la formación de gran cantidad de nuevos poros, indicando un proceso degradativo marcado, a diferencia de lo que ocurrió *in vitro*, dónde ocurrió un aumento del tamaño de los poros ya existentes (proceso erosivo). Estos resultados experimentales indican la

importancia de los procesos biológicos en la degradación de los implantes y muestran claramente que una correlación *in vitro-in vivo* no es sencilla.

El estudio de la degradación de dispositivos de PLGA sin problemas difusionales, como son las microesferas de diámetro menor a 10 μm ayudaron a elucidar algunos aspectos del proceso de degradación autocatalítica de implantes F1. Se encontró una relación entre el patrón de DPM con un comportamiento temporo-espacial del implante asociado a su vez con el pH del medio circundante, caracterizado por dos fases bien diferenciadas. Primero, a pH ácido causado por los productos de degradación, la degradación se encuentra gobernada por un proceso autocatalítico en el centro del implante. Luego, la pared del implante pierde su integridad permitiendo el escape de los productos ácidos. Así, el implante se encuentra rodeado por medio regulado a pH fisiológico, el cual regula la degradación no catalizada de tipo superficial. Habitualmente, en la bibliografía reportan degradación *bulk* del PLGA, y no superficial. Estos resultados probablemente se deban al estricto control que hicimos del pH del medio. Hemos encontrado en la literatura un solo trabajo que llega a resultados similares con dispositivos tipo *scaffolds* a partir de un PLGA diferente.

La adición de droga hidrofóbica PTX aumenta el tiempo de vida media de los implantes *in vitro* unas cuatro veces, independientemente de la carga de droga utilizada. Este punto es importante tenerlo en cuenta en el desarrollo de dispositivos de liberación controlada, dado que la elección inicial del polímero se hizo en base a la corta vida media del PLGA 502 H. El entrapamiento de PTX fue del 100% en todos los implantes, debido a la preferencia de la droga por permanecer dentro de la matriz polimérica hidrofóbica. Esta droga cambió las características de la matriz, aumentándole la hidrofobicidad de manera tal que los implantes sufrieron una erosión por los bordes, a excepción de los implantes conteniendo TR, que por generar matrices más abiertas, facilita el ingreso de agua a toda la matriz, y la posterior hidrólisis de las cadenas poliméricas. Al cargar las formulaciones con PTX 10% p/p de PLGA, los perfiles de liberación de droga varían con el sistema solvente utilizado, lo que permitirían modular la liberación de la droga de acuerdo al requerimiento farmacológico. En cambio, al utilizar una alta carga de droga, como PTX 40% p/p de PLGA, se suprime el efecto del sistema solvente, siendo la erosión de la matriz altamente hidrofóbica la que gobierna la liberación, obteniendo cinéticas de liberación de orden cero similar en los cuatro implantes. Este tipo de perfil es deseado en muchos programas de dosificación de fármacos, evitando efectos explosivos iniciales, y con una liberación constante hasta el vaciamiento del dispositivo.

Si bien los sistemas *in vitro* ayudan a definir algunas cuestiones relacionadas con el desarrollo de dispositivos biomédicos, es de importancia el estudio de la compatibilidad de los sistemas desarrollados, y del comportamiento del sistema en el medio circundante colocado.

En este trabajo de tesis encontramos que, para una aplicación subcutánea, sería de interés el uso de formulaciones F1 ó F2, que presentaron la menor respuesta inflamatoria, si bien en todos los casos los procesos fueron reversibles.

Sin embargo, la inyección en arteria femoral de cerdos de solvente DMSO:2P resultó en un bajo grado de vasoespasmó y en una recuperación rápida, resultados alentadores y similares a los encontrados para DMSO en la bibliografía. Esto nos llevó a estudiar en el mismo modelo, la recanalización de la arteria embolizada con F3. Los émbolos formados dieron lugar a un proceso de formación de trombo típico, y a una recanalización gradual del 10% a los 15 días y 25% a los 26 días de la intervención. Estos resultados son alentadores para el uso de este polímero en formulaciones embolizantes/quimioembolizantes para el tratamiento de cáncer y la repetición de la terapia.

Para el estudio de formulaciones como material embolizante se seleccionó el conejo como modelo animal, dado su fácil manipulación y mantenimiento, y se determinaron las condiciones óptimas para los ensayos. Se pusieron a punto en este modelo, protocolos de embolización para la realización de ensayos de penetrabilidad.

La formulación probada para dicho fin resultó demasiado fluida, no logrando precipitar antes de pasar al sistema venoso, dado que se encontraron restos de material radiopaco en los pulmones del animal embolizado. Para el uso de esta formulación en terapias embolizantes, es necesaria la modificación de los excipientes que la componen para lograr una precipitación bajo flujo, pero no tan lenta, ya sea aumentando la proporción de DMSO, o utilizando otro co-solvente u otro sistema solvente.

Como perspectivas futuras, se propone la realización de ensayos de liberación *in vivo* de PTX en los sistemas de LCD propuestos para tratamiento de cáncer (implantes locoregionales, intratumorales, o para quimioembolización), para poder correlacionar los perfiles de liberación *in vitro* versus *in vivo*. Por otro lado, se propone la reformulación de la solución polimérica inyectable para su uso en terapias embolizantes, primeramente probando disminuir la proporción de co-solvente 2P en la formulación F3, con la cual ya tenemos experiencia. En caso de que se logre de esta manera realizar una embolización exitosa, se llevarán a cabo protocolos de embolización en

conejos, de manera de estudiar la recanalización del vaso en el modelo final, para evaluar si con el polímero así formulado se puede repetir la terapia a los 30-40 días. Finalmente, se plantea la realización de ensayos preclínicos en animales, de los implantes formado *in situ* como agente embolizante, según las normas de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

Anexos

Anexo 1. Cuantificación de DMSO, 2P Y TR por HPLC

Los parámetros de la técnica analítica utilizada se detallan en la **Tabla A1.1** y **A1.2**. La misma se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu, integrado por tres bombas (LC-10AS), un horno de columna (CTO-10A), un detector de arreglo de diodos UV-visible (SPD-M10Avp), un módulo de comunicación CBM-10 y un software para el procesamiento de los espectros (Class-LC10).

Tabla A1.1 Configuración del cromatógrafo para cuantificación de DMSO y 2P por HPLC

Columna	ZORBAX Eclipse XDB (Agilent)
Relleno	C18
Longitud	250 mm
Diámetro interno	4,6 mm
Tamaño de partícula	5 µm
Tamaño de poro	80 Å
Detector	UV – Arreglo de diodos
Longitud de onda utilizada	220 nm
Temperatura del horno	30 °C
Fase móvil	ACN:25 mM:Buffer fosfato de sodio pH 7,4 (10:90, v/v)
Flujo	0,8 mL/min
Tipo de inyección	Manual
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	7,0 min
Tiempo de elución DMSO	3,0 min
Tiempo de elución 2P	4,0 min

Técnica adaptada de Kranz y Bodmeier (Kranz y Bodmeier, 2008).

Curva de calibrado de DMSO, 2P Y TR

Soluciones de concentraciones conocidas de DMSO, 2P y TR en PBS se utilizaron para generar las curvas de calibrado (CC). Dichas curvas presentaron una dependencia lineal entre la concentración y el área bajo la curva (AUC, del inglés *Area Under the Curve*) con un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0,99. Para cada compuesto se presenta el tiempo de elución en la **Tabla A1.1** y **A1.2**, y el rango de concentración evaluado, el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) en la **Tabla A1.3**.

Tabla A1.2 Configuración del cromatógrafo para cuantificación de DMSO y TR por HPLC

Columna	ZORBAX Eclipse XDB (Agilent)
Relleno	C18
Longitud	150 mm
Diámetro interno	4,6 mm
Tamaño de partícula	5 µm
Tamaño de poro	80 Å
Detector	UV – Arreglo de diodos
Longitud de onda utilizada	220 nm
Temperatura del horno	30 °C
Fase móvil	ACN:agua-dd (30:70, v/v) con TFA 0,1 %
Flujo	0,8 mL/min
Tipo de inyección	Manual
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	8 min
Tiempo de elución DMSO	1,7 min
Tiempo de elución TR	4,9 min

Técnica desarrollada en el laboratorio de Química Fina.

Tabla A1.3 Rangos y límites para la cuantificación de DMSO, 2P y TR por HPLC

Rango	CC DMSO:2P		CC DMSO:TR	
	DMSO	5-1000 ppm	DMSO	25-600 ppm
2P	20-1000 ppm	TR	100-5000 ppm	
Límite de detección	DMSO	0,45 ppm	DMSO	0,7 ppm
	2P	0,73 ppm	TR	1,3 ppm
Límite de cuantificación	DMSO	1,4 ppm	DMSO	2,0 ppm
	2P	2,2 ppm	TR	4,0 ppm

Anexo 2. Cuantificación de DMSO, 2P Y TR por GC

Los parámetros de la técnica analítica utilizada se detallan en la **Tabla A2.1**. La misma se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso Agilent 6890N (Technologies System) con detector de ionización de llama (FID, del inglés: *Flame Ionization Detector*).

Tabla A2.1 Configuración del cromatógrafo para cuantificación de DMSO, 2P y TR por GC

Columna	HP-5, J&W Scientific, (Agilent)
Relleno	5% fenil 95% dimetilpolisiloxano
Longitud	30 m
Diámetro interno	0,32 mm
df	0,25 µm
Detector	FID
Temperatura utilizada	300 °C
Temperatura del horno	100 °C (por 3 min)
Rampa	15 °C/min
Temperatura final	280 °C
Gas carrier	Nitrógeno
Flujo	2 mL/min
Modo de análisis	Split
Relación	20:1
Tipo de inyección	Automática
Volumen de inyección	2 µL
Tiempo de corrida	15 min
Tiempo de retención DMSO	2 min
Tiempo de retención 2P	3,85 min
Tiempo de retención TR	6,9 min
Rango CC	
DMSO	0,23-4,55 µg
2P	0,21-4,29 µg
TR	0,23-4,61 µg

Técnica desarrollada en el laboratorio de Química Fina.

Curva de calibrado de DMSO, 2P Y TR

Soluciones de concentraciones conocidas de DMSO, 2P y TR en DCM se utilizaron para generar las curvas de calibrado. Dichas curvas presentaron una dependencia lineal entre la concentración y el

AUC con un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0,99. El tiempo de retención y el rango de la CC evaluado para cada compuesto se especifica en la **Tabla A2.1**.

Anexo 3. Cuantificación de AL y AG por HPLC

Las cantidades de AL y AG en los hidrolizados se cuantificaron por HPLC, utilizando una adaptación de la técnica reportada por Yoo y colaboradores (Yoo y col., 2005b). Los parámetros de la técnica analítica se detallan en la **Tabla A3.1**. La misma se llevó a cabo en el cromatógrafo que se describe en el **Anexo 1**.

Tabla A3.1. Configuración del cromatógrafo para cuantificación de AL y AG por HPLC

Columna	SPHERISORB ODS2 (Waters)
Longitud	150 mm
Relleno	ODS(C18)
Tamaño de partícula	5 µm
Detector	UV – Arreglo de diodos
Longitud de onda utilizada	210 nm
Temperatura del horno	30 °C
Fase móvil	Buffer Fosfato 25 mM – pH 2,8
Flujo	0,5 mL/min
Tipo de inyección	Manual
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	15,0 min
Tiempo de elución AG	5,9 min
Tiempo de elución AL	8,3 min
Rango CC	
AL	25–550 ppm
AG	20-450 ppm

Técnica adaptada de Yoo y colaboradores (Yoo y col., 2005b).

Curva de calibrado de AL y AG

Se realizaron dos curvas de calibrado a partir de los correspondientes patrones de AL y AG. Soluciones concentradas de cada patrón fueron preparadas y sometidas al mismo tratamiento de hidrólisis que las muestras. Ambas curvas presentaron una dependencia lineal entre la concentración y el AUC con un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0,99. El tiempo de elución y el rango de concentración evaluado para cada compuesto se especifica en la **Tabla A3.1**.

Anexo 4. Determinación la distribución de peso molecular y pesos moleculares por SEC

El cromatógrafo (Waters Corp., bombas modelo 1525, inyector automático modelo 717 plus) fue configurado con una secuencia de 4 columnas de fraccionamiento (Waters Styragel, HR 0.5, HR 1, HR 2 y HR 3) y un detector acoplado de índice de refracción (RI, del inglés, *Refractive index*) (Waters, modelo 410). Los parámetros de la técnica analítica se detallan en la **Tabla A4.1**.

Tabla A4.1. Configuración del cromatógrafo para determinación del peso molecular del PLGA por SEC

Columnas	Water Styragel HR 0.5 HR1, HR2 y HR 3
Longitud	300 mm
Diámetro	7,8 mm
Tamaño de partícula	5 μ m
Detector	RI
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	THF
Flujo	1 mL/min
Tipo de inyección	Automática
Volumen de inyección	200 μ L
Concentración de la muestra (en THF)	2 mg/mL
Tiempo de corrida	45 min

Técnica desarrollada por el laboratorio de Polímeros.

Los cromatogramas de las muestras y de los estándares de calibración fueron directamente adquiridos con el software Breeze (Waters Corp.), y luego exportados para su procesamiento.

El sistema cromatográfico fue inicialmente calibrado con un set de 5 estándares de poliestireno (PS) (Shodex SM-105, Showa Denko), en un rango de pesos moleculares de 1200–55100 g/mol. Estos patrones se prepararon a una concentración nominal de 0,5 mg/mL. Del análisis de los correspondientes cromatogramas, se colectaron 5 pares de puntos (PM_{PS} , V_{PS}), donde PM_{PS} corresponde al pico del peso molecular de cada estándar de PS y V_{PS} es el correspondiente volumen de *elución* de los PM_{PS} .

Anexo 5. Cuantificación de PTX por HPLC

La determinación de PTX se realizó por HPLC, utilizando una adaptación de la técnica reportada por Dordunoo y colaboradores (Dordunoo y col., 1997). Los parámetros de la técnica analítica se detallan en la **Tabla A5.1**. La misma se llevó a cabo en un Cromatógrafo Shimadzu serie 20-A, integrado por dos bombas de elución de gradiente binario de alta presión (LC-20AT), sistema de elución de gradiente cuaternario a baja presión (serie 20A), inyector automático (SIL-20AHT), detector espectrofotométrico por batería de fotodiodos (SPD-M20A), controlador de sistema para HPLC (CBM-20A), horno de columnas de circulación forzada de aire (CTO-10AsVP), software de control y procesamiento de datos (LC Solution Ver 1.21 Multi-PDA).

Tabla A5.1. Configuración del cromatógrafo para la cuantificación de PTX por HPLC

Columna	Hichrom Ultrasphere
Longitud	250 mm
Relleno	ODS (C18)
Tamaño de partícula	5 μ m
Detector	UV – Arreglo de diodos
Longitud de onda utilizada	227 nm
Temperatura del horno	30 °C
Fase móvil	ACN:Metanol:Agua (64:11:25)
Flujo	1 mL/min
Tipo de inyección	Automática
Volumen de inyección	20 μ L
Tiempo de corrida	9,0 min
Tiempo de elución	3,7 min
Rango CC	
PTX en PBS-SDS	1–35 ppm
PTX en fase móvil	1–60 ppm

Técnica adaptada de Dordunoo y colaboradores (Dordunoo y col., 1997).

Con esta técnica de HPLC se corrieron soluciones acuosas de AL, AG, DMSO, 2P, TR y SDS y se corroboró de qué dichos analitos no interferían con el pico de PTX.

Curva de calibrado de PTX

Se realizaron dos curvas de calibrado de PTX, una de PTX en medio de liberación SDS-PBS y otra de PTX en fase móvil (ACN:Metanol:Agua 64:11:25). Se preparó una solución madre de PTX en metanol que se utilizó para preparar soluciones estándares de PTX en PBS-SDS y en fase móvil. Ambas curvas de calibrado presentaron una dependencia lineal entre la concentración y el AUC con un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0,99.. El tiempo de elución de PTX y el rango de concentración evaluado para cada CC se especifica en la **Tabla A5.1**.

Bibliografía

- Alexis, F. (2005) *Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]*. Polym. Int. 54(1): 36-46.
- Alexis, F., Venkatraman, S., Kumar Rath, S. y Gan, L.H. (2006) *Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters*. J. Appl. Polym. Sci. 102(4): 3111-3117.
- Ali, S.A.M., Doherty, P.J. y Williams, D.F. (1994) *Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility, in vivo*. Biomaterials 15(10): 779-785.
- Angelova, N. y Hunkeler, D. (1999) *Rationalizing the design of polymeric biomaterials*. Trends Biotechnol. 17(10): 409-421.
- Antheunis, H., Van der Meer, J.C., De Geus, M., Kingma, W. y Koning, C.E. (2009) *Improved mathematical model for the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters*. Macromolecules 42(7): 2462-2471.
- Astaneh, R., Erfan, M., Moghimi, H. y Mobedi, H. (2009) *Changes in morphology of in situ forming PLGA implant prepared by different polymer molecular weight and its effect on release behavior*. J. Pharm. Sci. 98(1): 135-145.
- Astaneh, R., Moghimi, H.R., Erfan, M. y Mobedi, H. (2006) *Formulation of an injectable implant for peptide delivery and mechanistic study of the effect of polymer molecular weight on its release behavior*. DARU J. Pharm. Sci. 14(2): 65-70.
- Athanasίου, K.A., Niederauer, G.G. y Agrawal, C.M. (1996) *Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers*. Biomaterials 17(2): 93-102.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G. y Ithakissios, D.S. (2002) *PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties*. J. Controlled Release 79(1-3): 123-135.
- Baek, N., Lee, J. y Park, K. (2004) *Aqueous N,N-diethylnicotinamide (DENA) solution as a medium for accelerated release study of paclitaxel*. J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 15(4): 527-542.
- Balla, V.K., Bodhak, S., Bose, S. y Bandyopadhyay, A. (2010) *Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and in vitro biological properties*. Acta Biomater. 6(8): 3349-3359.
- Bein, R.S. y Greff, R.J. (2004). *Compositions for use in embolizing blood vessels comprising high levels of contrast agent*. US patent N° 10,796,604.
- Bilbao, J.I., Martínez-Cuesta, A., Urtasun, F. y Cosín, O. (2006) *Complications of embolization*. Semin. Intervent. Radiol. 23(2): 126-142.
- Birnbaum, D.T. y Brannon-Peppas, L. (2003) *Molecular weight distribution changes during degradation and release of plga nanoparticles containing epirubicin hcl*. J. Biomater. Sci. 14: 87-102.
- Black, J. (1994) *Biologic performance of tantalum*. Clin. Mater. 16(3): 167-173.

- Blasi, P., D'Souza, S.S., Selmin, F. y DeLuca, P.P. (2005) *Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide)*. J. Controlled Release 108(1): 1-9.
- Bleiberg, B., Beers, T.R., Persson, M. y Miles, J.M. (1993) *Metabolism of triacetin-derived acetate in dogs*. Am. J. Clin. Nutr. 58(6): 908-911.
- Bonomo, G., Pedicini, V., Monfardini, L., Della Vigna, P., Poretti, D., Orgera, G. y Orsi, F. (2010) *Bland embolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma using precise, tightly size-calibrated, anti-inflammatory microparticles: first clinical experience and one-year*. Cardiovasc. Intervent. Radiol. 33(3): 552-559.
- Brodbeck, K.J., DesNoyer, J.R. y McHugh, A.J. (1999a) *Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery: Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer*. J. Controlled Release 62(3): 333-344.
- Brodbeck, K.J., Pushpala, S. y McHugh, A.J. (1999b) *Sustained release of human growth hormone from plga solution depots*. Pharm. Res. 16(12): 1825-1829.
- Brown, K.T. (2004) *Fatal pulmonary complications after arterial embolization with 40–120- μ m tris-acryl gelatin microspheres*. J. Vasc. Interv. Radiol. 15(2, Parte 1): 197-200.
- Bruix, J. y Sherman, M. (2005) *Management of hepatocellular carcinoma*. Hepatology 42(5): 1208-1236.
- Bühler, V. (2005) *Soluble polyvinylpyrrolidone (Povidone)*. En: *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals. povidone, crospovidone and copovidone*. Springer, Berlin, Alemania, p. 5-124.
- Burgess, D.J., Crommelin, D.J., Hussain, A.S. y Chen, M.L. (2004) *Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report*. AAPS J. 6(1): 100-111.
- Burgess, D.J., Hussain, A.S., Ingallinera, T.S. y Chen, M.L. (2002) *Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: AAPS workshop report, co-sponsored by FDA and USP*. Pharm. Res. 19(11): 1761-1768.
- Burkersroda, F.V., Gref, R. y Göpferich, A. (1997) *Erosion of biodegradable block copolymers made of poly(D,L-lactic acid) and poly(ethylene glycol)*. Biomaterials 18(24): 1599-1607.
- Burkersroda, F.V., Schedl, L. y Göpferich, A. (2002) *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*. Biomaterials 23(21): 4221-4231.
- Cai, Q., Shi, G., Bei, J. y Wang, S. (2003) *Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin*. Biomaterials 24(4): 629-638.
- CCAC *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (1998) Canada: Canadian Council on Animal Care (CCAC).
- Celada, A. (2013). *Inflamación*
http://inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=114:inflamacion&catid=50:inmunopatologia&Itemid=126

- Cleland, J.L. (2002) *Protein delivery from biodegradable microspheres*. En: *Protein Delivery. Physical Systems* (Eds.: Sanders, L. y Hendren, R.W.). Springer, Nueva York, Estados Unidos, p. 1-43.
- Coldwell, D.M., Stokes, K.R. y Yakes, W.F. (1994) *Embolotherapy: agents, clinical applications, and techniques*. *Radiographics* 14(3): 623-643.
- Comyn, J. (1985) *Introduction to polymer permeability and the mathematic of diffusion*. En: *Polymer permeability* (Eds.: Comyn, J.). Elsevier, Londres, Inglaterra, p. 1-11.
- Crawford, J., Dale, D.C. y Lyman, G.H. (2004) *Chemotherapy-induced neutropenia*. *Cancer* 100(2): 228-237.
- Chaloupka, J.C., Guglielmi, G. y Viñuela, F. (1993) *Direct thrombosis of aneurysms*. *J. Neurosurg.* 78(6): 1006-1008.
- Chaloupka, J.C., Huddle, D.C., Alderman, J., Fink, S., Hammond, R. y Vinters, H.V. (1999) *A reexamination of the angiotoxicity of superselective injection of DMSO in the swine rete embolization model*. *Am. J. Neuroradiol.* 20(3): 401-410.
- Chaubal, M.V. y Roseman, T.J. (2006) *Drug delivery trends for parenteral therapeutics*. *Pharm. Technol.* 30(10): 110.
- Chen, Y., Zhou, S. y Li, Q. (2011) *Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: Applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems*. *Acta Biomater.* 7(3): 1140-1149.
- Chiu, L.K., Chiu, W.J. y Cheng, Y.L. (1995) *Effects of polymer degradation on drug released - mechanistic study of morphology and transport properties in 50:50 poly(dl-lactide-co-glycolide)*. *Int. J. Pharm.* 126(1-2): 169-178.
- Cho, Y.W., Lee, J., Lee, S.C., Huh, K.M. y Park, K. (2004) *Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles*. *J. Controlled Release* 97(2): 249-257.
- Daniels, A.U., Chang, M.K.O., Andriano, K.P. y Heller, J. (1990) *Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone*. *J. Appl. Biomater.* 1(1): 57-78.
- Dånmark, S., Finne-Wistrand, A., Schander, K., Hakkarainen, M., Arvidson, K., Mustafa, K. y Albertsson, A.C. (2011) *In vitro and in vivo degradation profile of aliphatic polyesters subjected to electron beam sterilization*. *Acta Biomater.* 7(5): 2035-2046.
- De Vries, K.S. (1989). *Preparation of polylactic acid and copolymers of lactic acids*. US patent N° 4,797,468.
- Deng, M., Chen, G., Burkley, D., Zhou, J., Jamiolkowski, D., Xu, Y. y Vetrecin, R. (2008) *A study on in vitro degradation behavior of a poly(glycolide-co-l-lactide) monofilament*. *Acta Biomater.* 4(5): 1382-1391.

- Desai, K.G.H., Mallery, S.R. y Schwendeman, S.P. (2008) *Effect of formulation parameters on 2-methoxyestradiol release from injectable cylindrical poly(dl-lactide-co-glycolide) implants*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 70(1): 187-198.
- DesNoyer, J.R. y McHugh, A.J. (2001) *Role of crystallization in the phase inversion dynamics and protein release kinetics of injectable drug delivery systems*. J. Controlled Release 70(3): 285-294.
- Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M. y Vorstenbosch, C.V.D. (2001) *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J. Appl. Toxicol. 21(1): 15-23.
- Ding, A.G., Shenderova, A. y Schwendeman, S.P. (2006) *Prediction of microclimate pH in poly(lactic-co-glycolic acid) films*. J. Am. Chem. Soc. 128(16): 5384-5390.
- Dominguez, J., Sabrià, E., Giné, L., Alba, E., Sanchez, A. y Ponce, J. (2009) *Embolización de miomas uterinos*. Ginecol. Obstet. Clin. 10(1): 46-52.
- Dong, W.Y., Körber, M., López Esguerra, V. y Bodmeier, R. (2006) *Stability of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems*. J. Controlled Release 115(2): 158-167.
- Dordunoo, S.K., Oktaba, A.M.C., Hunter, W., Min, W., Cruz, T. y Burt, H.M. (1997) *Release of taxol from poly(ϵ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives*. J. Controlled Release 44(1): 87-94.
- Dowell, J.A., Sancho, A.R., Anand, D. y Wolf, W. (2000) *Noninvasive measurements for studying the tumoral pharmacokinetics of platinum anticancer drugs in solid tumors*. Adv. Drug Del. Rev. 41(1): 111-126.
- Dunn, R.L., English, J.P., Cowsar, D.R. y Vanderbilt, D.P. (1990). *Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same*. US patent N° 4,938,763.
- Dunn, R.L., Tipton, A.J., Southard, G.L. y Rogers, J.A. (1997). *Biodegradable polymer composition*. US patent N° 8,249,630.
- Dunne, M., Corrigan, O.I. y Ramtoola, Z. (2000) *Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles*. Biomaterials 21(16): 1659-1668.
- Edlund, U. y Albertsson, A.C. (2002) *Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery*. En: *Degradable Aliphatic Polyesters* (Eds.: Albertsson, A.C.). Springer, Berlin, Alemania, p. 67-112.
- El-Kareh, A.W. y Secomb, T.W. (2000) *A mathematical model for comparison of bolus injection, continuous infusion, and liposomal delivery of doxorubicin to tumor cells*. Neoplasia 2(4): 325-338.
- Eliaz, R.E. y Kost, J. (2000) *Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins*. J. Biomed. Mater. Res. 50(3): 388-396.
- Emerich, D., Snodgrass, P., Lafreniere, D., Dean, R., Salzberg, H., Marsh, J., Perdomo, B., Arastu, M., Winn, S. y Bartus, R. (2002) *Sustained release chemotherapeutic microspheres provide superior efficacy over systemic therapy and local bolus infusions*. Pharm. Res. 19(7): 1052-1060.

- Encyclopedic dictionary of polymers* (2^a ed. Vol. XXXII) 2010) (Eds.: Gooch, J.W.). Springer, 1237 pp.
- Engelberg, I. y Kohn, J. (1991) *Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study*. *Biomaterials* 12(3): 292-304.
- Faisant, N., Siepmann, J. y Benoit, J.P. (2002) *PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15(4): 355-366.
- FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms* (1997) Rockville, Maryland, Estado Unidos: Office of Training and Communications, Food and Drug Administration (FDA).
- Flandroy, P., Grandfils, C., Daenen, B., Snaps, F., Dondelinger, R.F., Jérôme, R., Bassleer, R. y Heinen, E. (1997) *In vivo behavior of poly(D,L)-lactide microspheres designed for chemoembolization*. *J. Controlled Release* 44(2-3): 153-170.
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M. y Axelsson, A. (2011) *The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review*. *Int. J. Pharm.* 415(1-2): 34-52.
- Fu, K., Pack, D.W., Klivanov, A.M. y Langer, R. (2000) *Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres*. *Pharm. Res.* 17(1): 100-106.
- García Mónaco, R. (2011). *Cáncer de hígado - Quimioembolización hepática* http://www.drgarciamonaco.com.ar/quimiembolizacion_hepat.php
- Gasparini, G., Holdich, R.G. y Kosvintsev, S.R. (2010) *PLGA particle production for water-soluble drug encapsulation: Degradation and release behaviour*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 75(2): 557-564.
- George, J. y Sastry, N.V. (2004) *Densities, viscosities, speeds of sound, and relative permittivities for water + cyclic amides (2-pyrrolidinone, 1-methyl-2-pyrrolidinone, and 1-vinyl-2-pyrrolidinone) at different temperatures*. *J. Chem. Eng. Data* 49(2): 235-242.
- Gillams, A.R. (2005) *Image guided tumour ablation*. *Cancer Imaging* 5: 103-109.
- Giunchedi, P., Conti, B., Scalia, S. y Conte, U. (1998) *In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination*. *J. Controlled Release* 56(1-3): 53-62.
- Goldberg, E.P., Hadba, A.R., Almond, B.A. y Marotta, J.S. (2002) *Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery*. *J. Pharm. Pharmacol.* 54(2): 159-180.
- Golzarian, J., Sapoval, M.R., Kundu, S., Hunter, D.W., Brountzos, E.N., Geschwind, J.-F.H., Murphy, T.P., Spies, J.B., Wallace, M.J., de Baere, T. y Cardella, J.F. (2010) *Guidelines for peripheral and visceral vascular embolization training: Joint Writing Groups of the Standards of Practice Committees for the Society of Interventional Radiology (SIR), Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe (CIRSE), and Canadian Interventional Radiology Association (CIRA)*. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 21(4): 436-441.

- Golzarian, J., Siskin, G.P., Sharafuddin, M.J., Mimura, H. y Coldwell, D.M. (2006) *Embolization Tools*. En: *Vascular Embolotherapy. A Comprehensive Approach* (Eds.: Golzarian, J., Sun, S. y Sharafuddin, M.J.). Springer, Berlin, Alemania, p. 15-33.
- Good Laboratory Practice for non Clinical Laboratory Studies* (No. 21-Part 58) (1997) Estados Unidos: Food and Drug Administration.
- Göpferich, A. (1996) *Mechanisms of polymer degradation and erosion*. *Biomaterials* 17(2): 103-114.
- Göpferich, A. (1997a) *Mechanisms of polymer degradation and elimination*. En: *Handbook of Biodegradable Polymers* (Eds.: Domb, A.J., Kost, J. y Wiseman, D.M.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda, p. 451-471.
- Göpferich, A. (1997b) *Polymer bulk erosion*. *Macromolecules* 30(9): 2598-2604.
- Göpferich, A. y Tessmar, J. (2002) *Polyanhydride degradation and erosion*. *Adv. Drug Del. Rev.* 54(7): 911-931.
- Goupil, D.W., Chaouk, H., Holland, T., Asfaw, B.T., Goodrich, S.D. y Latini, L. (2004). *Embolic compositions*. US patent N° 9,804,963.
- Gouw, I.R.T.H. y Vlugter, I.R.J.G. (1967) *Physical properties of triglycerides IV. Dielectric constant*. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 69(4): 223-226.
- Graham, P.D., Brodbeck, K.J. y McHugh, A.J. (1999) *Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery*. *J. Controlled Release* 58(2): 233-245.
- Greff, R.J. (2000). *Vascular embolizing compositions comprising ethyl lactate and methods for their use*. US patent N° 9,109,041.
- Greff, R.J., Jones, M.L. y Evans, S. (1998). *Compositions for use in embolizing blood vessels*. US patent N° 8,800,677.
- Grizzi, I., Garreau, H., Li, S. y Vert, M. (1995) *Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence*. *Biomaterials* 16(4): 305-311.
- Groot, W., Van Krieken, J., Sliemers, O. y De Vos, S. (2010) *Production and purification of lactic acid and lactide*. En: *Poly(Lactic Acid)* (Eds.: Auras, R., Taklim, L., Selke, S.M. y Tsuji, H.). John Wiley & Sons, Inc., Nueva Jersey, Estados Unidos, p. 1-18.
- Gu, S., Yang, M., Yu, T., Ren, T. y Ren, J. (2008) *Synthesis and characterization of biodegradable lactic acid-based polymers by chain extension*. *Polym. Int.* 57(8): 982-986.
- Gupta, S., Noor, A. y Twigg, H. (2012) *Hypoxic respiratory failure after transarterial embolization of hepatocellular carcinoma*. *Chest J.* 142(4): 1031A-1031A.
- Han, X. y Pan, J. (2011) *Polymer chain scission, oligomer production and diffusion: A two-scale model for degradation of bioresorbable polyesters*. *Acta Biomater.* 7(2): 538-547.

- Hausberger, A.G., Kenley, R.A. y DeLuca, P.P. (1995) *Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles*. Pharm. Res. 12(6): 851-856.
- Hetrick, E.M., Prichard, H.L., Klitzman, B. y Schoenfisch, M.H. (2007) *Reduced foreign body response at nitric oxide-releasing subcutaneous implants*. Biomaterials 28(31): 4571-4580.
- Holy, C.E., Dang, S.M., Davies, J.E. y Shoichet, M.S. (1999) *In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam*. Biomaterials 20(13): 1177-1185.
- Huang, X. y Brazel, C.S. (2001) *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. J. Controlled Release 73(2-3): 121-136.
- Hunter, W.L., Machan, L.S. y Arsenault, A.L. (1998). *Anti-angiogenic compositions and methods of use*. US patent N° 5,716,981.
- Hussain, S.A., Ferry, D.R., El-Gazzaz, G., Mirza, D.F., James, N.D., McMaster, P. y Kerr, D.J. (2001) *Hepatocellular carcinoma*. Ann. Oncol. 12(2): 161-172.
- Iyer, S.S., Barr, W.H. y Karnes, H.T. (2006) *Profiling in vitro drug release from subcutaneous implants: a review of current status and potential implications on drug product development*. Biopharm. Drug Dispos. 27(4): 157-170.
- Jacobsen, S. y Fritz, H.G. (1999) *Plasticizing polylactide—the effect of different plasticizers on the mechanical properties*. Polym. Eng. Sci. 39(7): 1303-1310.
- Jain, R.A. (2000) *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials 21(23): 2475-2490.
- Jain, R.A., Rhodes, C.T., Railkar, A.M., Malick, A.W. y Shah, N.H. (2000) *Comparison of various injectable protein-loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices: in-situ-formed implant versus in-situ-formed microspheres versus isolated microspheres*. Pharm. Dev. Technol. 5(2): 201-207.
- Jaklenec, A., Hinckfuss, A., Bilgen, B., Ciombor, D.M., Aaron, R. y Mathiowitz, E. (2008) *Sequential release of bioactive IGF-I and TGF- β 1 from PLGA microsphere-based scaffolds*. Biomaterials 29(10): 1518-1525.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. y Thun, M.J. (2006) *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J. Clin. 56(2): 106-130.
- Jones, M.L. y Greff, R.J. (2004). *Contoured syringe and novel luer hub and methods for embolizing blood vessels*. US patent N° 9,197,525.
- Jouyban, A., Fakhree, M.A. y Shayanfar, A. (2010) *Review of pharmaceutical applications of N-methyl-2-pyrrolidone*. J. Pharm. Pharm. Sci. 13(4): 524-535.
- Kemme, M., Prokesch, I. y Heinzl-Wieland, R. (2011) *Comparative study on the enzymatic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) by hydrolytic enzymes based on the colorimetric quantification of glycolic acid*. Polym. Test. 30(7): 743-748.

- Kempe, S. y Mäder, K. (2012) *In situ forming implants — an attractive formulation principle for parenteral depot formulations*. J. Controlled Release 161(2): 668-679.
- Kenley, R.A., Lee, M.O., Mahoney, T.R. y Sanders, L.M. (1987) *Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro*. Macromolecules 20(10): 2398-2403.
- Kipke, D.R., Becker, T.A. y Collins, V.E. (2003). *Method for forming an endovascular occlusion*. US patent N° 9,777,263.
- Körber, M. (2010) *PLGA erosion: Solubility- or diffusion-controlled?* Pharm. Res. 27(11): 2414-2420.
- Kranz, H. y Bodmeier, R. (2007) *A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery*. Int. J. Pharm. 332(1–2): 107-114.
- Kranz, H. y Bodmeier, R. (2008) *Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles*. Eur. J. Pharm. Sci. 34(2–3): 164-172.
- Kranz, H., Brazeau, G.A., Napaporn, J., Martin, R.L., Millard, W. y Bodmeier, R. (2001) *Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems*. Int. J. Pharm. 212(1): 11-18.
- Kranz, H., Ubrich, N., Maincent, P. y Bodmeier, R. (2000) *Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states*. J. Pharm. Sci. 89(12): 1558-1566.
- Kranz, H., Yilmaz, E., Brazeau, G. y Bodmeier, R. (2008) *Drug release from a novel forming drug delivery system*. Pharm. Res. 25(6): 1347-1354.
- Krebs, M.D., Sutter, K.A., Lin, A.S.P., Guldberg, R.E. y Alsberg, E. (2009) *Injectable poly(lactic-co-glycolic) acid scaffolds with in situ pore formation for tissue engineering*. Acta Biomater. 5(8): 2847-2859.
- Kritzinger, J., Klass, D., Ho, S., Lim, H., Buczkowski, A., Yoshida, E. y Liu, D. (2013) *Hepatic embolotherapy in interventional oncology: Technology, techniques, and applications*. Clin. Radiol. 68(1): 1-15.
- Krupka, T.M., Weinberg, B.D., Ziats, N.P., Haaga, J.R. y Exner, A.A. (2006) *Injectable polymer depot combined with radiofrequency ablation for treatment of experimental carcinoma in rat*. Invest. Radiol. 41(12): 890-897.
- Kunou, N., Ogura, Y., Hashizoe, M., Honda, Y., Hyon, S.-H. y Ikada, Y. (1995) *Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits*. J. Controlled Release 37(1–2): 143-150.
- Lam, C.X.F., Savalani, M.M., Teoh, S.-H. y Hutmacher, D.W. (2008) *Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions*. Biomed. Mater. 3(3): 034108.
- Lambert, W.J. y Peck, K.D. (1995) *Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins*. J. Controlled Release 33(1): 189-195.

- Laurent, A., Mottu, F., Chapot, R., Zhang, J.Q., Jordan, O., Rufenacht, D.A., Doelker, E. y Merland, J.J. (2007) *Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 61(2): 64-74.
- Lee, J., Lee, S.C., Acharya, G., Chang, C.J. y Park, K. (2003) *Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property*. Pharm. Res. 20(7): 1022-1030.
- Lee, L.Y., Ranganath, S.H., Fu, Y., Zheng, J.L., Lee, H.S., Wang, C.-H. y Smith, K.A. (2009) *Paclitaxel release from micro-porous PLGA disks*. Chem. Eng. Sci. 64(21): 4341-4349.
- Lewis, D.H. (1990) *Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers*. En: *Biodegradable polymers as drug delivery systems* (Eds.: Chasin, M. y Langer, R.S.). Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos, p. 1-41.
- Li, S., Girod-Holland, S. y Vert, M. (1996) *Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base*. J. Controlled Release 40(1-2): 41-53.
- Li, S. y Vert, M. (1999) *Biodegradable polymers: polyesters*. En: *Encyclopedia of controlled drug delivery* (Eds.: Mathiowitz, E.). John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Estados Unidos, p. 71-93.
- Li, S.M., Garreau, H. y Vert, M. (1990) *Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media*. J. Mater. Sci.: Mater. Med. 1(3): 123-130.
- Limpanuparb, T., Punyain, K. y Tantirungrotechai, Y. (2010) *A DFT investigation of methanolysis and hydrolysis of triacetin*. J. Mol. Struct.- Teochem 955(1-3): 23-32.
- Liu, H. y Venkatraman, S.S. (2012) *Cosolvent effects on the drug release and depot swelling in injectable in situ depot-forming systems*. J. Pharm. Sci. 101(5): 1783-1793.
- Liu, Q., Zhang, H., Zhou, G., Xie, S., Zou, H., Yu, Y., Li, G., Sun, D., Zhang, G., Lu, Y. y Zhong, Y. (2010) *In vitro and in vivo study of thymosin alpha1 biodegradable in situ forming poly(lactide-co-glycolide) implants*. Int. J. Pharm. 397(1-2): 122-129.
- Lowman, A.M. y Peppas, N.A. (1999) *Hydrogels*. En: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (Eds.: Mathiowitz, E.). John Wile y & Sons, Inc., Nueva York, Estados Unidos, p. 397-418.
- Lu, L., Garcia, C.A. y Mikos, A.G. (1999) *In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films*. J. Biomed. Mater. Res., Part A 46(2): 236-244.
- Lu, L., Peter, S.J., D. Lyman, M., Lai, H.-L., Leite, S.M., Tamada, J.A., Uyama, S., Vacanti, J.P., Robert, L. y Mikos, A.G. (2000) *In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams*. Biomaterials 21(18): 1837-1845.
- Llovet, J.M. y Bruix, J. (2008) *Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008*. J. Hepatol. 48, Supplement 1(0): S20-S37.
- Mäder, K., Bacic, G., Domb, A., Elmalak, O., Langer, R. y Swartz, H.M. (1997) *Noninvasive in vivo monitoring of drug release and polymer erosion from biodegradable polymers by EPR spectroscopy and NMR imaging*. J. Pharm. Sci. 86(1): 126-134.

Mariano, R.N. 2012. *Nueva plataforma biodegradable para la administración sostenida de hormona para la sincronización del celo bovino. Optimización de los patrones de liberación*. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 119 pp.

Martindale, The Extra Pharmacopoeia (30^a ed.) 1993). Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Londres, Inglaterra.

Matschke, C., Isele, U., van Hoogevest, P. y Fahr, A. (2002) *Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products*. *J. Controlled Release* 85(1–3): 1-15.

McKim, A.S. y Strub, R. (2008) *Dimethyl sulfoxide USP, PhEur in approved pharmaceutical products and medical devices*. *Pharm. Technol.* 32: 74.

McHugh, A.J. (2005) *The role of polymer membrane formation in sustained release drug delivery systems*. *J. Controlled Release* 109(1–3): 211-221.

Meira, G.R., Vega, J.R. y Yossen, M.M. (2004) *Gel permeation and size exclusion chromatography*. En: *Ewing's analytical instrumentation handbook* (Eds.: Cazes, J.). Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos, p. 827-869.

Menei, P., Daniel, V., Montero-Menei, C., Brouillard, M., Pouplard-Barthelaix, A. y Benoit, J.P. (1993) *Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres*. *Biomaterials* 14(6): 470-478.

Menei, P., Jadaud, E., Faisant, N., Boisdron-Celle, M., Michalak, S., Fournier, D., Delhay, M. y Benoit, J.P. (2004) *Stereotaxic implantation of 5-fluorouracil-releasing microspheres in malignant glioma*. *Cancer* 100(2): 405-410.

The Merck Index (12^a ed.) 1996). Merck & Co., Inc., Nueva Jersey, Estados Unidos.

Middleton, J.C. y Tipton, A.J. (2000) *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. *Biomaterials* 21(23): 2335-2346.

Miller, R.A., Brady, J.M. y Cutright, D.E. (1977) *Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios*. *J. Biomed. Mater. Res.* 11(5): 711-719.

Miyajima, M., Koshika, A., Okada, J.i., Kusai, A. y Ikeda, M. (1998) *The effects of drug physico-chemical properties on release from copoly (lactic/glycolic acid) matrix*. *Int. J. Pharm.* 169(2): 255-263.

Mobedi, H., Nekoomanesh, M., Orafaei, H. y Mivehchi, H. (2006) *Studying the degradation of poly(l-lactide) in presence of magnesium hydroxide*. *Iran. Polym. J.* 15(1): 31-39.

Mohd-Adnan, A.-F., Nishida, H. y Shirai, Y. (2008) *Evaluation of kinetics parameters for poly(l-lactic acid) hydrolysis under high-pressure steam*. *Polym. Degrad. Stab.* 93(6): 1053-1058.

Mottu, F., Laurent, A., Rufenacht, D.A. y Doelker, E. (2000) *Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data*. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 54(6): 456-469.

- N-Methylpyrrolidone TSCA Workplan Chemical Risk Assessment* (2012) Estados Unidos: United States Environmental Protection Agency. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- Nsereko, S. y Amiji, M. (2002) *Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations*. *Biomaterials* 23(13): 2723-2731.
- O'Neil, J. 2010. *Controlling drug delivery for the application of extended or sustained-release drug products for parenteral administration*. Máster en Química. Northeastern University, Boston, Massachusetts, Estados Unidos. 73 pp.
- Okada, H. (1997) *One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate*. *Adv. Drug Del. Rev.* 28(1): 43-70.
- Ong, B.Y.S., Ranganath, S.H., Lee, L.Y., Lu, F., Lee, H.-S., Sahinidis, N.V. y Wang, C.-H. (2009) *Paclitaxel delivery from PLGA foams for controlled release in post-surgical chemotherapy against glioblastoma multiforme*. *Biomaterials* 30(18): 3189-3196.
- Packhaeuser, C.B., Schnieders, J., Oster, C.G. y Kissel, T. (2004) *In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58(2): 445-455.
- Park, S.C., Yoon, J.-H., Lee, J.-H., Yu, S.J., Myung, S.J., Kim, W., Gwak, G.-Y., Lee, S.-H., Lee, S.-M., Jang, J.J., Suh, K.-S. y Lee, H.-S. (2008) *Hypoxia-inducible adrenomedullin accelerates hepatocellular carcinoma cell growth*. *Cancer Lett.* 271(2): 314-322.
- Park, T.G. (1994) *Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight*. *J. Controlled Release* 30(2): 161-173.
- Park, T.G. (1995) *Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition*. *Biomaterials* 16(15): 1123-1130.
- Patel, R.B., Solorio, L., Wu, H., Krupka, T. y Exner, A.A. (2010) *Effect of injection site on in situ implant formation and drug release in vivo*. *J. Controlled Release* 147(3): 350-358.
- Pentecost, M.J. (1993) *Transcatheter treatment of hepatic metastases*. *Am. J. Roentgenol.* 160(6): 1171-1175.
- Pethrick, R.A. (2002) *Characterization of polymers*. En: *Encyclopedia of polymer science and technology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Pillai, O. y Panchagnula, R. (2001) *Polymers in drug delivery*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(4): 447-451.
- Proiakakis, C.S., Mamouzelos, N.J., Tarantili, P.A. y Andreopoulos, A.G. (2006) *Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions*. *Polym. Degrad. Stab.* 91(3): 614-619.
- Ramsey, D.E., Kernagis, L.Y., Soulen, M.C. y Geschwind, J.F.H. (2002) *Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma*. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 13(9, Parte 2): S211-S221.
- Ranganath, S.H. y Wang, C.-H. (2008) *Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma*. *Biomaterials* 29(20): 2996-3003.

- Ratner, B.D. (2002) *Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems*. J. Controlled Release 78(1–3): 211-218.
- Ratner, B.D. y Bryant, S.J. (2004) *Biomaterials: where we have been and where we are going*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 6: 41-75.
- Robinson, B.V. (1990) *PVP: A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, Estados Unidos, 209 pp.
- Rohrs, B.R. (2001) *Dissolution method development for poorly soluble compounds*. Dissolut. Technol. 8(3): 1-5.
- Rojas Cortés, M.G., Vallejo Díaz, B.M. y Perilla, J.E. (2008) *Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico*. Ing. Investig. 28: 57-71.
- Roskos, K. y Maskiewicz, R. (2002) *Degradable controlled release systems useful for protein delivery*. En: *Protein delivery. Physical systems* (Eds.: Sanders, L.y.H., R.). Kluwer Academic Publishers, Nueva York, Estados Unidos, p. 45-92.
- Ruel-Gariépy, E., Shive, M., Bichara, A., Berrada, M., Le Garrec, D., Chenite, A. y Leroux, J.-C. (2004) *A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 57(1): 53-63.
- Rungseevijitprapa, W. y Bodmeier, R. (2009) *Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM)*. Eur. J. Pharm. Sci. 36(4–5): 524-531.
- Sadao Mori, H.G.B. (1999) *Size exclusion chromatography* (1ª ed.). Springer, Nueva York, Estados Unidos, 248 pp.
- Sah, H. (1997) *Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres*. J. Controlled Release 47(3): 233-245.
- Sautter, C.A.F. 2006. *Sustained release injectables formed in-situ for veterinary use*. Tesis doctoral. Universität Basel, Basel, Suiza.
- Schliecker, G. 2003. *Biodegradable polyesters for veterinary drug delivery systems: Characterization, in vitro degradation and release behavior of Oligolactides and Polytartrate*. Tesis doctoral. Philipps-Universität, Marburg, Alemania. 146 pp.
- Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Wombacher, R. y Kissel, T. (2003) *Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity*. Int. J. Pharm. 266(1–2): 39-49.
- Senior, J.H. (2000) *Rationale for sustained-release injectable products*. En: *Sustained-release injectable products* (Eds.: Senior, J.H. y Radomsky, M.L.). Interpharm Press., Denver, Colorado, Estados Unidos, p. 1-11.

Shah, N.H., Railkar, A.S., Chen, F.C., Tarantino, R., Kumar, S., Murjani, M., Palmer, D., Infeld, M.H. y Malick, A.W. (1993) *A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers*. J. Controlled Release 27(2): 139-147.

Sharafuddin, M.J., Sun, S. y Golzarian, J. (2006) *Embolotherapy: basic principles and applications*. En: *Vascular embolotherapy. A comprehensive approach* (Eds.: Golzarian, J., Sun, S. y Sharafuddin, M.J.). Springer, Berlin, Alemania, p. 3-13.

Shi, M. y Ping Guo, R. (2012). *Transarterial chemoembolization with or without lipiodol in patient with unresectable hepatocellular carcinoma*. U.S. National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01229839>

Shi, Y. y Li, L. (2005) *Current advances in sustained-release systems for parenteral drug delivery*. Expert Opin. Drug Deliv. 2(6): 1039-1058.

Shively, M.L., Coonts, B.A., Renner, W.D., Southard, J.L. y Bennett, A.T. (1995) *Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system*. J. Controlled Release 33(2): 237-243.

Siegel, S.J., Kahn, J.B., Metzger, K., Winey, K.I., Werner, K. y Dan, N. (2006) *Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 64(3): 287-293.

Siepmann, J., Elkharraz, K., Siepmann, F. y Klose, D. (2005) *How autocatalysis accelerates drug release from plga-based microparticles: a quantitative treatment*. Biomacromolecules 6(4): 2312-2319.

Siepmann, J. y Siepmann, F. (2006) *Microparticles used as drug delivery systems*. En: *Smart colloidal materials* (Eds.: Richtering, W.). Springer, Berlin, Alemania, p. 15-21.

Singh, B.P., Singh, K. y Kumar, V. (1997) *Reduced toxicity and enhanced antitumor efficacy of plumbagin using poly (Lactic-co-glycolic) biodegradable injectable implant*. 29(3): 168-172.

Singla, A.K., Garg, A. y Aggarwal, D. (2002) *Paclitaxel and its formulations*. Int. J. Pharm. 235(1-2): 179-192.

Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P. y Boddaert, A. (1989) *In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method*. Biomaterials 10(8): 557-563.

Staniforth, M., O'Hanlon, M. y Khong, T.M. (1999) *Comparative study of lactic acid and polylactides using static headspace, gas chromatography and high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., A 833(2): 195-208.

Sun, J., Shi, W., Chen, D. y Liang, C. (2002) *The ring-opening polymerization of D,L-lactide catalyzed by new complexes of Cu, Zn, Co, and Ni Schiff base derived from salicylidene and L-aspartic acid*. J. Appl. Polym. Sci. 86(13): 3312-3315.

Swindell, C.S., Krauss, N.E., Horwitz, S.B. y Ringel, I. (1991) *Biologically active taxol analogues with deleted A-ring side chain substituents and variable C-2' configurations*. J. Med. Chem. 34(3): 1176-1184.

- Tam, K.Y., Leung, K.C.-F. y Wang, Y.-X.J. (2011) *Chemoembolization agents for cancer treatment*. Eur. J. Pharm. Sci. 44(1–2): 1-10.
- Tamada, J.A. y Langer, R. (1993) *Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(2): 552-556.
- Tarr, B.D. y Yalkowsky, S.H. (1987) *A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 41(1): 31-33.
- Tracy, M.A., Ward, K.L., Firouzabadian, L., Wang, Y., Dong, N., Qian, R. y Zhang, Y. (1999) *Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro*. Biomaterials 20(11): 1057-1062.
- Turino, L.N. 2012. *Desarrollo de sistemas inyectables biodegradables con formación in situ para la liberación sostenida de drogas veterinarias*. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 158 pp.
- Van der Zee, M. (2005) *Biodegradability of polymers – mechanisms and evaluation methods*. En: *Handbook of biodegradable polymers* (Eds.: Bastioli, C.). Rapra Technology Limited, Shropshire, Inglaterra, p. 1-31.
- Vey, E., Rodger, C., Booth, J., Claybourn, M., Miller, A.F. y Saiani, A. (2011) *Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies*. Polym. Degrad. Stab. 96(10): 1882-1889.
- Vey, E., Rodger, C., Meehan, L., Booth, J., Claybourn, M., Miller, A.F. y Saiani, A. (2012) *The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solution*. Polym. Degrad. Stab. 97(3): 358-365.
- Vey, E., Roger, C., Meehan, L., Booth, J., Claybourn, M., Miller, A.F. y Saiani, A. (2008) *Degradation mechanism of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution*. Polym. Degrad. Stab. 93(10): 1869-1876.
- Wang, L., Kleiner, L. y Venkatraman, S. (2003) *Structure formation in injectable poly(lactide-co-glycolide) depots*. J. Controlled Release 90(3): 345-354.
- Wang, L., Venkatraman, S. y Kleiner, L. (2004) *Drug release from injectable depots: two different in vitro mechanisms*. J. Controlled Release 99(2): 207-216.
- Wang, Z.-Y., Zhao, Y.-M., Wang, F. y Wang, J. (2006) *Syntheses of poly(lactic acid-co-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization*. J. Appl. Polym. Sci. 99(1): 244-252.
- Weinberg, B.D., Blanco, E. y Gao, J. (2008) *Polymer implants for intratumoral drug delivery and cancer therapy*. J. Pharm. Sci. 97(5): 1681-1702.
- Whalen, T., Slee, E. y Conner, A. (2003). *Methods for embolizing aneurysmal sites with a high viscosity embolizing composition*. US patent N° 10,345,127.

Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S. y Kissel, T. (2004) *Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems*. *Adv. Drug Del. Rev.* 56(10): 1453-1466.

Witt, C. y Kissel, T. (2001) *Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion?* *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51(3): 171-181.

Wu, X.S. y Wang, N. (2001) *Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation*. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 12(1): 21-34.

Xu, F., Lu, T. y Seffen, K. (2008) *Biothermomechanical behavior of skin tissue*. *Acta Mech. Sin.* 24(1): 1-23.

Yan, J., Wang, X. y Yang, Y. (2000) *Water uptake and pore volume determination of porous styrene-divinylbenzene copolymers*. *React. Funct. Polym.* 43(1-2): 227-232.

Yoo, J.Y., Kim, J.M., Seo, K.S., Jeong, Y.K., Lee, H.B. y Khang, G. (2005a) *Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method*. *Biomed. Mater. Eng.* 15(4): 279-288.

Yoo, J.Y., Kim, J.M., Seo, K.S., Jeong, Y.K., Lee, H.B. y Khang, G. (2005b) *Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method*. *Bio-Med. Mater. Eng.* 15(4): 279-288.

Yoshioka, T., Kawazoe, N., Tateishi, T. y Chen, G. (2008) *In vitro evaluation of biodegradation of poly(lactic-co-glycolic acid) sponges*. *Biomaterials* 29(24-25): 3438-3443.

Zhou, S., Deng, X., Li, X., Jia, W. y Liu, L. (2004) *Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems*. *J. Appl. Polym. Sci.* 91(3): 1848-1856.

Zolnik, B.S. y Burgess, D.J. (2007) *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*. *J. Controlled Release* 122(3): 338-344.

Zolnik, B.S., Leary, P.E. y Burgess, D.J. (2006) *Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres*. *J. Controlled Release* 112(3): 293-300.