
AQUÍ Y AHORA

EN LA ARGENTINA

NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



En el LDTD diseñamos nanonaves para ser empleadas en estrategias terapéuticas anti infecciosas, sobre todo en aquellas que comprenden ciclos de vida parasitarios intracelulares, para las que no hay cura ni vacuna conocida



LABORATORIO DE DISEÑO DE ESTRATEGIAS
DE TARGENTING DE DROGAS -LDTD-
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Introducción

ESCRIBE

Dra Eder Lilia Romero

moléculas pasajeras

La Nanotecnología tiene amplísimos campos de aplicación, fundamentalmente en óptica, mecánica y electrónica. Sin embargo, aplicada al diseño de fármacos, resulta en las bases racionales para diseñar naves a escala nanométrica, o nanonaves, que funcionan como vehículos de moléculas que se incorporan a su estructura de diferentes maneras, pero siempre en cantidad y forma controlada. El fin último de estas nanonaves, que pueden considerarse como sistemas de delivery controlado de moléculas, es regular tanto la farmacocinética como la biodistribución de todo aquello que viaje en su interior. **In vivo, las consecuencias que para una molécula tiene el trasladarse en una nanonave son inmensas, especialmente si se espera que ejerza un determinado efecto terapéutico.** Para ellas se abren enormes posibilidades en términos de accesibilidad y de resguardo: llegar donde se necesita sin perderse, desviarse ni degradarse en el camino. Las nanonaves pueden proteger estructuralmente a su carga de moléculas de los entornos físico-química y biológicamente hostiles, ya que impiden su hidrólisis, oxidación o ataque enzimático durante al tránsito. Finalmente, las nanonaves no sólo permiten conducir moléculas hasta un determinado órgano, tejido o célula, sino también hasta un compartimiento intracelular específico. En su conjunto, ambos, nanonave y molécula transportada son una nueva entidad molecular, especializada en atravesar barreras anatómicas y en llegar en tiempo y forma adecuados al sitio donde se debe ejercer la acción; esto resulta en una nueva y mayor ventana terapéutica ya que se traduce en una mayor efectividad y menor toxicidad.

¿nanonaves o nanorobots?

Todas aquellas nanoestructuras de arquitectura molecular controlada,

capaces de ejecutar una o varias funciones de manera programada, por lo general en respuesta a señales externas, pueden considerarse nanonaves. En muchos aspectos, las nanonaves son en realidad robots en la nanoescala de tamaño. Sin embargo, hay mucha fantasía acerca de lo que estos nanorobots pueden hacer en el interior del cuerpo. Existe confusión entre lo que son y lo que pueden lograr las actuales nanonaves, de una engañosa sencillez basada en la elegancia del autoensamblaje, y las representaciones gráficas de aparatos semejantes a las naves de guerra macroscópicas. Se supone que estas últimas patrullarían el cuerpo, buscando eliminar cada célula enferma en un recorrido cuya selectividad aun no es posible de alcanzar en la actualidad. Este tipo de constructo, lamentablemente por el momento, pertenece únicamente al campo de la ciencia ficción. Sin embargo, hoy mismo es posible diseñar nanonaves de diferente naturaleza, tanto a escala de laboratorio como a escala mayor, a partir de fuentes sustentables naturales, de donde pueden extraerse unidades autoensamblables, por ejemplo lípidos anfifílicos, que son la base matricial de las nanonaves conocidos como liposomas (pH-sensibles, estéricamente estabilizados, dirigidos y ultradeformables), nanopartículas lipídicas sólidas y arqueosomas. **También es posible sintetizar nanoestructuras poliméricas a partir de la aplicación de las matemáticas de propagación a la síntesis química, conocidos como dendrímeros; estos también son considerados como nanonaves.** En el LDTD diseñamos nanonaves para ser empleadas en estrategias terapéuticas anti infecciosas, fundamentalmente aquellas que comprenden ciclos de vida parasitarios intracelulares, para las que no hay cura ni vacuna conocida. Nuestro trabajo se basa en aplicar la Nanotecnología a la Tecnología Farmacéutica convencional, es decir desarrollamos Nanotecnología Farmacéutica. Por supuesto, estos desarrollos pueden extenderse a otros campos, como el oncológico o

enfermedades no infecciosas, tales como las autoinmunes.

¿cómo se hace?

El diseño de las nanonaves no es trivial. El mismo requiere de un estudio previo de las características anatomo-patológicas del contexto sobre el que se la planea aplicar, sobre la existencia previa de medicación adecuada o no, sobre las características fisicoquímicas y farmacológicas (si las hubiera) de la molécula que se va a incorporar en la nanonave. Luego debe proponerse una nanonave diseñada ad-hoc tanto para la patología como para la molécula en particular que fuera a viajar. El tamaño, propiedades estructurales y superficiales (carga neta, potencial Z) de la nanonave, así como su capacidad de experimentar transiciones de fase y/o responder como una nanomáquina inteligente a señales del entorno cercano para descargar la molécula transportada en el sitio y tiempo adecuado, son cruciales para el éxito del diseño.

El empleo de una u otra nanonave (liposomas múltiple u oligolamelares, el tipo de matriz lipídica, con o sin sensibilidad al pH, temperatura, fuerza iónica, la protección estérica, la mayor o menor cohesión de la estructura; la ultradeformabilidad, los dendrímeros de una u otra generación, tipo de grupos superficiales o cargas, de nanopartículas lipídicas sólidas de diferentes cores y cubiertas, con perfiles de liberación molecular), tampoco es una trivialidad ni es una mera elección al azar entre muchas posibilidades. Luego deben diseñarse los correspondientes protocolos de preparación de la nanonave y de incorporación a su estructura de la molécula en cuestión (X), para llegara a la nanonave-X. La nanonave -X será una nueva entidad molecular, y no solo poseerá una farmacocinética y biodistribución diferentes a X, sino que las mismas deberán ser funcionales a las requeridas para mejorar la terapéutica original. Debe remarcarse que una vez obtenida la nanonave -X, deben nuevamente diseñarse ad-hoc métodos para cuali/cuantificar, por ejemplo, la

molecula X transportada por la nanonave -X a diferentes tejidos; usualmente las técnicas de cuantificación pre-existentes son inútiles. Luego deben llevarse a cabo una serie de estudios, algunos de ellos estandarizados pero otros también diseñados ad-hoc, para determinar la estabilidad estructural en el contexto biológico donde se los planea usar (que dependerá a su vez de la vía de administración y del blanco extra o intracelular de que se trate).

Estos ensayos, así como la predicción de su performance farmacológica, se llevan a cabo in vitro, primero en ausencia de células, y luego, de ser posible, sobre cultivos celulares. Después se determina la biodistribución y de ser necesario, la farmacocinética, en animales sanos. Tanto la/s moléculas a incorporar a las nanonaves como las nanonaves mismas son interdependientes y en el diseño de la nanonave- X no pueden separarse. Por otro lado, X no necesariamente va a ser un agente anti-infeccioso o quimioterapéutico. Justamente, el objeto del uso de la nanonave- X es el cambio completo de la farmacocinética y biodistribución de X: a consecuencia de estos cambios puede aumentar, disminuir, aparecer o desaparecer la actividad de X sobre diferentes blancos. En otras palabras: **una molécula X puede NO tener actividad de naturaleza alguna, pero la nanonave- X sí poseer una nueva actividad. Todo lo descrito hasta acá, se conoce como "diseño racional" en el campo de la Tecnología Farmacéutica. Usualmente comprende entre dos y tres años de trabajo por cada tríada enfermedad-nanonave- X y requiere de la dedicación completa al mismo como mínimo de dos personas. En particular, el diseño racional de la nanonave- X, pertenece a la rama de la Nanotecnología.** Como todos los trabajos de Tecnología Farmacéutica, el nuestro bien podría finalizar en el diseño racional. Sin embargo, nosotros decidimos adicionar un paso posterior, donde se involucran otros grupos de

investigación con quienes entablamos colaboraciones frecuentes.

El objetivo de la colaboración es comprobar si tal diseño racional es eficaz para mejorar la terapia de por ejemplo, enfermedades infecciosas.

Actualmente, tenemos una activa colaboración con la Dra Patricia Petray del Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Capital Federal, así como con la Dra. Cecilia Venturini de la Cátedra de Inmuno-parasitología de la Fac. de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, y con el Dr. Fabio Doctorovich del INQUIMAE, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires. Por otro lado, la Drug for Neglected Diseases initiative (DNDi), una entidad internacional con sede en Ginebra, especializada en la búsqueda de terapias eficaces y accesibles contra enfermedades huérfanas incurables como el Mal de Chagas, la leishmaniasis y la malaria, nos ha invitado a exponer nuestros trabajos en un panel que nuclea a especialistas de todo el mundo en Caxambú, Brasil (Noviembre de 2005).

Esta noticia nos reconfortó, luego de la desazón constante que nos ha significado por seis años el desarrollar esta nueva disciplina en total soledad académica. La nuestra ha sido una investigación por bastante tiempo considerada el "patito feo", que se las ingenió para convivir junto a los soberbios frutos proteómicos y post genómicos de la Biotecnología. La DNDi busca desarrollar fármacos que no sólo sean eficaces sino que sean económicamente accesibles para millones de pobladores pauperizados, los que menos tienen y los que más necesitan.

El hecho de habernos elegido significa que la Nanotecnología Farmacéutica puede y debe estar al alcance de todos y para eso trabajaremos. No existen recompensas económicas que puedan reemplazar el orgullo de saber que investigamos para ellos.

Vacuna Oral Anti-Trypanosoma cruzi

ESCRIBE

Lic. Raúl Osvaldo González

EL PRESENTE TRABAJO ES TEMA DE TESIS DOCTORAL DEL LIC. RAÚL GONZÁLEZ Y SE LLEVA A CABO CON LA COLABORACIÓN DE LA ESTUDIANTE DE BIOTECNOLOGÍA ANALÍA KLOSTER Y PERSONAL DEL LDTD; ES DIRIGIDO EN EL LDTD-UNQ POR LAS DRAS EDER L. ROMERO Y MARIA JOSE MORILLA Y CO-DIRIGIDO POR LA DRA PATRICIA PETRAY, JUNTO AL DR. RICARDO CORRAL, DEL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DEL HOSPITAL GUTIÉRREZ, CAPITAL FEDERAL.

En reemplazo de las vacunas basadas en microorganismos atenuados o muertos, desde tiempo atrás la Ingeniería Genética permite obtener en forma segura y escalable fragmentos moleculares, de modo de eliminar los problemas de toxicidad por reactivación o dificultad de producción. Sin embargo, esto no es suficiente ya que dichos fragmentos no son capaces de generar per se respuestas inmunes adecuadas, tanto en términos de perfil (humoral o celular) como de memoria. En este punto es donde se requiere de adyuvantes, es decir sustancias que potencien la respuesta inmune en la dirección y duración correcta. En este contexto, no debe perderse de vista que el coloide alúmina (hidróxido de aluminio), a pesar de ser el único adyuvante permitido en humanos, no genera respuestas celulares ni de memoria adecuadas, aún cuando las mismas son imprescindibles para atacar tanto infecciones intracelulares como tumores. Es clara entonces la necesidad de contar con adyuvantes de mejor performance que la alúmina. Además, en un contexto regional sería altamente deseable hallar tanto vías alternativas de administración, más amigable que la ruta parenteral - para eliminar los soportes inyectables como la vía oral, como eliminar la conservación de vacunas mediante cadena de frío. Una vacuna con estas potencialidades debe cumplir cuatro ítems fundamentales:

- 1- Debe ser estructuralmente estable en el medio ambiente hostil (pH y enzimas) del tránsito gastrointestinal.
- 2- Debe ser capaz de hacer blanco en

las células M de las placas de Peyer intestinales; 3- Debe ser capaz de generar una adecuada respuesta inmune humoral, celular y de memoria; 4- Debe ser capaz de soportar procesos de liofilización. **Aún en la actualidad, diseñar una vacuna para la vía oral con estas características es todo un desafío. De cara al mismo, estamos empleando Nanotecnología como herramienta para diseñar nuevos adyuvantes: los mismos son nanovehículos (nanonaves), preparados a partir de bloques moleculares con propiedades únicas, los lípidos de los organismos del Domino Archaea.** Con estos lípidos como bloques unitarios, es posible preparar tipos especiales de nanonaves, o vesículas huecas conocidas como arqueosomas. A partir de su administración parenteral, hace poco se ha descubierto que los arqueosomas inducen un tipo de adyuvancia que aventaja con mucho a la alúmina. Tres de sus más destacadas capacidades son la producción de fuertes respuestas citotóxicas (CD8+T) aún en ausencia de mediación CD4+ T helper, la generación de memoria inmune y la completa ausencia de reacciones granulomatosas e inflamatorias. Por otro lado, los arqueosomas poseen un alto contenido entrópico en la interfase aire-agua, baja tensión superficial, responsable de la elevada hidrofobicidad de superficie, así como ramificaciones laterales de cadenas poli-isoprenoides que impiden estéricamente la permeación de iones y no electrolitos. Estas propiedades únicas no sólo permiten predecir elevada resistencia estructural en entornos químicamente hostiles, sino también muy importantemente, su captura preferencial por células M en las placas de Peyer intestinales. Las células M se especializan en transportar material particulado desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide organizado asociado a mucosas (OMALT); este transporte es imprescindible para generar reacciones inmunes en mucosas. Además, existe una relación entre el tamaño de partícula y tipo de res-

puesta desencadenada: las partículas grandes (en el orden de los micrones) quedan retenidas en OMALT regional y generan respuestas locales acotadas a mucosas; en cambio las partículas pequeñas (nanonaves, por debajo de los 100 nanómetros) pueden acceder por vía linfática a ganglios regionales, e inducir respuesta sistémica. Mi plan de trabajo consiste en el diseño de arqueosomas apropiados para conseguir adyuvancia sistémica protectora y de memoria frente al Mal de Chagas, una enfermedad endémica en nuestra región. Independientemente de los antígenos que los arqueosomas incorporen a su estructura, es claro que el éxito de la estrategia dependerá del correcto diseño de los arqueosomas, en función de los tipos de bloques moleculares que se empleen, que a su vez dependerá del género y especie de Arquea que se trate, de los protocolos de preparación de las nanonaves, y de nuestra capacidad para escalar la producción de los mismos. **Al presente, hemos logrado aislar varias especies autóctonas de Arqueas a partir de fuentes naturales y sustentables. Hemos logrado cultivarlas en masa y extraer los bloques moleculares necesarios para el armado de los arqueosomas. Verificamos que los mismos presentan muy baja citotoxicidad, así como gran resistencia estructural ante entornos hostiles tanto físicos como químicos.** Por último, luego de su administración por vía subcutánea en animales experimentales, hallamos amplia y persistente respuesta tanto celular, como humoral y de memoria, aún con mínimas cargas antigénicas de una proteína modelo.

Liposomas pH-sensibles: nano-herramientas para acceder al citoplasma celular

ESCRIBE

Dra. María José Morilla

Es consenso general en Biología que el aislamiento de una porción de es-

pacio en particular, sellado en membranas o vesículas que se auto-ensamblaron en medio acuoso a partir de moléculas antipáticas, fue responsable nada menos que del origen de las primeras células.

Millones de años más tarde, concretamente en la década del `60, las mismas reglas de auto-asociación fueron evocadas para preparar por primera vez en el laboratorio a las vesículas fosfolipídicas uni o multilamelares, conocidos como liposomas. **En la actualidad, el avance en el conocimiento de las propiedades de auto-ensamblaje de pequeños bloques moleculares antipáticos, de fosfolípidos en especial, nos permite en el campo de la Nanotecnología Farmacéutica diseñar y construir adhoc liposomas que se comporten como nanonaves capaces de enfrentar complejos desafíos de naturaleza farmacológica.** Estas nanonaves se diseñan aprovechando propiedades especiales de los fosfolípidos como el mesomorfismo lipídico, es decir, la capacidad de formar no solo bicapas sino también muchas otras estructuras tridimensionales, interconvertibles entre sí ante una determinada señal del entorno cercano. Esta capacidad de interconversión automática, llevada al mundo macroscópico de la ingeniería mecánica, es equivalente al diseño de aviones capaces de auto-transformarse en barcos o vehículos 4 x 4 toda vez que capten la señal de cambio en función de las características del terreno en tránsito. Claramente, con estos conocimientos en mano el poder diseñar una nanonave fosfolipídica, capaz de incorporar una cantidad controlada de fármaco a su estructura, para luego descargarlo en un sitio blanco ante una señal programada, ya no pertenece al terreno de la Sci-Fi y es impresionantemente útil a la hora de introducir cambios en la farmacocinética y biodistribución de una molécula con pobre performance farmacológica. Actualmente los mayores esfuerzos se dirigen a abordar una

cuestión no menor relativa al control de la biodistribución: dirigir la descarga del material transportado por la nanonave a un compartimiento intracelular determinado. Una vez que la nanonave ha llegado a las vecindades de las células blanco, existen dos alternativas: a) Acumularse en el espacio extracelular y liberar el material transportado en el exterior celular (estrategia que utilizan los antitumorales liposomales comercialmente disponibles CAELIX); o b) Ingresar al interior celular y descargar el material transportado en el interior celular. En términos generales, las nanonaves ingresan al interior celular principalmente por endocitosis (llevada a cabo por todas las células) o bien por fagocitosis (únicamente macrófagos). En ambos casos **la nanonave y su contenido, aún siendo capturados, permanecen en el exterior topológico de la célula; encerrados en el sistema vesicular endolisosomal, no tienen acceso al citoplasma ni al núcleo celular. En el interior del sistema endo-lisosomal, a medida que transcurre el pasaje de endosomas primarios a secundarios y finalmente a lisosomas, o de fagosomas a lisosomas, las nanonaves van siendo degradadas por la acidez creciente de los diferentes compartimientos vesiculares, a la que se suman proteasas y lipasas.** Finalmente, las nanonaves son reducidas a componentes utilizables por la célula y/o desechos eliminados al exterior. En algunos casos contados, este tránsito y procesamiento extremo sufrido por las nanonaves y su carga puede ser ventajoso. Sin embargo, la mayoría de las veces los agentes terapéuticos son efectivos únicamente si pueden acceder al citoplasma para ejercer su acción. Últimamente se ha hecho énfasis en diseños donde las nanonaves puedan escapar del sistema endo-lisosomal para acceder y liberar su contenido en forma masiva al citoplasma. Para lograrlo, en los años `90 se comenzaron a dise-

ñar las primeras nanonaves pH-sensibles convencionales, mientras que ahora, en los primeros años del siglo 21 comenzaron a aparecer los primeros diseños pH-sensibles "sintonizables". En estas nanonaves especiales, el cambio de pH del entorno cercano gatilla un reordenamiento tridimensional de su estructura, por lo general correspondiente al pasaje de una fase lamelar a pH alcalino o neutro, a una fase hexagonal H-II a pH ácido. Este cambio ocurre durante el tránsito desde el exterior celular, donde el pH es neutro, hasta los endosomas primarios y secundarios, entre los cuales la acidez crece gradualmente. Las nanonaves de estructura hexagonal H-II son tridimensionalmente muy diferentes a las lamelares, y pueden en particular fusionarse con la membrana los endosomas, de modo que el contenido que transporten se libere al citoplasma. La principal utilidad de estas nanonaves pH-sensibles radica justamente en su capacidad para volcar masivamente el contenido molecular transportado al citoplasma celular. Dado que diferentes líneas celulares tienen diferentes pHs endosomales, es posible construir nanonaves con estructuras sintonizadas para transformarse en H-II a un pH determinado, con máxima sensibilidad. El Mal de Chagas, una parasitosis endémica en muchos países de Latinoamérica, es causada por el *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad se manifiesta en dos formas, una aguda con tripomastigotes circulantes en sangre y pocos amastigotes intracelulares, y una crónica sin parásitos en sangre pero con abundantes nidos de amastigotes, particularmente en corazón y tracto intestinal, de acuerdo a la región geográfica de la cepa parasitaria. El único fármaco aprobado para su tratamiento es el 2-nitroimidazol hidrofóbico benznidazol administrado por vía oral, aunque su performance antiparasitaria es poco satisfactoria. Por un

lado su eficacia es limitada, particularmente sobre la forma crónica, probablemente por su incapacidad para llegar al interior citoplasmático donde se hallan los parásitos. Debo hacer énfasis en que parásitos en esta localización son particularmente difíciles de erradicar, justamente debido a la dificultad para que los fármacos accedan en tiempo y forma correcta al citoplasma celular infectado. Esto es lo que sucede con el benznidazol. Además, este fármaco es poco soportado en adultos, causa severos efectos tóxicos colaterales probablemente por su poca selectividad; deben administrarse altas dosis durante períodos prolongados, un aspecto a tener en cuenta dado su potencial mutagénico.

La dificultad en diagnosticar cura de los infectados con esta enfermedad, sumado a que no hay estudios longitudinales concluyentes acerca de la capacidad del benznidazol para curar una vez superada la fase aguda, nos movieron a buscar una alternativa radicalmente diferente al tratamiento corriente.

En el marco de mi Tesis Doctoral en el LDT ("Liposomas como Agentes Antichagásicos" Marzo 2000- Septiembre 2003), hemos desarrollado nanonaves pH-sensibles capaces de descargar moléculas de fármacos al citoplasma de células infectadas con parásitos intra-citoplasmáticos. El fármaco en cuestión es el etanidazol, un 2-nitroimidazol hidrofílico que se utiliza como marcador de hipoxia y radiosensibilizante en la terapia antitumoral, mucho menos tóxico que el benznidazol.

En principio, hallamos que el etanidazol administrado de manera convencional tiene actividad específica *in vitro* frente a las formas tripomastigotes y amastigotes. A continuación, diseñamos nanonaves pH-sensibles capaces de incorporar etanidazol a su estructura. Una vez administradas endovenosamente, y a diferencia del benznidazol convencional, **estas nanonaves cargadas con**

etanidazol fueron dramáticamente eficientes para eliminar nidos de amastigotes intracelulares. El resultado más sobresaliente obtenido hasta el momento fue la significativa disminución de la parasitemia de ratones pre-infectados con dosis letales de la cepa RA de *T. cruzi*, luego de la administración endovenosa de dosis extremadamente pequeñas estas nanonaves (que llevaban una cantidad de fármaco más de 200 veces inferior a los controles con benznidazol), sin causar efectos tóxicos colaterales.

Es importante comprender que la continuidad del tratamiento por los pacientes chagásicos (por lo general distribuidos en áreas rurales muy extensas), así como de su control por parte del médico, es muy difícil, entre otras cosas porque el régimen terapéutico requiere 3 tomas diarias del fármaco durante 30-60 días.

En el LDTD estamos perfeccionando una estrategia terapéutica, que se perfila como capaz de erradicar completamente los parásitos a partir de una única administración endovenosa. En ese contexto, a pesar de ser administrada por vía, parenteral, sus resultados prometedores superarían con mucho al largo tratamiento convencional oral, de dudosa eficacia, largo y con efectos colaterales.

Nanonaves ultradeformables: terapia fotodinámica más segura y efectiva

ESCRIBE

Lic. Jorge Montanari

ESTA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN ES TEMA DE TESIS DOCTORAL DEL LIC. JORGE MONTANARI (BECARIO CONICET TIPO I) EN COLABORACIÓN CON LA ESTUDIANTE DE BIOTECNOLOGÍA ANA PAULA PEREZ (SEMINARISTA DE GRADO), BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA EDER L. ROMERO Y LA CO-DIRECCIÓN DE LA DRA MARÍA JOSÉ MORILLA, EN EL LDTD-UNQ Y SE ENCUENTRA EN EL PRIMER SEMESTRE DE SU DESARROLLO. COLABORAN EN ESTE PROYECTO EL DR. FABIO DOCTOROVICH Y PERSONAL DE SU GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL INQUIMAE, FCEN, UBA.

Una de nuestras líneas de investigación en el LDTD consiste en el desarro-

llo de fármacos contra la Leishmaniasis cutánea, una enfermedad parasitaria. Esta dolencia, endémica en numerosas áreas de nuestro país y en la mayoría de los países latinoamericanos, afecta principalmente a poblaciones rurales y/o de bajos recursos que no tienen un fácil acceso a los tratamientos -basados en antimoniales pentavalentes administrados por vía parenteral. Los tratamientos no sólo son costosos, prolongados, requieren internación y causan numerosos efectos colaterales, sino que en última instancia, la mayor parte de las veces, no consiguen erradicar la enfermedad. En la leishmaniasis, los parásitos intracelulares responsables de su persistencia y perpetuación anidan en poblaciones macrofágicas, las células de Langerhans, ubicadas en la epidermis por debajo del estrato córneo. Esta ubicación, hace de estos parásitos un blanco de muy restringida accesibilidad para la medicación convencional: la vía tópica debe remontar la barrera del estrato córneo, especializado en restringir la penetración de moléculas, penetración de radiación externa y pérdida de agua; la administración parenteral subcutánea o intramuscular es poco efectiva para acceder selectivamente hacia un tipo celular de la epidermis profunda. Por otro lado, la medicación debería ser además capaz de atravesar la membrana citoplasmática de células infectadas para luego acceder a un compartimento intracelular, el endo-lisosomal, donde residen los parásitos. Esto último agrega un factor extra a la escala de dificultades que deben sortearse y tenerse en cuenta a la hora de diseñar una estrategia antiparasitaria correcta. Nuestro desafío consiste en emplear Nanotecnología para diseñar nanonaves especiales que sirvan como vehículos de moléculas con actividad antiparasitaria; conseguir que las mismas accedan selectivamente al interior de células infectadas, y que ejerzan su acción con alta especificidad, efectividad y sin comprometer a otras poblaciones celulares. Para ello, **mi plan de trabajo consiste en el diseño de nanonaves especiales, que resultan ser vesículas lipídicas huecas y**

ultradeformables. Este es un tipo particular de nanoconstructo cuya técnica de preparación es en la actualidad manejada únicamente por un puñado de grupos en el mundo. Diseñando apropiadamente su nanoestructura, particularmente disminuyendo el módulo de deformación de las vesículas igual o por debajo de la energía ambiental kT, estas nanonaves son capaces de experimentar locomoción espontánea a escala molecular, siempre que exista un gradiente de humedad, como el que hay entre la superficie y las capas más profundas de la epidermis. Esto significa que una vez ubicadas en la superficie de la piel, las nanonaves pueden deslizarse a través de la red de tubos de pequeñísimo diámetro que atraviesan el estrato córneo, cambiando de forma sin perder integridad estructural, hasta llegar a los macrófagos infectados. En virtud de su carácter particulado, las nanonaves serán capturados por los mismos, y una vez en el mismo compartimento intracelular que el parásito, permitirán que la molécula antiparasitaria transportada ejerza su acción, actuando sin dañar a la célula huésped ni a sus vecinas. Otra particularidad de este proyecto es que la molécula antiparasitaria es un fotosensibilizador, que al captar luz en el espectro del visible desencadena una reacción controlada de especies reactivas del oxígeno que son letales para las leishmanias. Con esta combinación de delivery por nanonaves y terapia fotodinámica se apunta a lograr un tratamiento que funcione por medio de la simple aplicación tópica de una crema con posterior exposición de la zona afectada a la luz del ambiente.

Dendrimeros como nanonaves de siRNA

ESCRIBE

Dra. María José Morilla

Para todo fármaco, es importante tener en cuenta las múltiples y complejas barreras biológicas/anatómicas que deben sortearse para acceder selectiva

y eficientemente a un determinado blanco celular. Para ejercer su acción, idealmente tanto pequeños xenobióticos como macromoléculas deben llegar selectivamente al tejido blanco, luego acercarse a las células blanco, ser capturados activamente o penetrar pasivamente al interior celular y finalmente acceder (en lo posible, intactos) al compartimiento intracelular correcto donde actuarán. De no conseguirse estos objetivos primarios, independientemente de la eficacia terapéutica que la molécula en cuestión haya demostrado en ensayos in vitro, la posibilidad de su empleo in vivo probablemente se desvanezca. Esto es patente en el caso de moléculas extremadamente lábiles en entornos biológicos, como son los ácidos nucleicos (AN). In vivo, el acceso correcto en tiempo y forma de cualquier AN y en particular de ARN a un blanco intracelular desde la vía sistémica está obstaculizado por barreras anatómicas, fisiológicas, que pueden clasificarse en extracelulares e intracelulares. Las primeras son a) susceptibilidad de degradación del ARN por nucleasas plasmáticas, b) posibilidad de captura del ARN por el sistema retículo-endotelial, c) posibilidad de rápida eliminación renal y d) dificultad de acceso a los órganos blancos, resultando en biodistribución y farmacocinética inadecuadas. Por otro lado, las barreras intracelulares son a) dificultad para ingreso del ARN a la célula, b) dificultad de escape del sistema endo-lisosomal (para evitar su degradación) y c) escasa estabilidad citoplasmática. El recurso de ARN interferente (ARNi) es una estrategia silenciadora de genes basada en un mecanismo por el cual un RNA doble cadena corto (21-25 pb) suprime la expresión del gen que lleva su secuencia complementaria. La utilidad de siRNA como herramienta de laboratorio y de validación de blancos terapéuticos está clara con más de mil publicaciones aparecidas desde 2002. Esto ha generado grandes expectativas en el potencial uso de siRNA como agentes terapéuticos en una variedad de enfermedades,

por ejemplo hepatitis fulminante, asma, enfermedad de Parkinson, infecciones virales, sepsis, tumores sólidos y neovascularización ocular causante de degeneración macular. Sin embargo, **el futuro de siRNA como agentes terapéuticos es extremadamente dependiente del desarrollo de un vehículo que permita transportar el siRNA a través de las barreras antes mencionadas y lo libere eficientemente en el citoplasma de las células blanco.** Varias estrategias han sido utilizadas para traspasar estas barreras y lograr la liberación in vivo de diversos ácidos nucleicos. Básicamente se utilizaron vectores virales, altamente eficientes pero que usualmente inducen respuestas inmune adversas en el huésped y vectores no-virales, que si bien son más seguros inmunológicamente, su uso se halla seriamente limitado por su alta toxicidad y agregación seguida de acumulación pulmonar, evento que resulta letal. **En el LDTD, y en el marco de mi trabajo post-doctoral, estamos empleando dendrímeros como nanonaves para el transporte y liberación de siRNA.** Unicamente los dendrímeros combinan un tamaño micelar con alta estabilidad estructural en medios acuosos. Un aspecto que los diferencia de otros nanonaves es su mínimo tamaño: es importante comprender que el tamaño óptimo requerido para extravasarse de circulación sistémica y acumularse en las vecindades de blancos terapéuticos, debe oscilar en el orden de los angstroms o pocos nanómetros. Por otro lado, a la luz de sus particulares propiedades moleculares, varias ventajas surgen de manipular programadamente la estructura de los dendrímeros, Por ejemplo, modificando su tamaño y grupos superficiales, es posible conseguir que entablen determinadas interacciones intermoleculares repulsivas, tanto con su entorno inmediato (para evitar su captura inespecífica durante el tránsito sistémico), como reversiblemente atractivas con el AN que incorpore (para protegerlo

estructuralmente durante el tránsito y luego liberarlo en el citoplasma, donde debe ejercer su acción). De este modo, será posible construir nanonaves inteligentes que resulten vectores no virales seguros y eficientes para la liberación controlada de AN. En particular, estamos trabajando en el desarrollo de una nanonave para siRNA con posibilidades de ser empleada como agente anti-artritis reumatoide. La artritis reumatoide (AR) es un síndrome crónico caracterizado por inflamación inespecífica generalmente simétrica de las articulaciones periféricas que potencialmente da origen a destrucción progresiva de las estructuras articulares y periarticulares, puede haber también manifestaciones generalizadas. Se estima que alrededor del 1 % de la población mundial sufre de AR. Fundamentalmente, existen dos categorías de tratamientos para la AR: los tratamientos sintomáticos, con drogas anti-inflamatorias no esteroideas, y los tratamientos que apuntan a curar la enfermedad. En el primero se utilizan medicamentos analgésicos sin efectos sobre la progresión de la enfermedad, cuyo uso a largo plazo conlleva a severos efectos tóxicos. El otro tipo de tratamiento tiene como blanco las citoquinas inflamatorias, como TNF- e interleukinas, así como corticoides. En particular el TNF- se halla sobre-expresado en AR y juega un rol fundamental en la patología de la enfermedad. En términos generales, ninguno de estos medicamentos es curativo; todos son tóxicos, algunos tremendamente nocivos; es común el compromiso digestivo, renal, hepático, ocular, óseo y metabólico con el uso de estos fármacos. Adicionalmente, debe remarcar que el bloqueo sistémico de estas citoquinas, pueden llevar a severos riesgos de infección. En este contexto, es clara la necesidad de desarrollar nuevos fármacos contra esta enfermedad, que actualmente no tiene cura y que puede progresar a la forma crónica con incapacidad grave. Por lo tanto, sería de máximo interés contar

con una estrategia para bloquear o disminuir la expresión de TNF- basada en el empleo de siRNA. A diferencia de los productos anti-TNF- convencionales, se combinaría un bloqueo de la expresión a nivel genómico con selectividad de biodistribución, lo que podría incrementar la potencialidad de los tratamientos.

Dendrímeros para llegar a parásitos ubicados en sitios casi inaccesibles

ESCRIBE

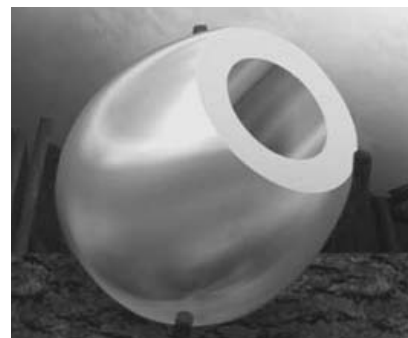
Lic. Jimena Prieto

ESTE TRABAJO ES TEMA DE TESIS DOCTORAL DE LA LIC. JIMENA PRIETO (BECARIA CONICET TIPO I), CON LA DIRECCIÓN DE LA DRA. EDER L. ROMERO Y LA CO-DIRECCIÓN DE LA DRA. MARIA JOSÉ MORILLA, EN EL LLDD-UNQ

La Toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria que si bien es inofensiva para la mayoría debido a su autolimitación, puede ser mortal para pacientes inmunosuprimidos (cáncer, HIV+, trasplantes, etc). La toxoplasmosis cerebral es la manifestación más importante en estos pacientes ya que en esos casos la reactivación del *T. gondii*, que se encuentra tanto en forma circulante (taquizoitos) como intracelular (bradizoitos, formando quistes) causa severos daños tisulares. El tratamiento convencional se basa en la combinación sinérgica de sulfadiazina y pirimetamina. Estos fármacos actúan sólo sobre los trofozoitos pero no sobre los quistes. Por otro lado, a pesar que el ácido fólico se incluye en el régimen debido a la toxicidad hematológica del tratamiento (normalmente entre 6-8 semanas) hay efectos colaterales importantes y a muchos pacientes les es imposible completarlo. Es importante remarcar dos cosas: por un lado, que los quistes en estado dormante son responsables de la devastadora reactivación por inmunosupresión; por otro lado, la ubicación intracelular y la compleja ultraestructura tridimensional que rodea a los quistes, contribuiría a dificultar el acceso de la medicación. Esto sería la causa de lo trabajoso de su erradicación con tratamientos con-

vencionales. **En este contexto, mi plan de trabajo consiste en emplear Nanotecnología para diseñar una nanonave que facilite el acceso de sulfadiazina /pirimetamina a los quistes intracelulares con capacidad de atravesar exitosamente la barrera hematoencefálica, a la par que reducir la toxicidad del tratamiento.** Estas nanonaves, diseñadas adhoc para controlar tanto farmacocinética como biodistribución de las moléculas incorporadas en su interior, son dendrímeros. Los dendrímeros son polímeros esféricos, pero con propiedades únicas en el campo de los materiales poliméricos, y se caracterizan por su tamaño nanométrico (millonésima parte del milímetro), mínima polidispersidad (M_w/M_n : 1,0005-1,10) y estructura superficial definida. Estas estructuras, exquisitamente construidas en el rango molecular son el resultado de la aplicación de la matemática de propagación a la síntesis orgánica. Así en sucesivas rondas de síntesis se van agregando un número definido de ramas a un núcleo central, obteniéndose generaciones (G) crecientes en las que se duplica el peso molecular mientras que el tamaño aumenta 1 nanómetro y se agregan un número definido de grupos superficiales. Los dendrímeros de menor G son asimétricos y abiertos, mientras que los de mayor G son globulares cerrados y con grupos terminales densamente empaquetados. De acuerdo a esto, los G 0 a 3, son dendrímeros abiertos y flexibles; los G 4 a 6 son estructuras semirígidas capaces de retener y alternativamente liberar fármacos en su interior, mientras que los G 7 a 10 son estructuras rígidas incapaces de aceptar moléculas en su interior, con limitada permeabilidad superficial. En general, los dendrímeros pueden incorporar moléculas de fármacos en el interior de sus bolsillos (de tamaño y forma controlada) o bien anclarlos a los grupos superficiales. Remarcablemente, la exposición de gran número de grupos superficiales es un factor clave que facilitaría el reconocimiento del dendrímero por los sitios blancos. En este caso particular, la nanonave debe ser capaz de

acceder selectivamente a las vecindades de los quistes tisulares y desde allí liberar el fármaco o ingresar a las células infectadas para liberarlo en el interior de las mismas. Para acceder a los quistes es necesario una nanonave extremadamente pequeña que una vez en sangre, atraviese las mínimas discontinuidades de la vasculatura asociada a los quistes y se acumulen en su periferia. Para conseguirlo, es crucial tener en cuenta que el tamaño de la nanonave es fundamental: liposomas y nanopartículas tienen un diámetro entre 50-150 nm, lo que supera ampliamente las discontinuidades endoteliales y dificulta la extravasación. Los dendrímeros en cambio, son un orden de tamaño menor, ubicado en el rango de las decenas de angstroms (Å) por lo que es de esperarse que su mínimo tamaño favorezca la extravasación. Hasta el momento, hemos desarrollado protocolos que nos permitieron incorporar sulfadiazina a dos tipos diferentes de dendrímeros con alta eficiencia; estudiamos su estabilidad estructural a partir de la determinación de su perfil de liberación en diferentes entornos. Por otro lado, estudiamos su perfil de citotoxicidad así como su ruta intracelular luego de ser capturados por células Vero y macrófagos J 774. Al presente y por último, estamos llevando a cabo experimentos donde hallamos actividad anti-infecciosa empleando únicamente ínfimas cantidades de sulfadiazina incorporada a dendrímeros, sobre cultivos de células Vero infectados con una cepa de referencia de *T. gondii*. Estos estudios se están llevando a cabo con la colaboración de la Dra Cecilia Venturini, de la Cátedra de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.



Los liposomas actúan como nanonaves que enfrentan complejos desafíos de naturaleza farmacológica