

**EVALUACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD
DE LA MUCOSA ORAL PORCINA FRENTE A CANDESARTÁN**

YENNY MARITZA GARCIA TARAZONA

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
BOGOTÁ DC - FEBRERO 2019**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Maestría en Ciencias Odontológicas
Título:	Evaluación de un modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán
Grupo(s) de Investigación	Grupo UIBO Grupo OSIRIS & BIOAXIS
Línea de investigación:	Biotecnología Desarrollo de tecnologías para entes biológicos
Institución(es) participante(s):	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque Facultad de Bioingeniería – Universidad El Bosque
Tipo de investigación:	Maestría / Línea Medicina Oral y Periodoncia
Estudiante:	Yenny Maritza García Tarazona
Director:	Sandra Johanna Morantes. Biol, PhD.
Codirectores :	José Francisco Ibla. Quím. cPhD

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MARIA CONSUELO ROMERO	Director(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas
SERGIO VIÁFARA	Coordinador(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

DEDICATORIA

Este trabajo y todo el esfuerzo en él empeñado van dedicados a mi familia, razón y motor de mi vida, motivación permanente y apoyo constante e incondicional, sin el cual no habría podido llegar a este feliz término. Las noches que no te vi, las lágrimas que no seque, la compañía que no fui, están condensadas en este trabajo, los amo y gracias por ser y estar siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bondad y misericordia,

A mi familia por entenderme y por ser siempre ese punto de apoyo y fuente constante de buena energía,

A la Dra. María Rosa quien despertó en mí la motivación para emprender este proyecto,

A la Dra. Johanna a quien con el desarrollo del proyecto aprendí a ver como la gran profesional que es y a valorar como una gran amiga,

A Sebastián, Paula y Ximena por estar siempre ahí apoyando el proceso de manera incondicional,

A la Dra. Gloria Lafaurie por su apoyo incondicional y por ser el faro que orientó el rumbo de este proyecto,

Al Dr. Francisco por ser parte de este equipo y por su colaboración permanente,

Al Laboratorio Marinos de La Universidad Nacional y en especial al Dr. Freddy Ramos y Paula Michel Sepúlveda, por su decisiva ayuda en momentos claves del desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de trabajo Iván, Ernesto, Jairo y Sonia por su comprensión y amistad incondicional,

Al personal de laboratorio por su ayuda y disposición,

Al frigorífico BLE por abrir las puertas de sus instalaciones y en especial por poner su recurso humano, Dr. Arbey Cárdenas al servicio de este proyecto,

A mis compañeros de la Maestría con quienes entablamos una fuerte relación profesional y de amistad.

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE UN MODELO IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA ORAL PORCINA FRENTE A CANDESARTÁN.

Antecedentes: La cavidad oral se ha perfilado como un sitio adecuado para la administración de fármaco, por las ventajas sobre las rutas convencionales. Por la escasa disponibilidad de tejido bucal humano, la mucosa bucal porcina, se ha propuesto como un modelo in vitro para estudios de permeabilidad de fármacos, debido su similitud en términos histológicos, morfológicos y de permeabilidad con la mucosa bucal humana, pero las diferencias con respecto a los protocolos de preparación, transporte y mantenimiento del tejido, llevaron a plantear la necesidad de implementar en el laboratorio la mucosa bucal porcina como modelo ex vivo para cuantificar la permeabilidad del candesartán, medicamento antihipertensivo que muestra una baja biodisponibilidad (15%) cuando es administrado a través de la vía oral.

Objetivo: Evaluar un modelo in vitro para el estudio de la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán

Materiales y métodos: Se evaluó viabilidad a través del ensayo de MTT (de unidades de absorbancia por mg de tejido, índice TR) e integridad mediante el ensayo de FD-20 (URF), a diferentes tiempos de experimentación. Se evaluó el paso de moléculas control como cafeína y estradiol así como la permeación de candesartán a dos rangos de pH. Los resultados fueron comparados con la prueba de Kruskal Wallis con post hoc prueba de U Mann-Whitney con un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0,05$).

Resultados: La viabilidad de la mucosa a las 4h de experimentación ($0,0478 \pm 0,0076$) fue comparable al de la mucosa fresca ($0,0471 \pm 0,0078$) $p > 0,05$, la integridad también se mantuvo a las 4h de experimentación. El Paap para cafeína fue de $6,2117 \pm 0,9557 \times 10^{-6}$ cm/s, para estradiol los valores estuvieron por debajo del LOQ y para candesartán se logró registrar una cinética de paso mayor en el rango de pH fisiológico, comparado en el pH ácido

Conclusiones: Se determinó que permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán cafeína y estradiol mostró un perfil diferencial asociado a la naturaleza química de las moléculas, siendo en su orden cafeína, candesartán y estradiol los más permeables.

Palabras claves: mucosa oral porcina, viabilidad, Candesartán, cafeína, estradiol, coeficiente de permeabilidad

ABSTRACT

EVALUATION OF AN IN VITRO MODEL FOR THE STUDY OF PORCINE ORAL MUCOUS PERMEABILITY IN CONTACT WITH CANDESARTAN

Background: The oral cavity has been profiled as an adequate area for the administration of drugs because it has advantages over conventional ways. The scarcity of available human oral tissue has led to the proposal of porcine oral mucous as an in vitro model for drug permeability studies because of its histological, morphological and permeability similarities. However, differences regarding preparation, transport and tissue maintenance protocols led to the laboratory implementation of said mucous as an in vitro model for the permeability quantification of candesartan, an anti-hypertension drug which displays low bio-disposition (15%) when administered orally. **Aim:** to evaluate an in vitro model for the study of porcine oral mucous permeability in contact with candesartan. **Material and methods:** The viability was evaluated with the MTT trial (absorption units per mg of tissue, TR index) and the integrity with FD-20 trial (URF) with differing running times. The flow of molecules such as caffeine and oestradiol was assessed, as well as the permeability of candesartan with two pH ranges. Results were compared with the Kruskal Wallis test and post hoc with the U Mann-Whitney test presenting a statistical significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** The viability after four hours (0.0478 ± 0.0076) was comparable to that of fresh mucous (0.0471 ± 0.0078) $p > 0.05$; integrity also remained after four hours of experimentation. The Paap for caffeine was $6.2117 \pm 0.9557 \times 10^{-6}$ cm/s; the values for oestradiol were below LoQ and candesartan registered a greater kinetic flow in the physiological pH range compared to the acid pH. **Conclusions:** porcine oral mucous permeability in contact with candesartan, caffeine and oestradiol presented a differential profile associated with the molecules' chemical nature; the most permeable in order were caffeine, candesartan and oestradiol.

Key words: porcine oral mucous, viability, candesartan, caffeine, oestradiol, permeability coefficient.

GUIA DE CONTENIDO

1.	14
2.	3
2.1.	3
2.2.	4
2.3.	5
2.4.	11
2.5.	13
2.6.	16
3.	18
4.	21
5.	23
6.	25
6.1.	25
6.2.	25
7.	26
7.1.	26
7.2.	26
7.3.	26
7.4.	39
7.5.	39
8.	41
9.	42
9.1.	42
9.2.	53
9.3.	58
10.	66
11.	71

BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química candesartán.	4
Figura 2. Estructura mucosa oral humana.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Tipos de mucosa oral que revisten la cavidad oral..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Localización de gránulos de revestimiento de membrana (MCGs) en epitelio oral queratinizado y no queratinizado.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5. Mecanismos de transporte a través de mucosa oral.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Celda de Franz.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7. Estructura de la cafeína.	16
Figura 8. Estructura Química del Estradiol.	16
Figura 9. Esquema de la estrategia metodológica.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10. Separación del epitelio por técnica de calor.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. Identificación de la superficie basal y la superficie epitelial a través de estereoscopio.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Acondicionamiento de la mucosa oral porcina en la celda de Franz..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Fragmento de mucosa: para histología previo al experimento y para el ensayo de permeabilidad a pH ácido y fisiológico.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Índice TR de mucosa oral porcina viable y expuesta a diferentes protocolos de daño.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 16. Comparación de Índice TR de mucosa oral porcina a diferentes tiempos de experimentación..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 17. Comparación de Índice TR de mucosa oral porcina expuesta a PBS+Na ₂ CO ₃ (vehículo candesartán-cafeína) y PBS + etilenglicol al 10% (vehículo estradiol).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 18. Secciones histológicas de mucosa oral porcina expuestas a vehículos.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 19. Curvas de calibración FD-20.	¡Error! Marcador no definido.

Figura 20. URF evaluando Integridad en mucosas expuestas a diferentes tiempos de experimentación.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 21. Evaluación de Integridad por FD20 en mucosas control. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 22. Histología de mucosas expuestas a FD-20 preparado en KBR, a diferentes tiempos de experimentación. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 23. Diagrama de medición histomorfométrica del espesor de mucosa oral porcina. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 24. Mucosa Oral Porcina procesada inmediatamente después del sacrificio. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 25. Mucosa oral porcina fresca, coloreada con PAS. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 26. Cromatograma cafeína. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 27. Curvas de calibración Cafeína. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 28. Perfil de permeación de cafeína a través de la mucosa oral porcina.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 29. Cromatograma estradiol.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 30. Curva de calibración estradiol. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 31. Índice TR de mucosa oral porcina expuesta a cafeína, estradiol y respectivos vehículos.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 32. Mucosa oral porcina expuesta a cafeína y estradiol durante 4 h. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 33. Cromatograma Candesartán. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 34. Curva de calibración Candesartán. n=3 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 35. Perfil de permeación de candesartán a través de la mucosa oral porcina en dos condiciones de pH. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 36. MTT de mucosas expuestas a Candesartán en los dos rangos de pH. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 37. Índice TR para mucosa oral porcina expuesta a candesartán.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 38. Mucosa oral porcina expuesta a candesartán a dos rangos de pH.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 39. Modelo del fenómeno de paso de Candesartán a dos rangos de pH...**Error! Marcador no definido.**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características fisiológicas de la cavidad oral.	8
Tabla 2. Comparación de la mucosa bucal de diferentes mamíferos	14
Tabla 3. Vehículos evaluados para solubilizar candesartán, cafeína, estradiol	31
Tabla 4. Condiciones HPLC para cafeína, estradiol y candesartán	33
Tabla 5. Puntos de Curva de calibración de Cafeína	34
Tabla 6. Puntos de Curva de calibración de Estradiol	34
Tabla 7. Puntos de Curva de calibración de Candesartán.	35
Tabla 8. Estadística descriptiva para índice de viabilidad mucosa oral porcina en diferentes tiempos de experimentación.	42
Tabla 9. Coeficiente de permeabilidad aparente para Cafeína.	53
Tabla 10. Puntos de la Curva Calibración Candesartán	58
Tabla 11. Prueba t para evaluar la linealidad	59

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad del sistema cardiovascular que se manifiesta principalmente como la presencia crónica de una presión arterial (PA) en reposo mayor a 140/90 mmHg (Málek, 2013). Dentro del tratamiento farmacológico para esta patología se destaca el candesartán, que actúa bloqueando los receptores de la angiotensina II, sin embargo la biodisponibilidad absoluta del candesartán puede no superar el 15% (Husain et al., 2011). Esta baja biodisponibilidad está asociada a factores fisicoquímicos tales como la solubilidad, permeabilidad y su perfil de disolución, así como a factores fisiológicos tales como su baja absorción intestinal, el eflujo del fármaco y efecto de primer paso (Darwhekar et al., 2012).

Bajo este panorama, numerosos estudios en todo el mundo están siendo encaminados al diseño y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que puedan ser liberadas a través de rutas diferentes a la oral y/o parenteral, con el fin de tener una mejor actividad terapéutica (Amores et al. 2014). En este contexto, las rutas transepiteliales se han explorado como nuevas alternativas para la administración de fármacos y la mucosa oral se perfila como la más conveniente y accesible, (Giannola et al., 2008) porque es permeable, altamente vascularizada, (Aduba et al., 2013; Squier and Kremer, 2001) muestra tiempos de recuperación cortos después de la tensión o daño (Shojaei, 1998) y evita los efectos del primer paso.

Un importante número de formas farmacéuticas han sido desarrolladas y exploradas para facilitar la liberación de principios activos a través de la mucosa oral y para todas ellas los análisis de permeabilidad, mucoadhesión y liberación del fármaco, han sido indispensables y diferentes modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* han sido empleados para este fin (Squier, 1991).

Debido a la escasa disponibilidad de tejido bucal humano y las implicaciones éticas que conlleva su empleo en la experimentación científica, la mucosa bucal porcina (epitelio no queratinizado) se ha propuesto como un modelo *in vitro* adecuado para pruebas de permeabilidad de fármacos, debido su similitud en términos histológicos, morfológicos y de permeabilidad con la mucosa bucal humana (Nicolazzo et al., 2003) convirtiéndose en el modelo animal más utilizado para estos estudios.

Pruebas in vitro han demostrado a su vez, que la función de barrera de la mucosa se puede ver afectada por la pérdida de integridad y viabilidad de la mucosa, lo que hace necesario y fundamental emplear condiciones experimentales conlleven a la conservación de estas dos propiedades y así obtener datos más confiables y reproducibles en los ensayos de permeabilidad (Rathbone et al., 1994).

Es importante mencionar, que al revisar la literatura son evidentes las diferencias con respecto a los protocolos empleados para preparación, transporte y mantenimiento del tejido, así como las estrategias empleadas para realizar los análisis de permeabilidad. Todas estas variaciones llevaron a plantear la necesidad de implementar en el laboratorio la mucosa bucal porcina como modelo *ex vivo* para cuantificar la permeabilidad del candesartán.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad del sistema cardiovascular que se manifiesta principalmente como la presencia crónica de una presión arterial (PA) en reposo mayor a 140/90 mmHg (Málek, 2013). Se asocia con cambios estructurales y funcionales en órganos diana tales como el corazón, cerebro, riñones y vasos sanguíneos, así como con anomalías metabólicas, que aumentan el riesgo de eventos cardiovasculares fatales y no fatales (Cestário et al., 2018).

En el grupo de las enfermedades cardiovasculares (ECV), la HTA es el principal factor de riesgo de muerte y enfermedad en todo el mundo (5,2 millones de muertes en países desarrollados y 9,1 millones en países en desarrollo) (Ahad et al., 2014). En América Latina, el 13% de las muertes son atribuidas a la HTA y su prevalencia oscila entre el 21 y 33% (López-Jaramillo et al., 2013). Para Colombia, no hay un estudio reciente de prevalencia, sin embargo varios reportes coinciden en un valor cercano al 23%, siendo mayor en hombres (27,8%) y menor en mujeres (19,1%) (Cardona-Arias et al., 2016; Sanchez et al., 2009). En cuanto a la tasa de mortalidad, esta situó en 12,1 por cada 100.000 habitantes entre el 2005 y 2010 (Ministerio de Salud, 2017).

Varios factores de riesgo han sido relacionados con la aparición de esta enfermedad, entre estos la edad, sexo, consumo de alcohol, tabaco y estilo de vida. Recientemente, la periodontitis se reportó como otro factor de riesgo de la HTA y las evidencias sugieren que la relación entre estas patologías podría explicarse a través de dos vías, la primera indica que ambas comparten algunos factores de riesgo que contribuyen a su progresión, la segunda sugiere que puede presentarse una diseminación de componentes inflamatorios e infecciosos desde las lesiones periodontales hacia el torrente sanguíneo, causando una disfunción endotelial, cambios en la respuesta inmune y alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos (Leong et al., 2014; Martin-Cabezas et al., 2016).

En cuanto a su manejo terapéutico, en clínica se han empleado 5 grupos de fármacos: i) diuréticos tiazídicos, ii) bloqueadores de los canales de calcio, iii) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, iv) betabloqueadores y v) bloqueadores de los receptores de la angiotensina II (Sanchez et al., 2009). Este último grupo de fármacos bloquea el sistema renina-angiotensina,

mediante el antagonismo específico del receptor de la angiotensina II, una hormona vasoactiva del sistema renina-angiotensina que juega un papel importante en la regulación de la PA, en la fisiopatología de la HTA y del fallo cardíaco congestivo (Husain et al., 2011). El primer antagonista del receptor de angiotensina II descubierto, fue el losartán, luego aparecieron moléculas como el valsartán, irbesartán, telmisartán, eprosartán y el candesartán.

2.2. Candesartán

El candesartán es un polvo cristalino derivado de los benzimidazoles, con formula molecular $C_{24}H_{20}N_6O_3$ y un peso de 440,463 g/mol, figura 1. Es un fármaco de baja solubilidad y baja permeabilidad y de acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutica se ubica en el grupo IV (Darwhekar et al., 2012). Su uso clínico más significativo se centra en el tratamiento de la HTA en todos los grados. El candesartán antagoniza la acción de la angiotensina II bloqueando el receptor de la angiotensina tipo 1 (Husain et al., 2011). La afinidad a este receptor, es 80 veces mayor que la del losartán. Así mismo, se ha demostrado que la eficacia del candesartán podría ser mayor o al menos equivalente a la de muchos fármacos antihipertensivos usados en clínica mejorando su solubilidad y permeabilidad (Darwhekar et al., 2012).

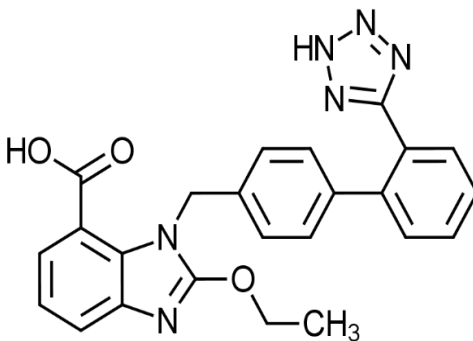


Figura 1. Estructura química candesartán. Adaptado desde (PubChem)

Debido a los problemas de absorción que tiene el fármaco, una serie de profármacos en forma de éster fueron sintetizados y el candesartán cilexetilo fue identificado como el compuesto con mejor actividad farmacológica después de su administración oral (Darwhekar et al., 2012), sin embargo la biodisponibilidad absoluta del candesartán puede no superar el 15% (Husain et al., 2011). Esta baja biodisponibilidad está asociada a factores fisicoquímicos tales como la solubilidad, permeabilidad y su perfil de disolución, así como a factores fisiológicos tales como su baja absorción intestinal, el eflujo del fármaco y efecto de primer paso (Darwhekar et al., 2012).

2.3. Mucosa oral como ruta alternativa para la liberación de fármacos

2.3.1. Consideraciones generales

Durante los últimos años, numerosos estudios en todo el mundo han centrado su atención en el diseño y desarrollo de nuevas tecnologías para la liberación de fármacos a través de rutas diferentes a la oral y/o parenteral, esto con el fin de aumentar su biodisponibilidad, obtener una mejor actividad terapéutica, menos efectos adversos y una mejor adherencia del paciente al tratamiento (Amores et al., 2014). Una de estas vías alternativas es la administración transmucosal oral de fármacos, la cual puede definirse como la administración de agentes farmacológicamente activos a través de la mucosa oral para conseguir efectos sistémicos (Sattar et al., 2014).

La mucosa oral comparada con otras mucosas ha demostrado ser el sitio más conveniente y de más fácil acceso para la liberación de agentes terapéuticos tanto de acción local como sistémico. Sus características ultra estructurales, la rápida recuperación después de exposición a estrés, su baja actividad enzimática y la abundante vascularización, favorece el acceso directo a la circulación sistémica, evita el efecto de primer paso y aumenta de la biodisponibilidad de un amplio número de fármacos (Roblegg et al., 2012).

Dentro de la cavidad oral, la administración de fármacos puede ser clasificada en tres categorías:

i) administración sublingual, se realiza a través de las membranas mucosas que recubren el piso de la boca y aplica para fármacos de acción sistémica; ii) administración local, se suministran fármacos a nivel periodontal y gingival para el tratamiento local de las úlceras, infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedad periodontal; iii) administración bucal, se efectúa a través de las membranas mucosas que recubren las mejillas, el área entre las encías y los labios superior e inferior y aplica para fármacos de acción local o sistémico (Bind et al., 2013).

Las mucosas en las diferentes regiones de la cavidad oral varían en propiedades fisiológicas, grados de queratinización, espesor y área superficial para administrar fármacos (Xia et al., 2015).

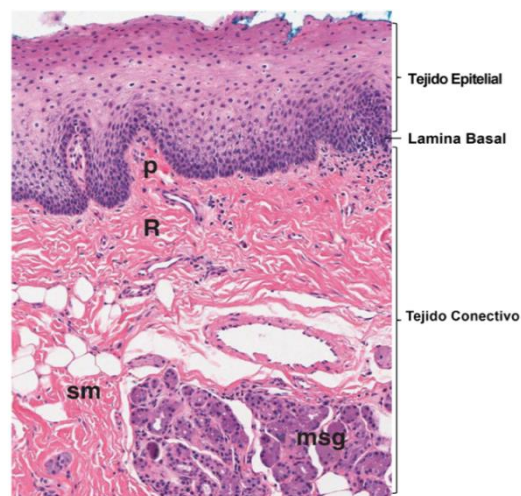
La región bucal, objeto de estudio de este trabajo, es una de las que posee mayor flujo sanguíneo y área superficial para la administración de fármacos, le siguen la región sublingual, gingival y palatina, las cuales comparten algunas propiedades entre sí (Xia et al., 2015). La región sublingual es la más ampliamente explorada para administrar fármacos, sin embargo, se prefiere para formulaciones de liberación inmediata y no se recomienda para sistemas de liberación sostenida.

La anatomía de la mucosa bucal, su perfil de permeabilidad y la habilidad para retener un sistema de liberación por un mayor lapso de tiempo, favorece una liberación de fármacos sostenida y de más larga duración (Harris and Robinson, 1992). En comparación con otros tejidos de la cavidad oral, la mucosa bucal es la más tolerante a los alérgenos potenciales y tiene una menor tendencia a daños irreversibles. Además, es un tejido bien vascularizado, relativamente inmóvil y tiene una actividad enzimática relativamente baja (Giannola et al., 2008).

Dentro las limitaciones, se ha reportado que una vez colocado el fármaco en el sitio de absorción, se restringen actividades como comer y beber por algunos minutos y existe la posibilidad de que el paciente pueda tragar el fármaco y perder su acción por el contacto con la saliva, adicionalmente fármacos que son inestables al pH bucal, que irritan la mucosa o tienen un sabor amargo o un olor desagradable no se pueden administrar por esta vía (Bobade et al., 2013).

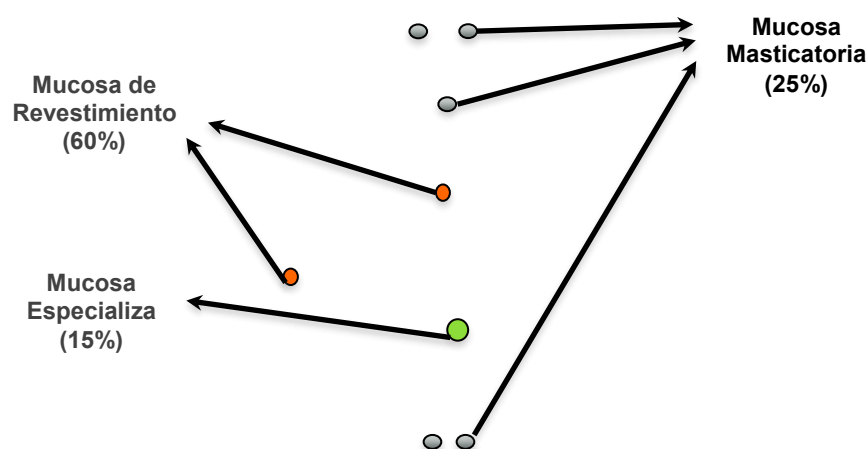
2.3.2. **Consideraciones fisiológicas y anatómicas**

La mucosa oral ésta compuesta por dos capas de tejidos diferentes: **tejido epitelial**, de origen ectodérmico, cuya función ésta dirigida a proteger tejidos y órganos del trauma mecánico y químico y el **tejido conectivo**, de origen mesenquimal, que consta de pocas células y de una extensa matriz, la cual proporciona soporte mecánico y nutrientes al epitelio. Los dos tejidos están unidos a través de la lámina basal, figura 2 (Squier and Kremer, 2001).



El **tejido epitelial** es escamoso estratificado, el cual será queratinizado o no queratinizado, dependiendo de la ubicación anatómica y de su función en la cavidad oral. La mucosa masticatoria que tapiza el paladar y las encías las cuales son regiones sometidas a fuerzas

mecánicas como la masticación, presentan un epitelio queratinizado y constituyen el 25% de la totalidad de la mucosa oral; un 60% ésta compuesta por mucosa de revestimiento, de la que hacen parte el piso de la boca, la región bucal y labial sitios que requieren mayor flexibilidad para llevar a cabo el proceso masticación, deglución y fonación y que se encuentran tapizadas por un epitelio no queratinizado. La lengua esta revestida por una mucosa especializada, debido a que allí están contenidos los botones gustativos y corresponde al 15% restante, figura 3 (Squier and Kremer, 2001).



El **tejido conectivo** está compuesto por la lámina propia, que es un tejido conectivo laxo, hidratado compuesto de fibras de colágeno, músculo liso y capilares y no muestra ningún efecto significativo sobre la permeación de fármacos (Campisi et al., 2010). La submucosa, está formada por tejido conectivo más denso con algunas glándulas salivales accesorias rodeadas por las células mioepiteliales (Hooda et al., 2012; Pather et al., 2008; Shojaei, 1998; Squier, 1991). Adicionalmente, las regiones queratinizadas y no queratinizadas de la cavidad oral difieren entre sí en términos de composición de lípidos, espesor y perfil de permeabilidad (Hooda et al., 2012).

En la tabla 1, se resumen estas y otras características de la cavidad oral.

Tabla 1. Características fisiológicas de la cavidad oral.

Región	Grado de Queratinización	Flujo Sanguíneo (mL/min/100g de tejido)	Superficie de absorción de fármacos (cm ²)	Espesor del epitelio (μm)	Perfil de Permeabilidad	pH
Bucal	No Queratinizada	22,78	50,2	500-800	Intermedio	6,3
Sublingual	No Queratinizada	12,23	13,3	100-200	Alto	6,5
Gingival	Queratinizada	19,54	46,6	100-200	Bajo	6,8

La Información en la tabla fue adaptada desde de (Sattar et al., 2014; Xia et al., 2015)

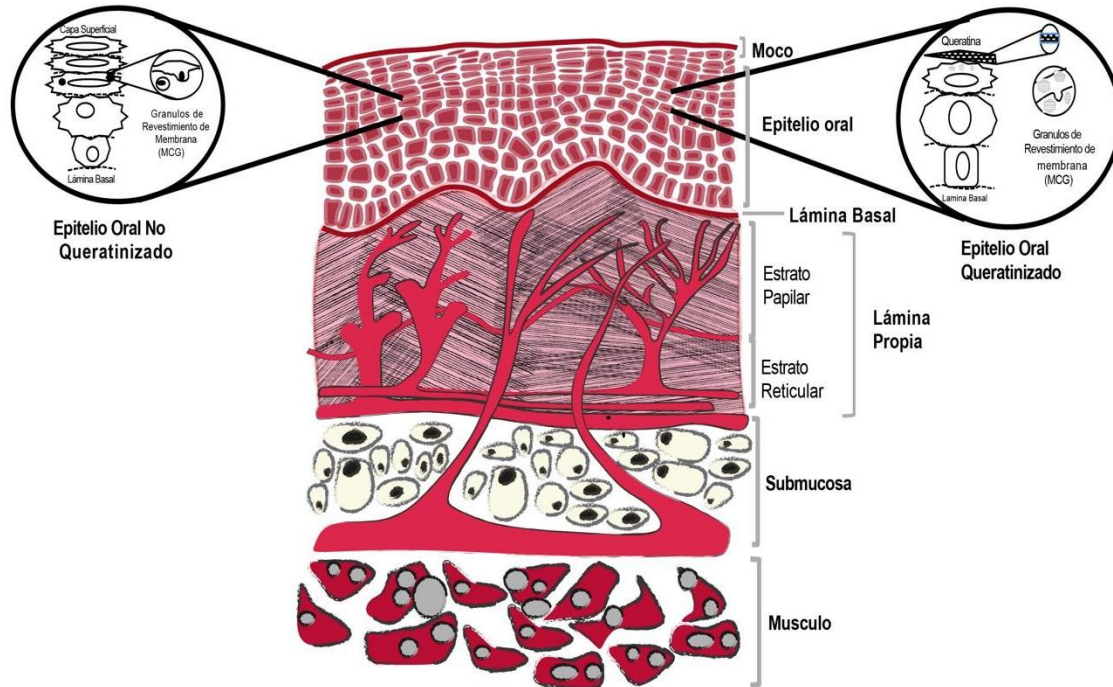
2.3.3. *Consideraciones sobre función barrera de la mucosa oral*

La función barrera de la mucosa oral es la responsable de evitar que materiales exógenos y endógenos entren al cuerpo a través de la mucosa oral, además es quién impide la pérdida de fluidos de los tejidos subyacentes hacia el medio externo. En el contexto de la absorción de fármacos, es quien genera la resistencia al movimiento de los fármacos a través del epitelio bucal (Kulkarni et al., 2009a; Sankar et al., 2011)

La naturaleza de esta barrera puede ser metabólica o fisicoquímica, la barrera metabólica se refiere a la influencia que puede tener la actividad enzimática de la cavidad oral sobre el tránsito de xenobióticos a través del epitelio. Cabe señalar que, aunque el metabolismo oxidativo en la cavidad oral es limitado (Vondracek et al 2001), enzimas como las aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dehidrogenasas y eterasas presentes en las membranas mucosales pueden causar la biotransformación de moléculas administradas a través de la cavidad oral y limitar su paso a través del epitelio (Kolli & Pather 2015).

La barrera fisicoquímica está determinada principalmente por la presencia de un material derivado de los gránulos de recubrimiento de membrana “membrane-coating granules” (MCGs), cuyo contenido se descarga en los espacios intercelulares del tercio superior del epitelio (Hooda et al., 2012; Morantes et al., 2018; Pather et al., 2008; Shojaei, 1998; Squier, 1991). Los MCGs del epitelio queratinizado se componen de lípidos laminares e incluyen esfingomielina, glucosilceramidas, ceramidas y otros lípidos no polares, mientras que en el epitelio no queratinizado, los MCGs son no laminares y los principales componentes lipídicos son ésteres de colesterol y glicosfingolípidos (Hooda et al., 2012; Morantes et al., 2018; Pather et al., 2008;

Shojaei, 1998; Squier, 1991). Cabe señalar que esta diferencia en la naturaleza química de los lípidos contribuye a las diferencias en la permeabilidad observada entre estos tejidos, figura 4. (Nicolazzo et al., 2005).



Además de los lípidos intercelulares de la mucosa oral, existen otras barreras que pueden reducir su permeabilidad (Nicolazzo and C.Finnin, 2008). La lámina basal por ejemplo, tiene aproximadamente de 1-2 mm de espesor, lo cual podría contribuir con la función de barrera de la mucosa oral (Hooda et al., 2012; Pather et al., 2008; Shojaei, 1998; Squier, 1991), aunque se ha demostrado que la mayor resistencia está dada en las capas superficiales del epitelio (Nicolazzo and C.Finnin, 2008).

La saliva, podría también ejercer algún tipo de barrera sobre la mucosa oral, aunque ésta puede verse afectada en cantidad y composición entre los individuos debido patologías, fármacos utilizados para el control de las mismas y el momento del día en la que es evaluada (Nicolazzo and C.Finnin, 2008). El volumen total de secreción salival diaria oscila entre 0,5-2,0 L, sin embargo, el volumen constante de saliva es de aproximadamente 1,1 L (Sudhakar et al., 2006).

Por otro lado, la saliva mantiene el entorno fisiológico de la cavidad oral en un equilibrio constante debido al pH, volumen de líquido y sus componentes. Es producida por las glándulas salivales, las glándulas salivales mayores producen la mayor cantidad de agua, mientras que las glándulas salivales menores producen saliva viscosa (Morantes et al., 2018; Narang and Sharma, 2011; Rathbone et al., 1994; Sudhakar et al., 2006).

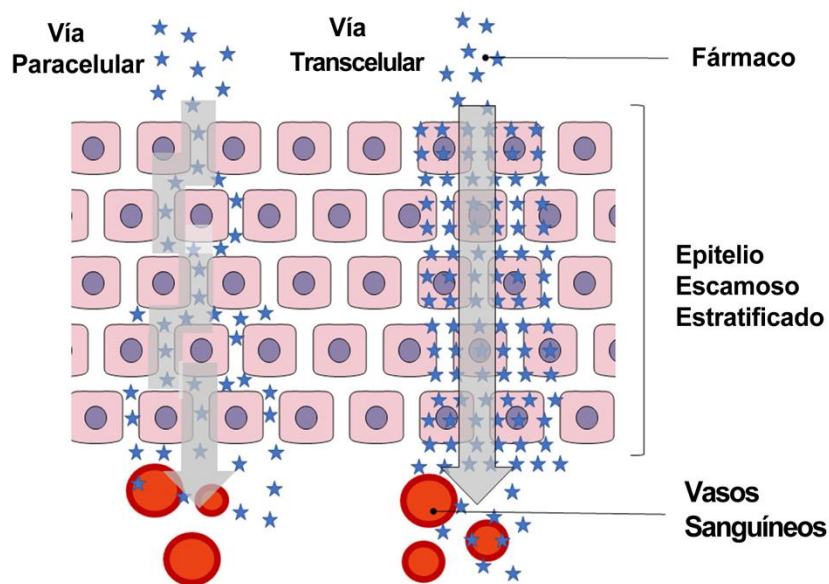
Adicionalmente, la saliva forma sobre la mucosa bucal una "película salival" cuyo espesor puede variar entre 70 a 100 micras, (Nicolazzo and C.Finnin, 2008) la cual desempeña un papel importante como barrera para el transporte de compuestos hidrófilos (Morantes et al., 2018; Narang and Sharma, 2011; Rathbone et al., 1994)

El moco es una sustancia fundamental que rodea las células epiteliales de la mucosa oral y tiene un grosor que varía entre 40 a 300 μm . Actúa como lubricante permitiendo cierto movimiento entre célula y célula. Está compuesto por agua, proteínas, carbohidratos y glicoproteínas como la mucina (1-5%), se organiza formando una red tridimensional que le confiere cierta barrera a la mucosa (Morantes et al., 2018; Pather et al., 2008; Shojaei, 1998; Sudhakar et al., 2006; Wertz and Squier, 1991).

2.3.4. *Rutas de transporte de fármacos a través de la mucosa oral*

El mecanismo de permeación para un compuesto en particular, depende de sus propiedades físicas y químicas. La masa molar, hidrofiliidad, lipofilia y polaridad determinan la ruta de transporte a través de la mucosa oral. Teniendo en cuenta esto y la función barrera que ejerce la mucosa oral frente agentes exógenos, es posible distinguir tres mecanismos de permeación (i) difusión pasiva, ii) transporte mediado por portadores (iii) endocitosis (Fonseca-Santos and Chorilli, 2018; Sankar et al., 2011).

La difusión pasiva es la forma mayoritaria en la que los fármacos o compuestos se absorben a través de la mucosa oral e incluye la ruta paracelular (entre las células), la cual actúa como principal barrera a la permeación de compuestos lipofílicos y favorece el transporte de compuestos hidrofílicos; y la ruta transcelular (a través de las células) la cual actúa como barrera principal para el transporte compuestos hidrófilos y favorece el de compuestos hidrofóbicos, figura 5, (Campisi et al., 2010; Morantes et al., 2018; Sankar et al., 2011; Sudhakar et al., 2006; Wertz and Squier, 1991)



Un número más reducido de compuestos permean la mucosa oral por la vía de transporte mediada por portadores, moléculas como la glucosa, la vitamina C, ácido nicotínico, nicotinamida, aminoácidos y fármacos como el cefadroxil, ciprofloxacina y antihipertensivos como el **captopril**, **lisinopril** y el **enalapril**, difunden a través del epitelio por este mecanismo (Pather, 2015).

La endocitosis es un mecanismo que juega un papel menos importante para la absorción de fármacos en la cavidad oral, sin embargo, puede ser trascendental para el transporte de fármacos de origen biotecnológico y/o transporte de macromoléculas (Castro et al., 2016).

2.4. Consideraciones generales sobre permeabilidad

La permeabilidad se refiere a la propiedad de una barrera para permitir el paso de diferentes moléculas, la cual puede alterarse tanto por exceso del paso como por defecto (Sankar et al., 2011). La entrada de un fármaco a un tejido es llamada permeación o penetración, mientras que la absorción hace referencia al movimiento de moléculas a través de una barrera biológica desde el sitio de administración hacia el torrente sanguíneo (Bermejo and Gonzalez-Alvarez, 2009). La tasa y cantidad de fármaco que se absorbe a través una barrera pueden ser influenciadas por la permeabilidad, así como por las propiedades fisicoquímicas del fármaco y factores ambientales propios del sitio de absorción (Pather, 2015).

El fenómeno de transporte de fármacos a través de una membrana semipermeable está determinado por las leyes de Fick. La primera ley de Fick describe que el flujo va desde una

región de alta concentración a una región de baja concentración con una magnitud que es proporcional al gradiente de concentración. La segunda ley predice la forma en que la difusión causa que la concentración cambie con el tiempo. De acuerdo con estos principios cuando un fármaco o sustrato alcanza una concentración equivalente o similar a ambos lados de una membrana semipermeable se interrumpe el transporte neto (Brodin et al., 2010).

La difusión de un fármaco a través de una barrera puede explicarse teniendo en cuenta parámetros como el coeficiente de difusión, flujo, tiempo de latencia y coeficiente de permeabilidad los cuáles serán descritos a continuación.

El coeficiente de difusión (D) es una constante que relaciona las propiedades de una molécula dada en un solvente dado. Este coeficiente depende del tamaño de la molécula y viscosidad del solvente y se incrementa con la lipofilicidad del compuesto o se disminuye con su peso molecular.

El flujo (J) define la cantidad de fármaco que difunde a través de un área en una unidad de tiempo, puede ser expresado como una unidad de masa/area/tiempo o unidades de radioactividad/área/tiempo, por ejemplo: mol/cm²/ min; µg/cm²/ min o cpm/cm²/ min, y puede ser calculado empleando la ecuación E.1.

Ecuación E.1.

$$J = \frac{m}{A t}$$

Donde J es el flujo del compuesto, (m) representa la cantidad de compuesto moviéndose a través de una barrera, en un área (A) y tiempo determinado (t) (Brodin et al., 2010).

El coeficiente de permeabilidad (P_{app}), describe la tasa de permeación de una especie molecular por unidad de concentración, es expresado en distancia/tiempo (cm/s; cm/h). Puede ser calculado desde la pendiente de la región lineal de una curva que representa la concentración del fármaco frente al tiempo de muestro empleando la ecuación E.2. (Volpe 2008)

Ecuación E.2.

$$P = \left(\frac{dCr}{dt} \right) * \left(\frac{Vr}{A * Co} \right)$$

Donde **P_{app}** es el coeficiente de permeabilidad aparente; **dCr/dt** es la pendiente de la gráfica de la concentración acumulada en la cámara receptora versus tiempo; **Vr** es el volumen de la cámara receptora; **A** área de la mucosa disponible para la permeación y **Co** es la concentración de la cámara donadora (Castro et al., 2016)

2.5. Modelos para evaluar permeabilidad de fármacos

La permeabilidad de compuestos a través de la mucosa oral puede ser evaluada a través de modelos *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* e *in situ*. Los modelos *in vivo* se emplean en estudios de biodisponibilidad de fármacos. Los modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* están direccionados hacia la evaluación de mecanismos de transporte y el uso de potenciadores químicos para mejorar la permeabilidad de la mucosa bucal (Nicolazzo and C.Finnin, 2008).

Debido a la escasa disponibilidad de tejido bucal humano y las implicaciones éticas que conlleva su empleo en este tipo experimentación, se ha optado por emplear mucosa bucal de conejos, perros, monos, hámsteres y cerdos (Squier & Kremer, 2001). Sin embargo, la mucosa bucal porcina por su similitud a la mucosa bucal humana en estructura, morfología y función barrera se ha sugerido como el modelo “gold estándar” en estudios de permeación y absorción de fármacos *in vitro* (Nicolazzo et al., 2003; Kulkarni et al., 2009).

En la tabla 2, se compara la estructura, espesor y permeabilidad del epitelio de deferentes modelos animales.

Tabla 2. Comparación de la mucosa bucal de diferentes mamíferos

Modelo	Estructura del tejido	Espesor de la membrana bucal (µm)(media±DS)	Permeabilidad para agua tritiada (×10 ⁷ cm/min) (media±DS)
Humana	No-queratinizada	580±90	579±122
Perro	No-queratinizada	126±20	1045±37
Hamster	Queratinizada	115.3±11.5	No disponible

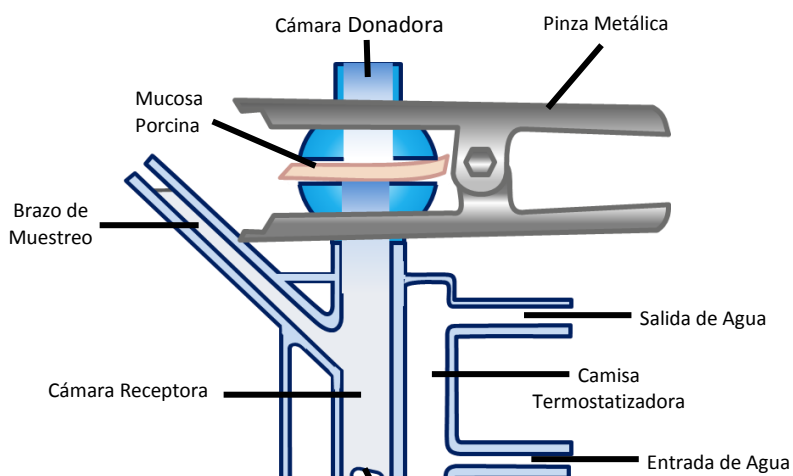
Cerdo	No-queratinizada	772±150	634±60
Conejo	Parcial/ Queratinizada	600	No disponible
Rata	Queratinizada	No disponible	No disponible
Mono	No-queratinizada	271±50	1025±154

Tomado de (Patel et al., 2012).

La absorción a través de la mucosa oral ha sido estudiada para una amplia gama de moléculas con actividad farmacológica. Tanto modelos *in vitro* como modelos *in vivo* han sido empleados con este fin. Los estudios *in vivo* descritos en la literatura implican la aplicación del fármaco como una solución, gel o dispositivo sobre la mucosa bucal del cerdo seguido de toma de muestras de plasma. Los estudios *in vitro* implican el montaje del tejido bucal porcino en cámaras de ussing, celdas de franz o dispositivos de difusión similar que se encuentran comercialmente disponibles (Kulkarni et al., 2009b, 2010a; Nielsen and Rassing, 2002; Patel et al., 2012; Sattar et al., 2014).

2.5.1. Celdas de Franz

Las celdas de Franz, son los dispositivos más utilizados para evaluar la permeabilidad *in vitro* transepitelial y/o transmucosal, están compuestas por dos cámaras, una donadora y otra aceptora, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra, figura 6. En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras que difunden a través de la barrera o membrana utilizada, posteriormente estas son cuantificadas mediante técnicas analíticas. Cabe señalar que entre los parámetros que influyen en la difusión de cualquier compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el medio del compartimento receptor, el tipo y naturaleza de la membrana empleada en el ensayo (Baena et al., 2011; Kulkarni et al., 2010a; Ng et al., 2010).



2.5.2. **Moléculas control de permeabilidad**

Para evaluar la permeabilidad de la mucosa bucal *in vitro* se han propuesto dos compuestos modelo con diferentes propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, diferentes rutas de transporte. La cafeína (CAF) se eligió como un marcador hidrófilo y el estradiol (E2) como marcador lipofílico (Nicolazzo et al., 2004).

Cafeína

La cafeína (CAF) es un alcaloide del grupo de las xantinas, que pertenece a la familia de las metilxantinas, que también incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar y con equivalentes efectos en el organismo. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de 194,19 g/mol (Albarracín et al., 2018) y un punto de fusión de 237°C (PubChem). Debido a su naturaleza hidrofílica, CAF permearía preferentemente a través de la ruta paracelular, figura 7 (Nicolazzo et al., 2004).

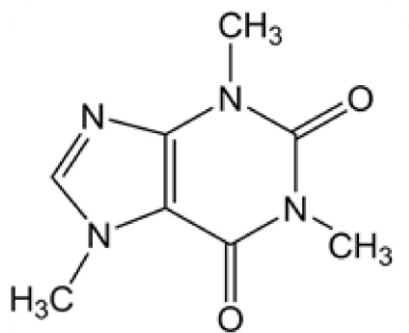


Figura 7. Estructura de la cafeína. (Perera et al., 2010)

2.5.3. **Estradiol**

Contrario a la Cafeína, el estradiol (E2) ha sido considerado como una molécula control de menor paso a través de la mucosa oral y probablemente permearía a través de los dominios lipídicos del epitelio (Nicolazzo et al., 2004). Su fórmula química es $C_{18}H_{24}O_2$, tiene características no polares, lo que lo hace insoluble en el agua y muy soluble en éter y etanol. Entre sus propiedades físicas más relevantes se encuentra su peso molecular de 272.38 g/mol, su estado físico que es sólido en forma de cristal, su color es blanco-marfil y presenta un punto de fusión de 175-180°C, figura 8 (Havlíková et al., 2006; PubChem).

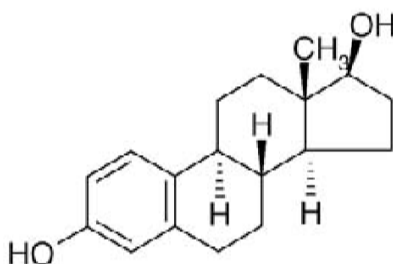


Figura 8. Estructura Química del Estradiol. (Havlíková et al., 2006)

2.6. **Consideraciones sobre la integridad y viabilidad de la mucosa oral porcina**

2.6.1. **Evaluación de la integridad de la mucosa oral porcina**

Se ha descrito que previo a cualquier estudio de difusión de fármacos es necesario garantizar que la mucosa empleada este intacta, esto con el fin de asegurar que los perfiles de permeabilidad obtenidos no sean consecuencia de una mucosa comprometida. Actualmente, los daños o pérdidas de integridad de la mucosa pueden ser detectados con el uso de marcadores. Uno de los más ampliamente usados es el dextrano de alto peso molecular marcado con isotiocianato de fluoresceína -FITC (FD-20), para el cual se ha demostrado que solo difunde a través de la mucosa bucal porcina cuando la integridad del tejido está comprometida (Kulkarni et al., 2010b; Nicolazzo and C.Finnin, 2008; Nicolazzo et al., 2003)

El empleo de FD-20 como marcador de integridad esta soportado en un estudio publicado por (Hoogstraate et al., 1994), en donde se evalúa la permeabilidad de la mucosa bucal porcina frente

a dextrano de diferentes pesos moleculares. En este estudio se demuestra que solo dextranos con un peso molecular menor a 20 kDa permean el epitelio de la mucosa bucal (Hoogstraate et al., 1994). Investigaciones más recientes sugieren que la detección de más del 0,1% de este marcador en la cámara receptora de una celda de Franz, después de 4h de experimentación, es un indicativo de pérdida de integridad tisular (Kulkarni et al., 2010a).

Otros autores refieren el empleo de marcadores no absorbibles tales como el rojo fenol, el manitol, inulina, PEG y amarillo lucifer para realizar estudios de integridad tisular, sin embargo, pueden ser más costosos y requieren mayores precauciones para su empleo (Pather, 2015). Otra técnica que se usa con menor frecuencia es el análisis de pérdida de agua transmucosa (TMWL), un parámetro que mide la cantidad de agua que pasa desde las capa más externas de la mucosa hacia la atmosfera por procesos de evaporación y/o difusión (Amores et al., 2014).

2.6.2. *Evaluación de la viabilidad de la mucosa oral porcina*

Esta ampliamente demostrado que la habilidad que tiene un epitelio para formar una barrera efectiva está influenciada por la conservación de su viabilidad; si la viabilidad se reduce la función barrera se ve comprometida (Erickson-DiRenzo et al., 2016). Diferentes estrategias han sido implementadas con el fin de garantizar la viabilidad de la mucosa antes y durante los ensayos de permeación. La elección del medio de transporte, el método de separación del epitelio, los límites del uso de tejidos en condiciones experimentales *in vitro* y en general las condiciones de manejo y procesamiento de las mucosas han sido determinantes para garantizar la viabilidad del tejido (Kulkarni et al., 2010b; Nicolazzo et al., 2003).

(Kulkarni et al., 2010) ha demostrado que el medio de transporte de las mucosas porcinas condiciona el rango de tiempo en él se mantienen viables las muestras, las cuales al ser transportadas en PBS permanecen viables por un periodo de 4 h después del sacrificio, mientras que cuando son transportadas KBR la viabilidad puede mantenerse hasta por 6 h (Shojaei et al., 2001)

Dentro de las pruebas más usadas para evaluar la viabilidad de las mucosas está el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), una sal de color amarillo soluble en agua que es transformada por las reductasas mitocondriales a un compuesto coloreado de color azul llamado formazán el cual es insoluble y requiere ser liberado

desde el citoplasma de las células a través de una disgregación mecánica del tejido y adición de DMSO para disolver los cristales. (Mossman, 1983).

Este método ha sido muy utilizado para medir de manera indirecta la supervivencia y proliferación celular (Mossman, 1983), esto debido a que ha mostrado ser una prueba fácil, fiable, sensible y reproducible que se puede realizar rutinariamente en la mayoría de los laboratorios (Imbert & Cullander, 1997)

2.6.3. Evaluación de la viabilidad e integridad a través de histología

La evaluación histológica de las mucosas porcinas permite confirmar que tan viable e integra se encuentra la mucosa, posterior a los estudios de permeabilidad.

Dentro de los criterios que pueden evaluarse a nivel histológico se destacan: el espesor del epitelio, la morfología celular, la presencia o ausencia de núcleos picnóticos y conservación de la membrana basal (Moharamzadeh, K., Franklin, K. L., Smith, L. E., Brook, I. M., & van Noort, 2014)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fármacos antihipertensivos en su mayoría se administran a la circulación sistémica por vía oral convencional, pero su absorción puede verse afectada por el entorno gastrointestinal (Joseph A. & Barrie C. 2008), donde el fármaco es sometido a grandes cambios de pH, debe resistir la acción de las enzimas que digieren los alimentos, así como el metabolismo de la microflora propia de éste lugar (Hooda et al. 2012).

Otro problema de la administración de fármacos por vía oral son los extensos procesos de degradación presistémicos en el intestino y / o el hígado, dando lugar a la absorción inadecuada o errática y baja biodisponibilidad (Hooda et al. 2012; Giannola et al. 2008). La vía parenteral ha logrado superar estos inconvenientes, pero no puede conseguir el mantenimiento de los niveles de fármaco adecuados durante el tiempo que se necesita, lo que conlleva a altos costos y pobre cumplimiento del paciente, especialmente en terapias a largo plazo (Giannola et al. 2008).

Se estima que el 25% de la población tiene dificultades para tomar los comprimidos y cápsulas y, por tanto, no hay toma de los medicamentos según lo prescrito por su médico, lo que conduce a una terapia ineficaz (Hooda et al. 2012). Esta dificultad se experimenta especialmente en pacientes pediátricos y geriátricos (Squier & Kremer 2001), en estos casos, la administración de fármacos se prefiere a través de otras rutas entre las que se prefiere la mucosa oral (Hooda et al. 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior el sector académico y la industria farmacéutica durante los últimos años han centrado su interés en el diseño y formulación de formas farmacéuticas que puedan ser administradas a través de la mucosa oral, de forma paralela se han desarrollado modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* para evaluar la funcionalidad de estas formulaciones.

El grupo UIBO de la Universidad El Bosque actualmente trabaja en el diseño y formulación de un hidrogel como sistema innovador para administrar candesartán a través de la mucosa oral, sin embargo no se cuenta con un modelo para evaluar su funcionalidad y se desconoce el fenómeno de difusión del candesartán libre a través de esta barrera.

Esta limitante despertó la necesidad de trabajar en la búsqueda, selección e implementación de un modelo *ex vivo* que pudiera ser usado para este fin. En este contexto este trabajo se enfocó en: i) la implementación del modelo *ex vivo* para realizar los ensayos de difusión de fármacos; ii)

la evaluación del fenómeno de difusión de los controles cafeína, estradiol y candesartán libre a través de la mucosa oral.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años numerosos estudios en todo el mundo han centrado su atención en el diseño y desarrollo de nuevas tecnologías para la liberación de fármacos a través de rutas diferentes a la oral y/o parenteral, esto con el fin de obtener una mejor actividad terapéutica, menos efectos adversos y una mejor adherencia del paciente al tratamiento (Amores et al. 2014).

En el proceso, la cavidad oral se ha perfilado como un sitio adecuado para la administración de fármacos (Amores et al. 2014), y en especial para aquellos usados para el tratamiento de enfermedades crónicas (De Caro et al. 2009). La cavidad oral como vía de administración tiene varias ventajas: los medicamentos administrados por esta vía evaden los efectos del metabolismo del primer paso, evitan la eliminación dentro del tracto gastrointestinal y pueden mejorar su absorción (Shojaei 1998).

Por otro lado, la mucosa oral es particularmente deseable durante una situación de emergencia en donde se requiere una rápida respuesta clínica. También ha sido importante para la administración de fármacos en aquellos pacientes en estados de inconsciencia o con problemas de deglución. En comparación con la administración parenteral, la administración vía mucosa oral es relativamente simple, no invasiva y evita los riesgos de infecciones o lesiones asociadas a la vía parenteral (Lam et al. 2014; Sattar et al. 2014).

Un importante número de formas farmacéuticas han sido desarrolladas y exploradas para facilitar la liberación de principios activos a través de la mucosa oral, para todas ellas los análisis de permeabilidad, mucoadhesión y liberación del fármaco, han sido indispensables y diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* y *ex vivo* han sido empleados con este fin (Squier 1991).

Dentro de los modelos *ex vivo* más usados para estudios de permeabilidad, se destaca el empleo de cámaras de difusión de Franz, un sistema que permite determinar la cantidad y velocidad con la que un fármaco difunde a través de una barrera de origen sintético o animal. (Kulkarni et al. 2010) (Baena et al. 2011) Entre las barreras de origen animal, la mucosa bucal porcina es una de las más empleadas, debido a su relativa similitud a la mucosa humana, por consideraciones éticas y por el bajo costo que tiene su adquisición (Squier 1991).

Es importante mencionar, que al revisar la literatura son evidentes las diferencias con respecto a los protocolos empleados para preparación, transporte y mantenimiento del tejido, así como las

estrategias empleadas para realizar los análisis de permeabilidad. Todas estas variaciones y la necesidad de implementar en el laboratorio la mucosa bucal porcina como modelo *ex vivo* para cuantificar la permeabilidad del candesartán libre y en hidrogel, soportan la ejecución de este trabajo.

5. SITUACIÓN ACTUAL

El primer registro sobre administración de fármacos a través de la mucosa oral, es atribuido al Dr. William Murrell, quien reportó los beneficios clínicos de la administración sublingual de nitroglicerina para el manejo de los pacientes que padecen angina de pecho (Sattar et al. 2014). Por otro lado, Beckett y Triggs en 1967, demostraron de forma concluyente que algunos fármacos que son administrados por la vía peroral, también pueden absorberse a través de la mucosa oral (Sattar et al. 2014).

En los últimos años el número de moléculas administradas a través de la mucosa oral se ha ampliado, fármacos como la asenapina, buprenorfina, extractos de cannabis, el fentanilo, midazolam, naltrexona, proclorperazina, la selegilina, zolpidem entre otras, han sido administrados por esta ruta (Sattar et al. 2014). En cuanto al desarrollo de formas de dosificación bucal se pueden mencionar, pastas de dientes, enjuagues bucales, pastillas, geles, pomadas, micropartículas, chicles, parches, tabletas y algunas formas farmacéuticas especializadas como son los hidrogeles (Priya et al. 2006).

Investigaciones recientes sobre polímeros, han permitido desarrollar sistemas de liberación bucal capaces de mantener una liberación constante del fármaco en la circulación sistémica, evitando picos transitorios en la concentración de fármaco, propios de las dosis múltiples diarias, y disminuyendo los riesgos de efectos secundarios. La difusión eficaz y prolongada del fármaco en estos sistemas de liberación, solo se hace posible si se establece un estrecho contacto con la mucosa, de esta manera se genera una alta concentración y se favorece un alto flujo de fármaco a través de esta barrera (De Caro et al. 2009).

Para el candesartán, se han publicado algunas aproximaciones con las que se ha buscado mejorar su biodisponibilidad a través de su liberación vía mucosa oral (Ashok et al. 2011) y vía transdérmica (Ertel 2011), sin embargo solo se ha estudiado el profármaco. Este trabajo constituye el primer estudio de difusión de candesartán a través de mucosa oral.

La mucosa bucal porcina ha sido empleada como modelo *in vitro* para la evaluación de la cinética de permeación de un amplio número de moléculas con diferente actividad farmacológica y naturaleza química, en varios de estos estudios, se emplea la cafeína y estradiol como moléculas control (Caro et al., 2008; Díaz et al., 2005; Thakur et al., 2007; Sutariya et al., 2005; Patel et al., 2011; Kokate et al., 2008).

Joseph A. Nicolazzo, es uno de los pioneros en la investigación en mucosa bucal porcina. Su primer trabajo fue publicado en el 2003, en donde establece las condiciones experimentales para

evaluar el coeficiente de permeabilidad para cafeína (Nicolazzo et al., 2003). En este mismo año Nicolazzo y colaboradores evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de SDS sobre el fenómeno de difusión para este compuesto (Nicolazzo et al., 2003). En el 2004 y 2007, otros trabajos muestran el efecto de diferentes potenciadores (Nicolazzo et al., 2004; Thakur et al., 2007).

Entre otros estudios en los que se han empleado modelos *in vitro* de mucosa oral porcina se destaca el de Kulkarni y colaboradores en 2008, quienes evaluaron la contribución del epitelio y el tejido conectivo sobre la permeabilidad de moléculas control y a su vez realizaron pruebas de viabilidad e integridad de las mucosas usadas en estos ensayos; en el 2009, evaluaron cómo factores biológicos y las condiciones experimentales influyen en coeficiente de permeabilidad (U. Kulkarni et al., 2008; Kulkarni et al., 2009) En el 2011 se evaluó la influencia de la temperatura de experimentación (Kulkarni et al., 2011). El estudio más reciente fue realizado por Sanabria en el año 2017, en este trabajo se evaluó la influencia de diferentes variables experimentales sobre la cinética de permeabilidad de la cafeína en mucosa oral porcina (Sanabria, 2017).

6. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Evaluar un modelo *in vitro* para el estudio de la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán.

5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la viabilidad e integridad de la mucosa oral porcina como criterios de selección para estudios de permeabilidad *in vitro*.
- Evaluar y comparar la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente al candesartán y frente a moléculas control.
- Evaluar el efecto del pH sobre la permeabilidad de la mucosa oral porcina expuesta a candesartán

7. METODOLOGÍA

6.1. Tipo de estudio

- Experimental *In Vitro*

6.2. Población y muestra

- Mucosa Oral Porcina.
- Para los análisis de permeabilidad se emplearon celdas de Franz cargadas con mucosa oral porcina. Cada celda se consideró una unidad experimental.

6.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información

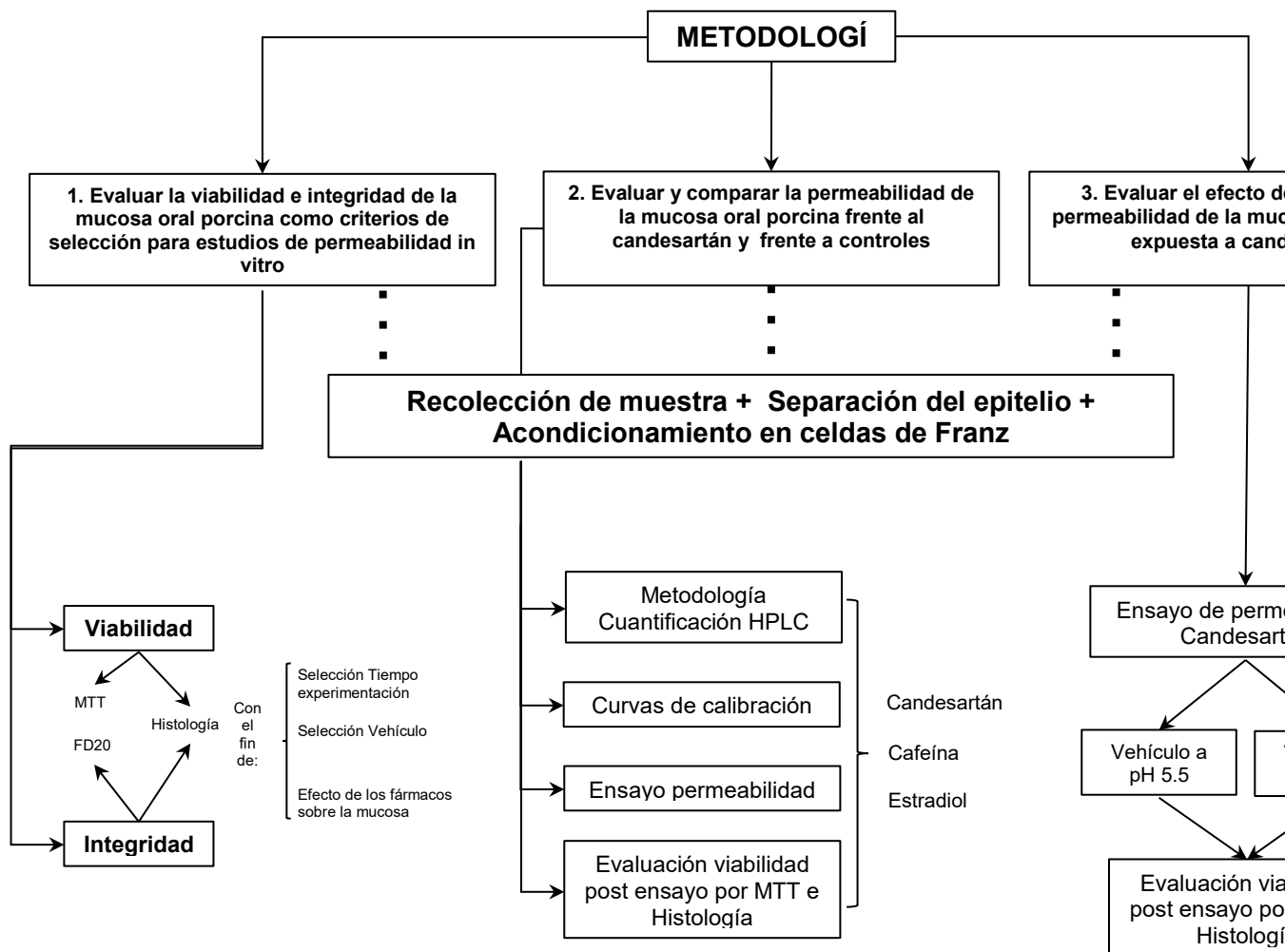
En la figura 9 se presenta un esquema general de la estrategia metodológica empleada para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo. Los detalles de cada uno de los procedimientos se presentan a continuación.

7.3.1. *Primer Objetivo: Evaluar la viabilidad e integridad de la mucosa oral porcina como criterios de selección para estudios de permeabilidad in vitro.*

Recolección y preparación de la muestra

El tejido bucal de los cerdos se obtuvo de sitios de sacrificio animal (Frigorífico Ble) de la ciudad de Bogotá, 30 minutos posteriores al sacrificio y hasta máximo una hora después del mismo. La edad de los animales osciló entre 4 y 6 meses con peso promedio de 80 a 110 kg.

De cada cerdo se tomó una muestra de la mucosa bucal de aproximadamente 5x5 cm de área y 0,5 a 1 cm de profundidad, procurando obtener muestras con una superficie lisa y sin hematomas, las muestras fueron lavadas con solución salina (NaCl al 0,9%) para remover restos de sangre y transportadas al laboratorio en solución de Krebs-Ringer (Krebs) bicarbonato a un pH de 7,4, gaseado con carbógeno 4°C.



Separación del epitelio mediante técnica de calor

Las muestras de mucosa fueron dispuestas en un vaso de precipitado con solución salina previamente atemperada a 60°C, se incubaron por un minuto y con la ayuda de una espátula fina, se procedió a separar el epitelio del tejido conectivo evitando causar daño o ruptura, figura 10. El epitelio separado, se dejó en una caja de petri con 10 ml de solución de Krebs, teniendo precaución de hacia dónde se ubicaba la zona de membrana basal y superficie epitelial, ya que esto fue de vital importancia para realizar el acondicionamiento de la mucosa en la celda de Franz. Cuando no se tuvo claridad de la orientación de la mucosa, las muestras se observaron al estereoscopio, identificando una porosidad nítida hacia la superficie basal y una superficie más lisa hacia la zona epitelial, figura 11.

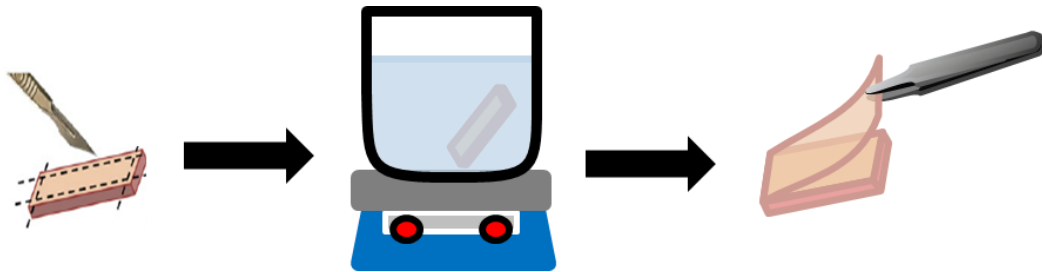
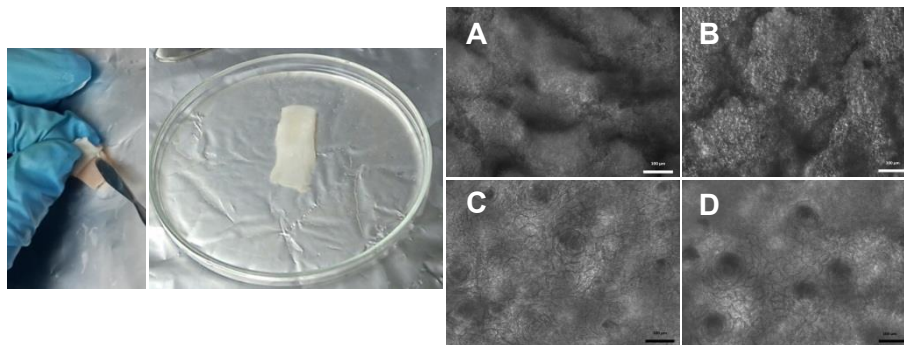
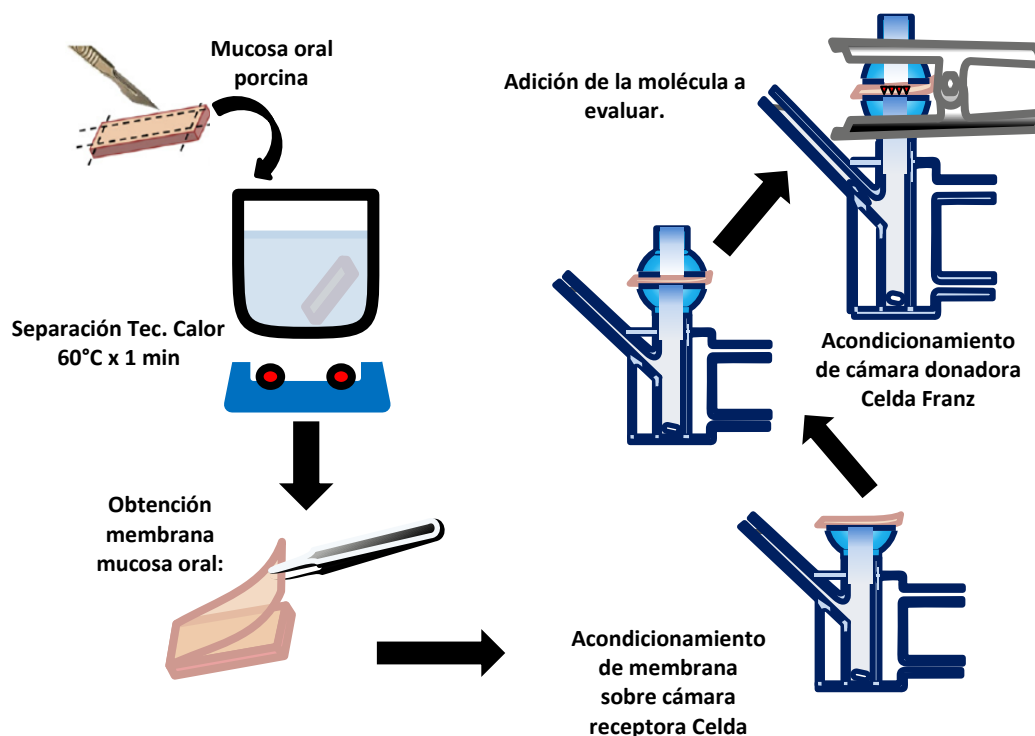


Figura SEQ Figura * ARABIC 10. Separación del epitelio por técnica de calor.
Mucosa incubada en solución salina durante un minuto a 60°C. *Elaboración propia*



Acondicionamiento de las mucosas en Celdas de Franz

Previo a los ensayos de difusión de FD-20, cafeína, candesartán y estradiol, fue necesario acondicionar las mucosas a las celdas de Franz. Para esto, las celdas fueron ubicadas en una placa de agitación multipunto, luego se conectaron a un baño termostático con agua recirculando a 37°C, la cámara receptora fue completada con los vehículos seleccionados para solubilizar los fármacos. Posteriormente agitadores magnéticos fueron puestos en cada una de las celdas para garantizar una mezcla homogénea durante el experimento. Cuidadosamente se dispuso la superficie basal del epitelio sobre la cámara receptora y sobre la superficie epitelial se colocó la cámara donadora la cual fue asegurada con una pinza y completada con un volumen de 350 µL o 1mL del vehículo dependiendo del tamaño de la celda. El acondicionamiento de la mucosa con el vehículo se realizó por 30 minutos para estabilizar el tejido. Para evitar la evaporación, la cámara donadora y el desprendimiento lateral de la cámara receptora fueron cubiertos con parafilm, figura 12.



Ensayo de viabilidad de la mucosa por reducción de MTT

La evaluación de la viabilidad tisular se realizó con tres fines: i) Seleccionar el tiempo máximo de experimentación. ii) Seleccionar un vehículo para disolver los compuestos garantizando su inocuidad. iii) Evaluar el efecto de candesartán y las moléculas control (estradiol y cafeína) después de los ensayos de permeabilidad. Todos los análisis fueron contrastados por estudios histológicos.

Para la selección del tiempo máximo de experimentación, la viabilidad se evaluó en mucosa fresca (inmediatamente después de separado el epitelio), a las 4, 12 y 16h de experimentación. Para el ensayo se tomó una muestra del tejido epitelial usando un punch de 4mm, los fragmentos fueron pesados y dispuestos en placas de 24 pozos con 250 μ L MTT (4 mg/mL) y 250 μ L de PBS. Las placas luego se incubaron por 2 h a 37 °C en una plataforma giratoria a 100 rpm, transcurrido este tiempo se retiró el MTT no metabolizado, las mucosas se lavaron con PBS (dos lavados de 1 mL durante un minuto) y se procedió a disgregar mecánicamente el tejido para liberar los cristales de formazán. La solubilización del formazán se hizo agregando 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada uno de los pozos, luego se colocó en un agitador a 80rpm, por 80 minutos. La lectura de densidad óptica se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm (Delphine Imbert & Cullander 1999). Los resultados del ensayo de viabilidad se expresaron en términos de índice TR (cantidad de absorbancia de formazan por mg de tejido) (Nicolazzo et al., 2003).

Para evaluar la inocuidad de los vehículos, las mucosas fueron expuestas durante 4h a cada uno de ellos, tabla 3, transcurrido este tiempo se tomaron muestras de 4mm y se procedió a realizar el ensayo de MTT siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

Para evaluar el efecto de los compuestos se tomó una muestra del tejido epitelial después de los ensayos de permeabilidad, usando un punch de 2 mm para las mucosas expuestas a estradiol y candesartán y uno de 4 mm para las mucosas expuestas a cafeína, todos los fragmentos fueron pesados y se continuó con el ensayo de reducción de MTT.

Para validar los resultados obtenidos fue necesario incluir un control de daño y/o sin actividad metabólica aparente. Para seleccionar este control, se probaron condiciones previamente reportadas en la literatura (tratamiento con DMSO), sin embargo, por los resultados obtenidos fue necesario explorar otros protocolos lo cuales incluyeron: i) mucosas hervidas durante una hora,

ii) mucosas hervidas durante una hora + tritón al 10% durante una hora, iii) mucosas congeladas + tritón al 10% durante tres horas, iv) mucosas en tritón durante dieciocho horas.

Todos los ensayos de viabilidad se realizaron en al menos tres experimentos independientes por triplicado.

Tabla 3. Vehículos evaluados para solubilizar candesartán, cafeína, estradiol

Vehículo	Molécula
PBS+Etilenglicol	Estradiol
PBS+Na ₂ CO ₃ [0,2M]	Candesartán, Cafeína

Análisis Histológico

Para este estudio, las muestras de mucosa fueron fijadas en formol neutro al 10% para posterior inclusión en bloques de parafina. De cada bloque se realizaron cortes de 10 micras, que fueron teñidos con hematoxilina & eosina. Los análisis fueron realizados sobre imágenes tomadas con objetivos de 5X y 20X usando un microscopio de luz ZEISS equipado con una cámara digital axiocam 503 mono. Los criterios tenidos en cuenta para esta evaluación fueron. i) morfología del epitelio en conjunto y para cada célula. ii) viabilidad de la mucosa medida en términos de presencia de núcleos picnóticos y la conservación de la membrana basal.

Evaluación de Integridad de la mucosa por ensayo de difusión de FD-20

La evaluación de la integridad se realizó con los mismos fines descritos para el ensayo de viabilidad por reducción de MTT. Para el experimento, las mucosas fueron acondicionadas en las celdas de Franz compuestas por una cámara donadora de 1mL, una receptora de 5 mL y un área de permeación de 0,64 cm². Transcurrido el tiempo de acondicionamiento, 500 µL de la solución de Krebs fueron reemplazados con 500 µL de FD-20 (400µg/mL). Durante 4 horas, cada 30 minutos se tomaron muestras de 500 µL de la cámara receptora y se reemplazaron inmediatamente con solución de Krebs para mantener el mismo volumen durante todo el

experimento. La fluorescencia de la concentración de FD20 en estas muestras fue cuantificada utilizando un espectrofluorometro Tecan-GENios infinity pro 2000 a una longitud de onda de excitación de 490 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF). Para establecer la concentración de FD-20 en la cámara receptora, se usó una curva de calibración con un rango de concentraciones entre 200 y 0,064 µg /mL, preparada en triplicado y en diluciones seriadas 1:5. La aparición de FD-20 a una concentración mayor 0,1% en la cámara receptora se tomó como un indicativo de pérdida de integridad (Kulkarni et al. 2010). Después de cada experimento de difusión de FD-20, se tomaron muestras de las mucosas con punch de 4mm de acuerdo al protocolo y criterios de análisis histológicos. Todos los experimentos de permeación se realizaron en al menos tres experimentos independientes por triplicado.

Como control de daño se emplearon mucosas congeladas, hervidas y expuestas a Tritón al 10% durante 3h, sobre las cuales se realizó la prueba de difusión para FD20.

7.3.2. Segundo Objetivo: Evaluar y comparar la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente al candesartán y frente a moléculas control.

Condiciones cromatográficas para la cuantificación de las moléculas

La cuantificación del paso de las moléculas cafeína y estradiol se realizó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), marca SHIMADZU PROMINENCE-I LC-2030. Para la cuantificación de candesartán se usó cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC por sus siglas en inglés) y se llevó a cabo en un cromatógrafo Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) Dionex Ultimate 3000, bomba cuaternaria Dionex Ultimate 3000 RS, desgasificador en línea y automuestreador. Los datos se procesaron utilizando el software Chromeleon Client, versión 6.80 SR15. La columna utilizada para las tres moléculas fue una Gemini ® C18 (150 x 4.6mm; 5 µm).

Las condiciones cromatográficas para la evaluación de las 3 moléculas se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones HPLC para cafeína, estradiol y candesartán

MOLÉCULA			
Condición	Cafeína	Estradiol	Candesartán
Fase móvil	Agua/Metanol (55:45, v/v)	Agua /Acetonitrilo (50:50 v/v)	Solvente A: Ácido fórmico en agua al 0,51%. Solvente B: Acetonitrilo
Fase estacionaria	Columna C18 5µm , LC Column		150 x 4,6 mm
Velocidad de Flujo (mL/min)	1	1,8	1
Volumen de inyección (µL)	10	10	30
Detección UV (nm)	273	225	260
Rango de ensayo	0,0610 - 500 µg/mL	0,02 - 0,418 mg/mL	0,12 – 120 µg/mL
Temperatura de la Columna (°C)	40	40	25
Presión (psi)	4500	4500	1400
Tiempo de análisis (min)	5	3	15

Para Candesartán se empleó el siguiente gradiente:

Tiempo	% A	%B
0	90	10
5	55	45
13	52	48
15	90	10

Preparación de curvas de calibración

Curva de calibración cafeína

Se preparó una solución stock de cafeína con 10 mg de cafeína en 10 mL de Na_2CO_3 [0,2M] para una concentración final de 1mg/mL. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 para tener un rango de concentración entre 0,061 - 7,81 $\mu\text{g/mL}$. La curva se realizó por triplicado. Tabla 5.

Tabla 5. Puntos de Curva de calibración de Cafeína

Muestra	Concentración Cafeína ($\mu\text{g/mL}$)
1	7,81
2	3,91
3	1,95
4	0,977
5	0,488
6	0,244
7	0,122
8	0,0610

Curva de calibración estradiol

Se preparó una solución stock de estradiol con 2,3 mg de estradiol en 5,5 mL PBS + etilenglicol al 10% para una concentración final de 418 $\mu\text{g/mL}$. Se realizaron diluciones para tener un rango

de 0,02- 418 µg/mL. Con esta molécula, no se logró obtener una completa solubilización, por lo tanto se trabajó con estradiol en suspensión. La curva se realizó por triplicado. Tabla 6

Tabla 6. Puntos de Curva de calibración de Estradiol

Muestra	Concentración Estradiol (mg/mL)
1	0,418
2	0,32
3	0,16
4	0,08
5	0,04
6	0,02

Curva de calibración candesartán

Para esto se preparó una solución stock de candesartán con 30 mg de candesartán en 100 mL de metanol para una concentración final de 300 µg/mL. Se realizaron diluciones para tener un rango de 0,06 – 120 µg/mL. La curva se realizó por triplicado. Tabla 7

Tabla 7. Puntos de Curva de calibración de Candesartán.

Muestra	Concentración Candesartán ($\mu\text{g/mL}$)
1	120
2	60
3	24
4	6
5	1,5
6	0,6
7	0,12
8	0,06

Ensayos de permeabilidad para cafeína

El ensayo de permeabilidad para cafeína se llevó a cabo en celdas de Franz compuestas por una cámara donadora de 1mL, una receptora de 5 mL y un área de permeación de 0,64 mm. El acondicionamiento se realizó usando como vehículo una solución de PBS+Na₂CO₃ [0,2M]. El ensayo de permeación duró 4h partiendo de una a solución de cafeína a 500 $\mu\text{g/mL}$. Muestras de la cámara receptora se tomaron cada 30 minutos siguiendo el mismo protocolo descrito para el ensayo de difusión para FD-20, todas las muestras fueron luego almacenadas en tubos eppendorf a 4°C para ser cuantificadas por HPLC según condiciones descritas anteriormente. Los ensayos se realizaron en tres semanas independientes usando 4 celdas de Franz en cada experimento.

Ensayos de permeabilidad para estradiol

El ensayo de permeabilidad para estradiol se realizó en celdas de Franz compuestas por una cámara donadora de 350 μL , una receptora de 3 mL y un área de permeación de 0,2 cm². Para el acondicionamiento se usó una solución de PBS + etilenglicol al 10%, una vez se equilibró la mucosa, 175 μL de este vehículo fueron reemplazados con 175 μL de estradiol (418 $\mu\text{g/mL}$) y se dio inició al ensayo de difusión siguiendo el mismo protocolo empleado para FD-20 y cafeína,

excepto que se tomaron muestras de 300 µL debido a que el volumen de la cámara receptora de esta celda es menor.

Ensayos de permeabilidad para Candesartán

Este ensayo se realizó usando las mismas celdas de Franz empleadas para el ensayo de permeabilidad de estradiol. El acondicionamiento se realizó con PBS+Na₂CO₃ [0,2M], una vez se equilibraron la mucosas estas fueron expuestas a una solución de candesartán a 500 µg/mL. Las muestras que se tomaron de la cámara receptora fueron recolectadas en tubos eppendorf y almacenadas a -80°C durante 12h, luego se liofilizaron y se resuspendieron en 100 µL de metanol grado HPLC, se centrifugaron a 12000 rpm; el sobrenadante se tomó evitando arrastrar sales del vehículo, y se inyectó en el HPLC para determinar la cuantificación de candesartán, de acuerdo a las condiciones descritas previamente. Los ensayos se realizaron por triplicado usando 3 celdas de Franz en cada experimento.

Evaluación de viabilidad por MTT e histología de las mucosas expuestas a cafeína, candesartán y estradiol

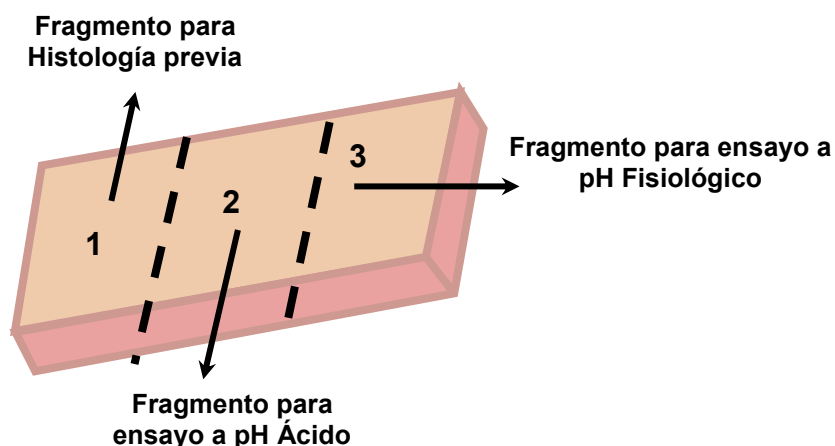
Una vez terminados los ensayos de permeabilidad para las 3 moléculas, se procedió a retirar las mucosas de cada una de las celdas de Franz, se tomaron 4 punch de 4 mm para las mucosas expuestas a cafeína (3 para ensayo de viabilidad por MTT y uno para la evaluación histológica) y 2 punch para mucosas expuestas a estradiol y candesartán (uno para ensayo de viabilidad por MTT y otro para evaluación histológica).

7.3.3. Tercer Objetivo: Evaluar el efecto del pH sobre la permeabilidad de la mucosa oral porcina expuesta a candesartán

Para éste objetivo se comparó el efecto de dos rangos de pH: uno ácido (pH 5,5 - 5,7) y otro fisiológico (pH 6,6-6,9), éste último rango fue el que se empleó en los ensayos de permeabilidad antes descritos.

Para los ensayos de permeabilidad a estos dos pHs se emplearon mucosas de mayor tamaño, esto con el fin de obtener desde una misma mucosa un fragmento para el estudio histológico antes del experimento, y otros dos fragmentos para acondicionarlos en las celdas y exponerlos a candesartán a pH ácido y a pH fisiológico, figura 13.

La preparación del candesartán a pH ácido se realizó empleando PBS+Na₂CO₃ [0,2M] ajustado con HCl hasta alcanzar el rango entre 5,5 y 5,7 el ensayo de permeabilidad se realizó en las mismas condiciones descritas previamente.



6.4. Hipótesis de estudio

La permeabilidad de la mucosa bucal porcina muestra diferencias cuando se expone a candesartán, a controles de paso y cuando se modifica el ambiente químico.

6.5. Plan de tabulación y análisis

Todos los experimentos fueron realizados con mínimo tres réplicas en tres ensayos independientes y cuando fue posible se aumentó el (n).

Los resultados fueron analizados a través de estadística descriptiva y se presentaron a través de tablas, incluyendo mínimos, percentil, mediana, máximo, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Las diferencias entre grupos fueron analizadas usando una prueba t-student a dos colas, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal las comparaciones se hicieron empleando la prueba no paramétrica U- Mann-Whitney. Las

diferencias se consideraron significativas (*) con un $P < 0,05$, muy significativas (**) con un $P < 0,01$, altamente significativas (****) con un $P < 0,001$ y no significativas (ns) con un $P > 0,05$.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las pruebas experimentales fueron realizadas teniendo en cuenta los principios éticos consignados en la Ley 84 de 1989 y en las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Teniendo en cuenta que las mucosas de cerdo no fueron tomadas de animales de experimentación, sino de animales destinados para sacrificio y posterior consumo humano, no se hizo una solicitud de aval al comité de ética.

9. RESULTADOS

8.1. Resultados Primer Objetivo: Evaluar la viabilidad e integridad de la mucosa oral porcina como criterios de selección para estudios de permeabilidad in vitro.

9.1.1. Selección del tiempo de experimentación

Teniendo en cuenta que los reportes de la literatura sugieren que el tiempo máximo de experimentación con mucosa oral porcina puede estar entre 9 y 20 horas postmortem (Imbert and Cullander, 1999; Nicolazzo et al., 2003), se hizo necesario determinar cuál era el efecto de esta variable sobre la viabilidad e integridad de las mucosas procesadas en el laboratorio. Para esto, se desafiaron los protocolos de recolección, transporte y separación del epitelio descritos en la literatura, una vez estandarizados en el laboratorio se comparó la viabilidad del epitelio en fresco y luego de 4h, 12h y 16 h de experimentación.

Para validar los resultados obtenidos, se estableció un control de daño evaluando diferentes tratamientos encaminados a reducir la actividad metabólica de las mucosas. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 14 y sugieren que todos los métodos de daño evaluados inducen una disminución en el índice TR, siendo la exposición a tritón al 10% por más de 3h el tratamiento que más afectó la viabilidad de las mucosas.

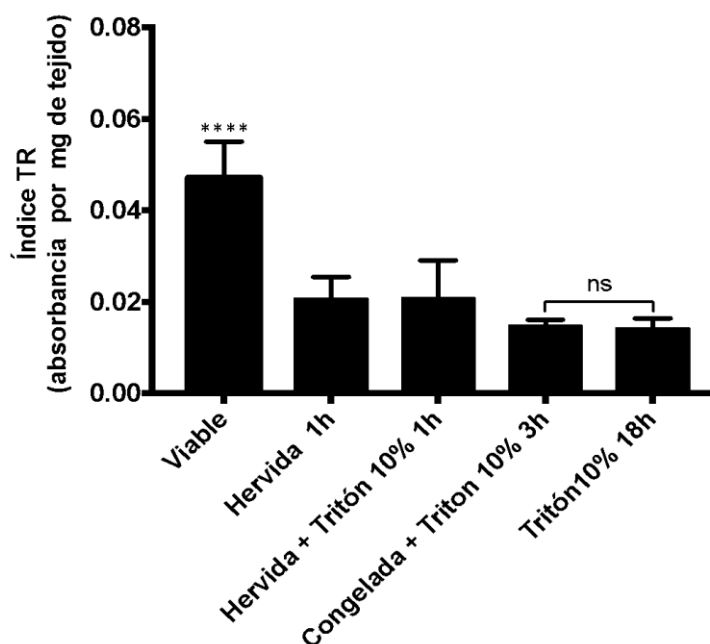
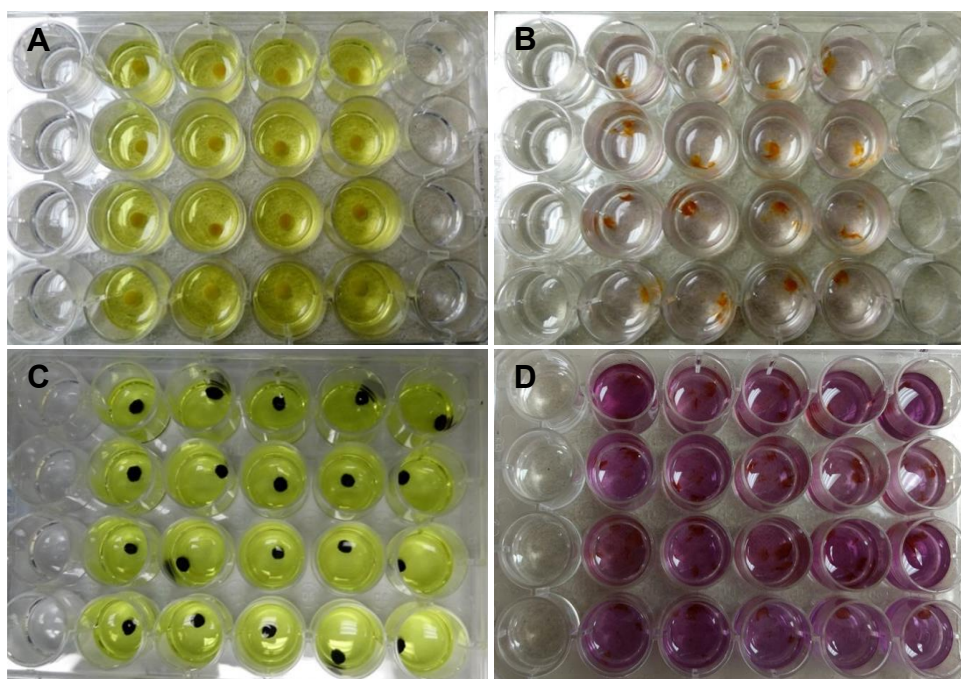


Figura SEQ Figura 14. Índice TR de mucosa oral porcina viable y expuesta a diferentes protocolos de daño. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar. **** Indican que el índice TR calculado para mucosas viables (n=24) muestra diferencias estadísticamente estadísticamente significativas respecto a los otros grupos de experimentación, basado en un ANOVA y análisis post hoc con test de Tukey ($p < 0.0001$). No significativo (ns).

Cabe señalar que el índice TR obtenido para este grupo de datos osciló entre $0,0147 \pm 0,0013$ y $0,0141 \pm 0,0022$, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a la media del índice TR calculado para mucosa fresca $0,0472 \pm 0,0078$ (media $\pm$ desviación estándar) ($p < 0,0001$).

En la figura 15 se observan las diferencias en la actividad metabólica de mucosas dañadas respecto a la de mucosas frescas, evidenciándose una mayor producción de cristales de formazan en este último grupo de mucosas



La comparación por tiempos mostró que la media del índice TR calculada para mucosas frescas ($0,0472 \pm 0,0078$) difiere significativamente de la calculada para mucosas después de 12 h ($0,0314 \pm 0,0053$) y 16 h de experimentación ($0,028 \pm 0,0049$) ($p < 0,0001$). En contraste, el índice TR a las 4h ($0,0478 \pm 0,0076$) fue comparable al observado para mucosas frescas ($p = 0,9968$), sugiriendo que este tiempo es el más adecuado para realizar los estudios de permeabilidad, ya que la actividad metabólica no se disminuye significativamente, figura 16. En la tabla 8 se muestran los resultados de la estadística descriptiva para este grupo de datos.

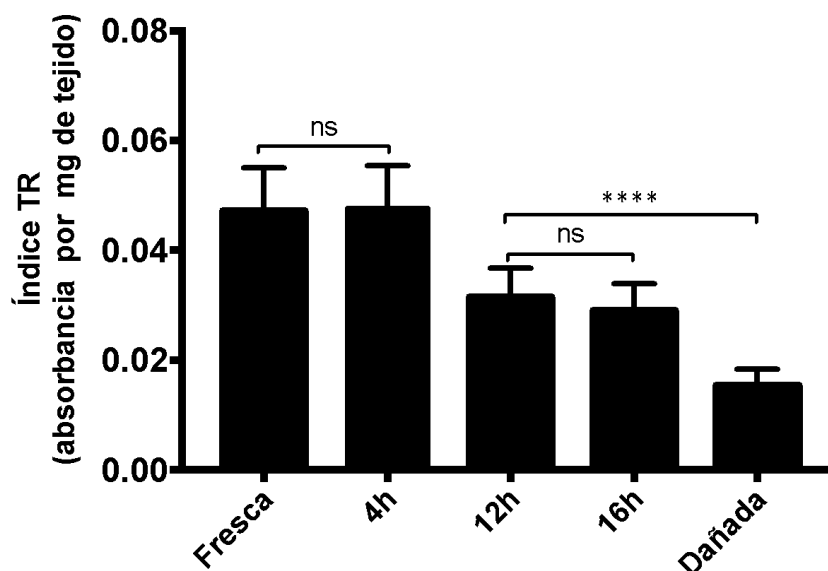


Figura SEQ Figura 1* ARABIC 16. . Comparación de Índice TR de mucosa oral porcina a diferentes tiempos de experimentación. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar. **** Señalan los grupos experimentales que muestran diferencias estadísticamente significativas respecto mucosas frescas y 4h de experimentación, basado en un ANOVA y análisis post hoc con test de Tukey ($p < 0,0001$) ($n=13-24$). No significativo (ns).

Tabla 8. Estadística descriptiva para índice de viabilidad mucosa oral porcina en diferentes tiempos de experimentación.

	Fresca	Dañada	4h	12h	16
Mínimo	0,03534	0,01073	0,03629	0,02261	0,02257
Percentil 25%	0,04009	0,01264	0,04181	0,02649	0,02404
Mediana	0,0459	0,01627	0,04512	0,0334	0,02836
Percentil 75%	0,05332	0,01793	0,05587	0,03557	0,03318
Máximo	0,06472	0,02022	0,05994	0,03963	0,03756
Promedio	0,04718	0,01538	0,04782	0,03141	0,02897
Desviación Estándar	0,00785	0,002984	0,007611	0,005332	0,004959
Coeficiente de Variación	16,65%	19,41%	15,92%	16,98%	17,12%
Número de mucosas (n)	24	13	24	20	19

9.1.2. Viabilidad para vehículos.

La viabilidad de las mucosas no se afecta después de 4h de exposición a los vehículos empleados para solubilizar candesartán, cafeína y estradiol. Cabe señalar que aunque se observó una leve reducción en los valores de índice TR calculados para el vehículo del estradiol (PBS + etilenglicol al 10%) ($0,0369 \pm 0,0063$), esta disminución no fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el obtenido para las mucosa frescas ($0,0472 \pm 0,0078$) y el vehículo para candesartán-cafeína (PBS+Na₂CO₃) ($0,04575 \pm 0,0085$) figura 17.

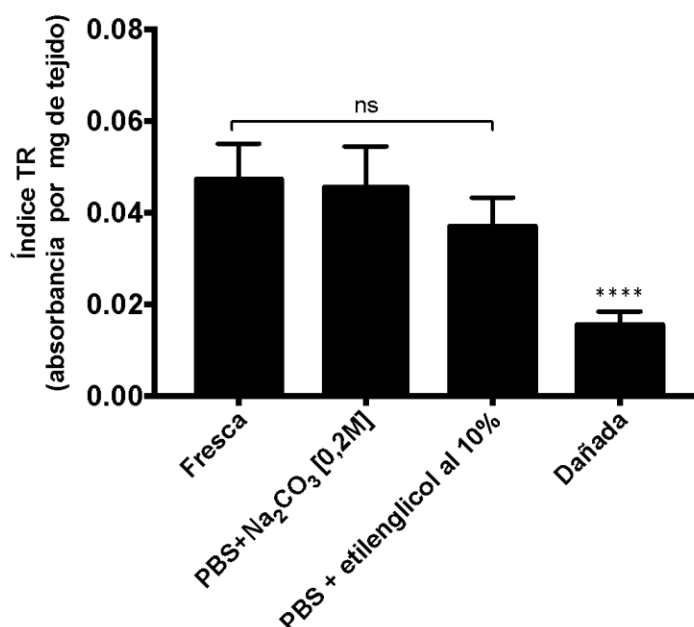


Figura SEQ Figura * ARABIC 17. Comparación de Índice TR de mucosa oral porcina expuesta a PBS+Na₂CO₃ (vehículo candesartán-cafeína) y PBS + etilenglicol al 10% (vehículo estradiol). Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar. **** señala el grupo que muestra diferencias estadísticamente significativas respecto mucosas frescas y expuestas a los vehículos, basado en un ANOVA y análisis post hoc con test de Tukey ($p < 0,0001$) ($n=4-24$). No significativo (ns).

Por otro lado, resultados de los cortes histológicos muestran que en todos los casos los epitelios fueron separados correctamente del tejido conectivo manteniendo la morfología e integridad intacta. Al evaluar las mucosas expuestas al vehículo de candesartán, cafeína y estradiol se evidenció que la morfología del epitelio y el de las células fue comparable al de la mucosa fresca, por el contrario, cuando se compara con la mucosa dañada, se observa solo el citoesqueleto de las células, pérdida completa de núcleos y citoplasma, por lo tanto, estos resultados demuestran

que los vehículos seleccionados para solubilizar el fármaco, no afectan ni la viabilidad ni la integridad de la mucosa oral porcina figura 18.

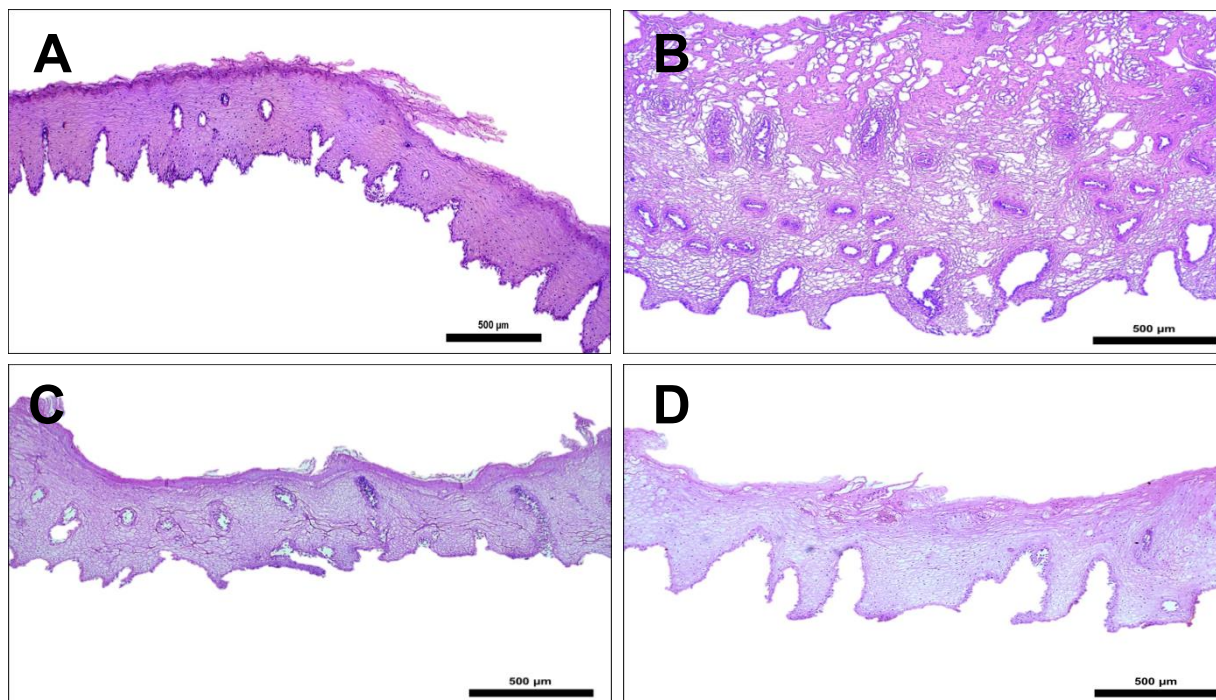


Figura SEQ Figura * ARABIC 18. **Secciones histológicas de mucosa oral porcina expuestas a vehículos.** Las imágenes histológicas muestran mucosas expuestas: A. Mucosa control (Fresca); B. Mucosa Dañada (Congelada + Tritón 10% 3h); C. Mucosa expuesta al vehículo de candesartán y cafeína (PBS + Na₂CO₃ [0,2M]); E. Mucosa expuesta al vehículo de estradiol PBS + Etilenglicol al 10%.

9.1.3. *Evaluación de la integridad por ensayo de difusión de FD20*

Curva de calibración FD-20

En la figura 19 se presentan las curvas de calibración para FD20, relacionando URF y concentración, en esta se observa un coeficiente de correlación de 0,9998 indicando una fuerte correlación entre la variable x (concentración) y la variable respuesta (URF). La prueba F mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y los interceptos de las curvas. El límite de cuantificación para FD20 fue 0,077 µg/mL y el de detección fue de 0,016 µg/mL calculado a partir de la ecuación de una curva con valores de concentración más diluidos. El rango de concentraciones evaluadas fue 10 - 0,0001 µg/mL y la ecuación obtenida $Y = 204,94 X + 13,946$ $R = 0,99904$, figura 19.

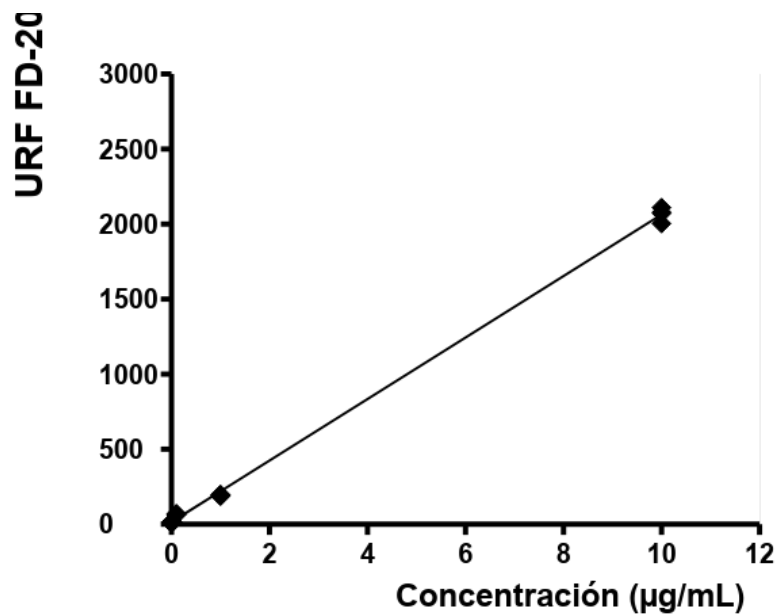
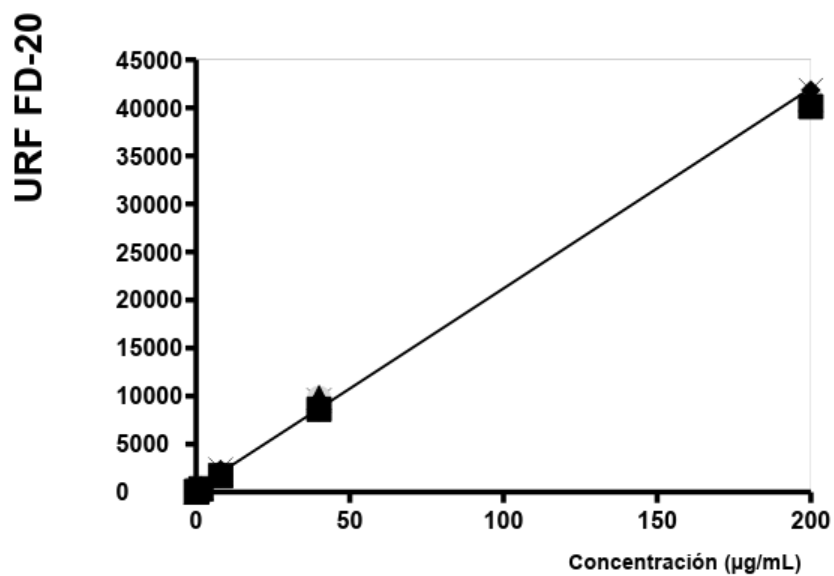


Figura SEQ Figura * ARABIC 19. Curvas de calibración FD-20. La prueba de igualdad de pendientes e interceptos muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas. Prueba pendientes, $p = 0,2474$, prueba interceptos $p = 0,2459$, basados en prueba "F" de de Fisher, con un nivel de confianza del 95% $n=3$

En la figura 20 se muestran los resultados del efecto del tiempo de experimentación sobre la integridad de la mucosa, allí se comparan las URF obtenidas para el vehículo en el que se disolvió

el FD20 y las obtenidas después de los ensayos de difusión para esta molécula a las 4, 12 y 16h de experimentación. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en las URF obtenidas para el vehículo y a las 4h de experimentación ($p= 0,999$), sugiriendo que en este tiempo la mucosa se conserva íntegra y puede ser empleada para los ensayos de permeabilidad de candesartán, cafeína, estradiol, el hidrogel o cualquier otro fármaco que desee evaluarse.

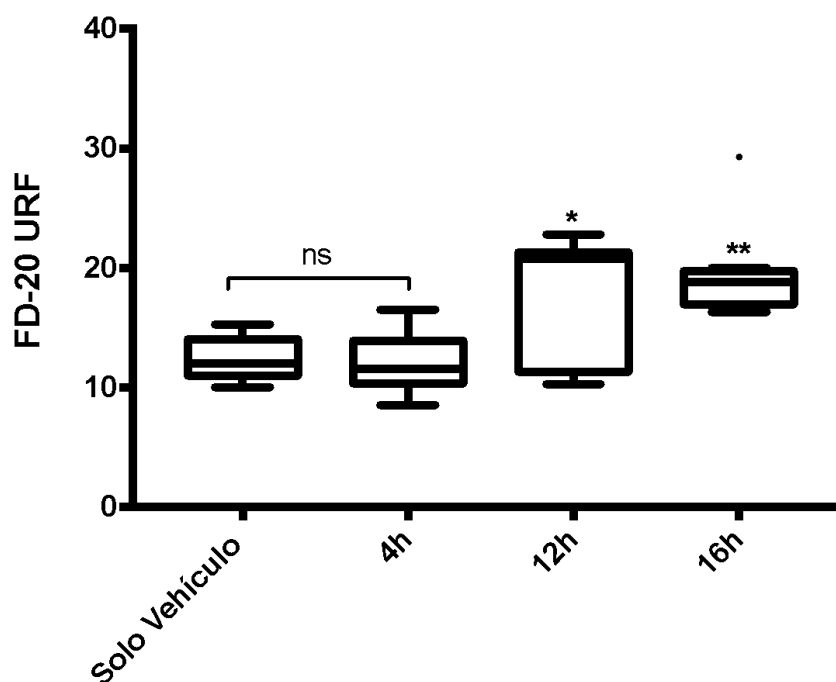


Figura SEQ Figura * ARABIC 20. URF evaluando Integridad en mucosas expuestas a diferentes tiempos de experimentación. La fluorescencia para FD20 a las 4h de experimentación es comparable a la observada para el vehículo, sin embargo, se observan diferencias significativas a las 12h de experimentación * $p < 0.01$ y muy significativas a las 16h de experimentación. ** $p < 0.001$ (Kruskal – Wallis ANOVA con Mann-Whitney U post test.) No significativo (ns).

Para validar los resultados de este ensayo, se realizó una prueba de difusión para FD20 en mucosas sin actividad metabólica aparente e hipotética pérdida de integridad, demostrándose que para estas mucosas se pierde la función de barrera favoreciendo el paso de FD20. En la figura 21 se observa que la mediana de fluorescencia obtenida para las mucosas dañadas fue significativamente mayor a la observada en mucosas viables.

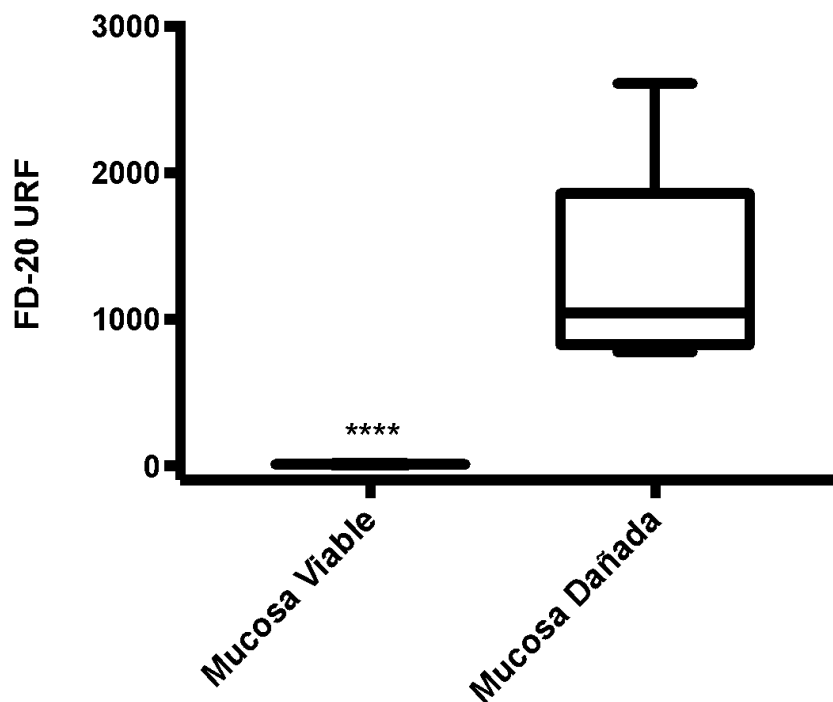
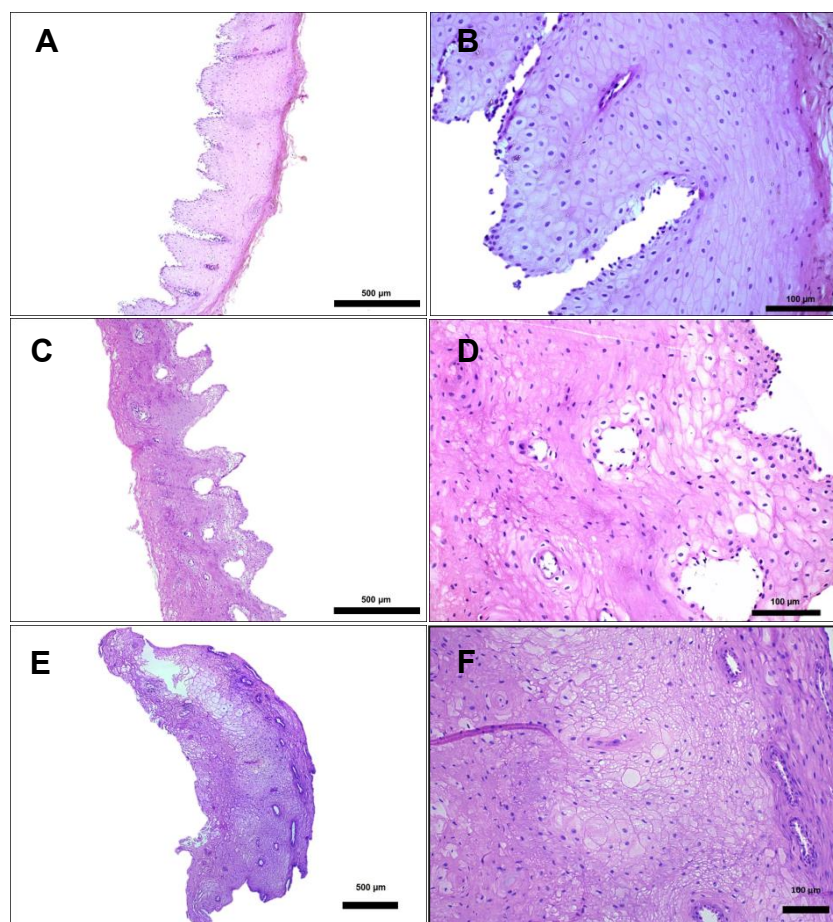


Figura SEQ Figura * ARABIC 21. Evaluación de Integridad por FD20 en mucosas control. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en el paso de FD20 a través de mucosa dañada y mucosa viable, demostrándose que las condiciones empleadas en el laboratorio permiten mantener las mucosas íntegras para ser empleadas en ensayos de difusión de fármacos. **** $p < 0.0001$ (Kruskal – Wallis ANOVA con Mann-Whitney U post test).

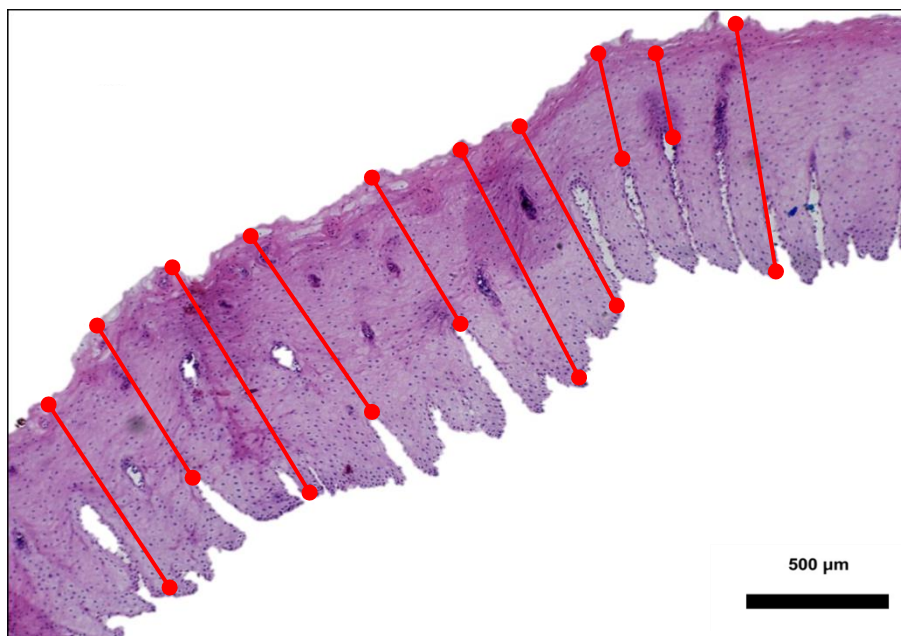
La evaluación histológica después del paso de FD-20 a los diferentes tiempos de experimentación se realizó para corroborar la integridad de la mucosa, donde se evidenció una correcta separación del epitelio del tejido conectivo con una conservación de la membrana basal en todas las mucosas. A su vez, se observó que las mucosas expuestas al FD-20 durante 4h presentaron un epitelio con presencia de células con arquitectura conservada y núcleos picnóticos, a diferencia de las mucosas expuestas durante 12h y 16h de experimentación, las cuales mostraron una vacuolización citoplasmática en la mayor parte de las células y pérdida de algunos núcleos. En las micrografías de las mucosas a 16h de experimentación, se evidenció pérdida en la arquitectura de algunas células, figura 22.



Teniendo en cuenta que el espesor es una variable que puede condicionar el paso de una molécula, y que durante las evaluaciones histológicas de las mucosas frescas y las obtenidas en los estudios del tiempo de experimentación se evidenció una importante variación en el espesor del tejido, fue necesario realizar un análisis para evaluar si la técnica de separación implementada en el laboratorio tenía alguna influencia en los cambios observados para ésta variable. Este estudio se hizo en colaboración con estudiantes de pregrado de facultad de odontología y se describe a continuación (Albarracín et al., 2018).

Se midió el espesor a 15 mucosas frescas e independientes; se calculó el valor medio del espesor a partir de 10 mediciones al azar, tomando la distancia entre los valles y crestas epiteliales, hasta

la capa más externa de la mucosa, figura 23. El estudio fue efectuado por 3 observadores de manera independiente los cuales se calibraron a través de una prueba de concordancia para las mediciones realizadas por cada uno de ellos.



Los resultados obtenidos en la evaluación del espesor fue de $721 \pm 246,6 \mu\text{m}$, este valor se calculó teniendo en cuenta las diez mediciones realizadas por cada observador, en total se realizaron 420 mediciones para todas las mucosas.

También se evidenció que en una misma mucosa se presentan variaciones en el espesor, sin embargo, estas diferencias pueden ser propias del tejido y no un efecto del método de separación. Cabe señalar que en otras muestras el espesor de la mucosa se mantuvo más homogéneo y en todos los casos se conservó la integridad de la membrana basal ya que se observa continua, sin rupturas, se identifican crestas y valles, como se observa en mucosas frescas procesadas inmediatamente después del sacrificio, figura 24 y en un corte histológico marcado con ácido peryódico de schiff (PAS), una tinción que identifica el colágeno tipo 4 presente en la membrana basal, figura 25. Cabe señalar que el análisis de espesor para la muestra procesada inmediatamente después del sacrificio mostró un valor $559,83 \pm 118,7$, el cual se encuentra dentro del rango de variación obtenido previamente en este trabajo.

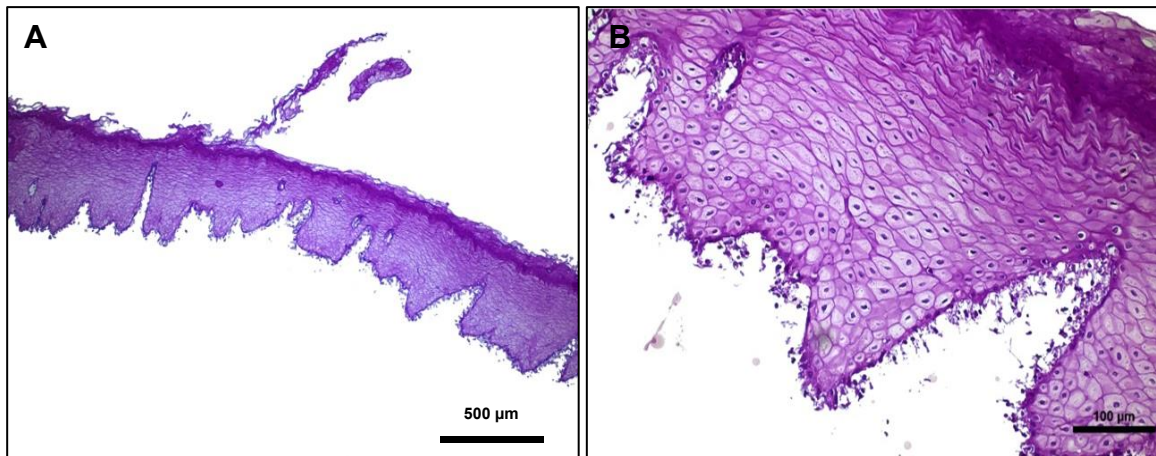
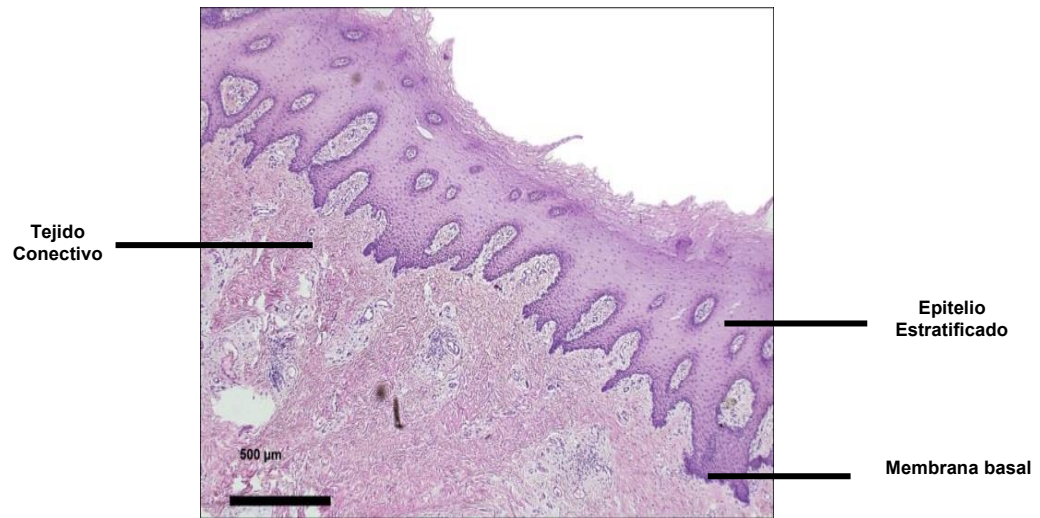


Figura SEQ Figura * ARABIC 25. Mucosa oral porcina fresca, coloreada con PAS A 5X y B 20X

8.2. Resultados Segundo Objetivo: Evaluar y comparar la permeabilidad de la mucosa oral porcina frente al candesartán y frente a controles

Permeabilidad de la mucosa frente a cafeína

Usando las condiciones descritas en la metodología para la cuantificación de cafeína, se obtuvo un cromatograma donde se observa un pico de absorbancia simétrico a un tiempo de retención de 2,96 minutos y a una longitud de onda de 273 nm como se muestra en la figura 26.

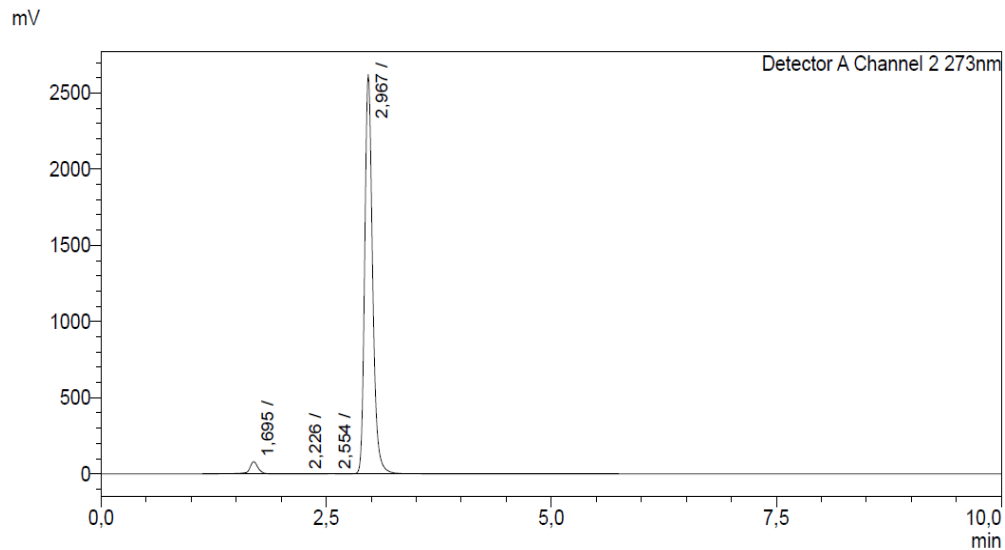


Figura SEQ Figura * ARABIC 26. Cromatograma cafeína. Solubilizada en el vehículo PBS+Na₂CO₃ [0,2M] a 500 µg/mL

Curva de calibración Cafeína

En la figura 27 se presenta la curva de calibración para cafeína la cual se realizó en un rango de concentración de 0,061- 7,81 µg/mL. En la gráfica se representan los datos de tres curvas independientes y se relaciona el área (mV) en función de la concentración µg/mL, observándose un coeficiente de correlación de 0,996, el cual indica que hay correlación entre la variable x (concentración) y la variable respuesta (área). El límite de cuantificación para cafeína fue de 0,061 µg/mL y el de detección fue 0,0350 µg/mL.

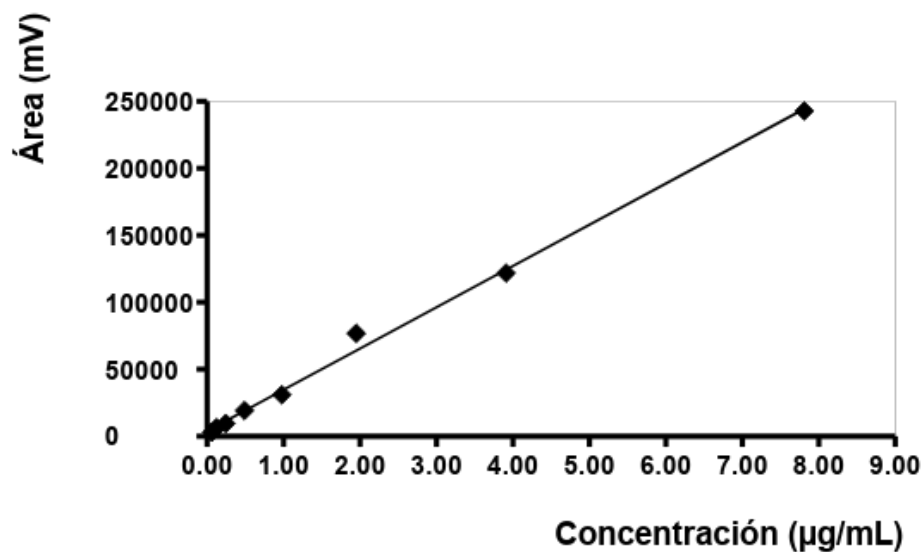


Figura SEQ Figura * ARABIC 27. Curvas de calibración Cafeína.
Representa la media de tres curvas de calibración. n=3

Los resultados del ensayo de permeación de cafeína se muestran en la figura 28, donde se evidencia que la concentración aumenta en función el tiempo. A los 30 minutos de experimentación en la cámara receptora se detecta una concentración de cafeína de $0,2996 \pm 0,0117 \mu\text{g/mL}$ y a los 240 minutos alcanza una concentración de $5,1892 \pm 0,6155 \mu\text{g/mL}$.

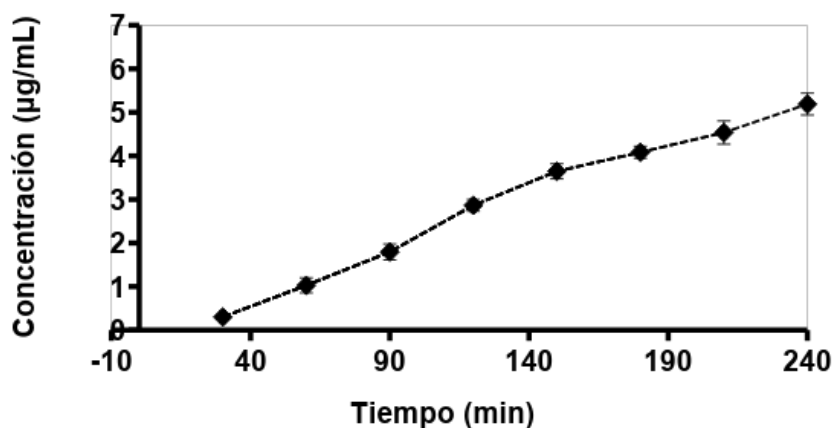


Figura SEQ Figura * ARABIC 28. Perfil de permeación de cafeína a través de la mucosa oral porcina. Los resultados se muestran como la media $\pm$ error estándar de al menos tres experimentos independientes.

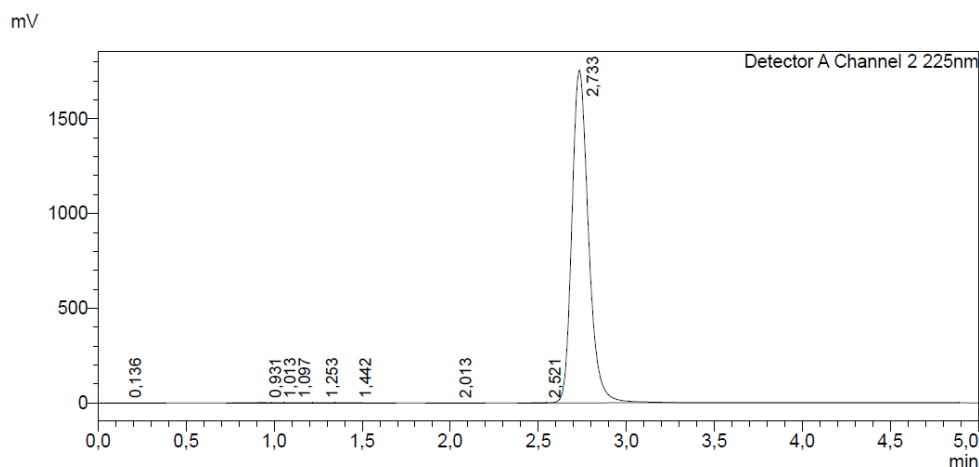
Esta cinética de paso permitió calcular el Paap (cm/s) para la molécula y los resultados se muestran en la tabla 9. La media de Paap calculada para cafeína fue de $6,2117 \pm 0,9557 \times 10^{-6}$.

Tabla 9. Coeficiente de permeabilidad aparente para Cafeína. n=6

Número de Ensayos	Coeficiente de Permeabilidad aparente (cm/s)
Ensayo 1	6,84E-06
Ensayo 2	6,78E-06
Ensayo 3	6,66E-06
Ensayo 4	6,53E-06
Ensayo 5	6,13E-06
Ensayo 6	4,33E-06
promedio	6,21167E-06
desviación estándar	9,5577E-07
desviación estándar del promedio	3,90192E-07
t 95% (n-1=5)	2,571
incertidumbre del promedio	1,00318E-06
coeficiente de variación	15,38669486

Permeabilidad de la mucosa frente a Estradiol

Usando las condiciones establecidas en la metodología para la cuantificación de estradiol, se obtuvo un cromatograma donde se observa un pico de absorbancia simétrica a un tiempo de retención de 2,7 minutos a una longitud de onda de 225 nm como se muestra en la figura 29.



Curva de calibración Estradiol

Los resultados de la curva de calibración para estradiol, se muestran en la figura 30, donde se observa un coeficiente de correlación de 0,9924, cual indica que hay correlación entre la variable x (concentración) y la variable respuesta (área). Se estableció como límite de cuantificación (LOQ) 0,02 mg/mL y el límite de detección (LOD) 0,01 mg/mL.

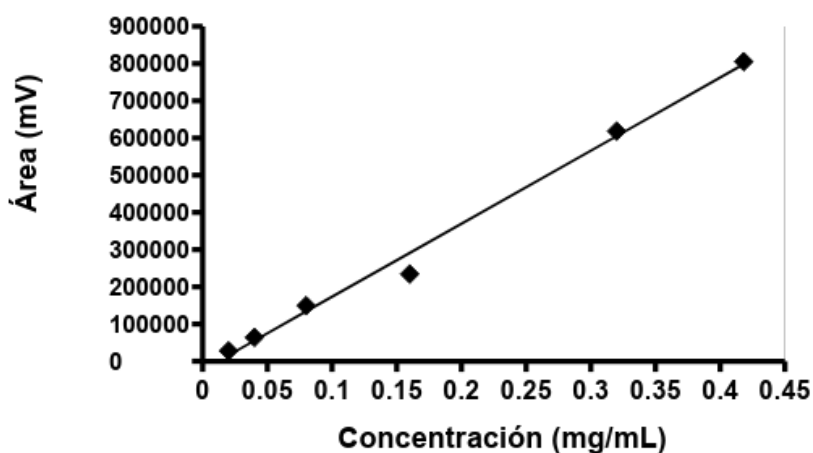


Figura SEQ Figura * ARABIC 30. Curva de

El ensayo de permeabilidad para estradiol se realizó según lo descrito en la metodología y las muestras fueron cuantificadas según las condiciones cromatográficas establecidas para la molécula, pero no se logró tener un perfil de cinética de permeabilidad debido a que el paso a través de la mucosa oral porcina de esta molécula estuvo por debajo del límite de cuantificación.

Evaluación de la viabilidad posterior a los ensayos de permeabilidad

Una vez terminados los ensayos de permeabilidad, se evaluó la viabilidad de las mucosas expuestas a cafeína, estradiol y candesartán para determinar cuál era el efecto de estas moléculas sobre las mucosas, teniendo en cuenta que previamente se había demostrado que los vehículos seleccionados para solubilizar cada una de las moléculas, no afectaba ni la viabilidad ni la integridad de la mucosa.

Los resultados de este análisis indican que el índice TR calculado para las mucosas expuestas a cafeína y estradiol ($0,03669 \pm 0,0064$; $0,0324 \pm 0,0066$) disminuye significativamente respecto al obtenido para los vehículos y la mucosa fresca, sugiriendo que la mucosa responde cuando se pone en contacto con un compuesto, figura 31.

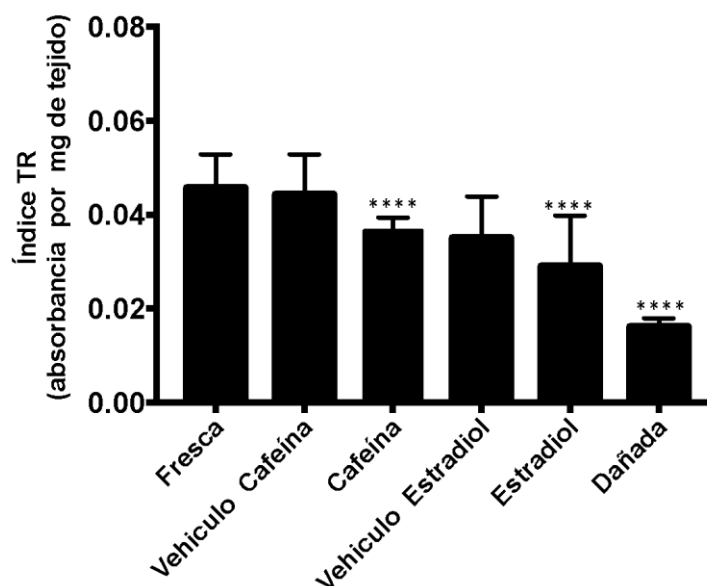


Figura SEQ Figura * ARABIC 31. Índice TR de mucosa oral porcina expuesta a cafeína, estradiol y respectivos vehículos. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar. **** señala los grupos que muestran diferencias estadísticamente significativas respecto mucosas frescas, basado en un ANOVA y análisis post hoc con test de Tukey ($p < 0,0001$) ($n=4-24$). No significativo (ns).

Para corroborar el análisis de viabilidad por MTT, se realizó un estudio histológico, el cual evidencia que la viabilidad celular se ve afectada cuando la mucosa se expone al tratamiento con cafeína y estradiol, observándose pérdida de núcleos en algunas zonas del epitelio, vacuolización citoplasmática y las capas más superficiales muestran alteración en la arquitectura celular; aunque se confirma que la membrana basal se conserva íntegra e intacta, figura 32.

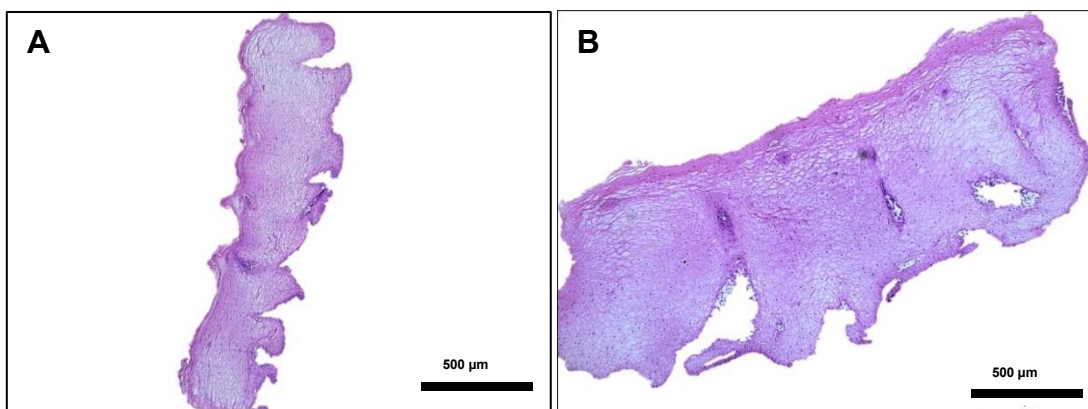


Figura 32. Mucosa oral porcina expuesta a cafeína y estradiol durante 4 h.

Los resultados de Candesartán serán presentados en el siguiente objetivo.

8.3. Resultados Tercer Objetivo: Evaluar el efecto del pH sobre la permeabilidad de la mucosa oral porcina expuesta a candesartán

Permeabilidad de la mucosa frente a Candesartán

Los resultados de éste objetivo se desarrollaron teniendo en cuenta que se evaluó candesartán solubilizado en vehículo en dos rangos de pH: 6,6 - 6,9 y pH 5,5 – 5,9. Por lo tanto, i) condiciones cromatográficas en HPCL; ii) curvas de calibración; iii) ensayo de permeabilidad; iv) evaluación de la viabilidad por MTT y evaluación histológica, fueron comunes a éstas 2 variables.

Usando las condiciones establecidas en la metodología para la cuantificación de candesartán, se obtuvo un cromatograma donde se observa un pico de absorbancia simétrica a un tiempo de retención de 9,3 minutos a una longitud de onda de 260 nm como se muestra en la figura 33.

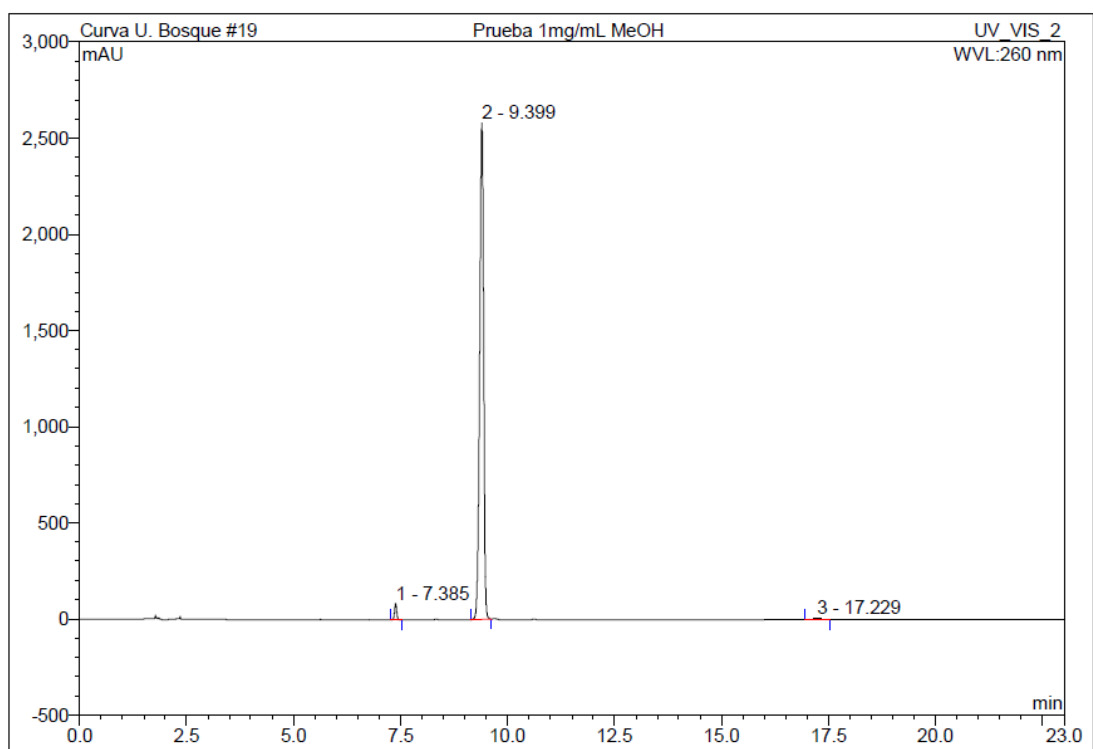


Figura SEQ Figura * ARABIC 33. Cromatograma Candesartán. Solubilizada

Curva de calibración Candesartán

La curva de calibración para candesartán se realizó en un rango de concentración de 0,06 – 120 µg/mL, sin embargo solo se consideraron aquellos puntos en los que el triplicado tuvieron un coeficiente de variación menor al 5%, por lo tanto se definió un rango de concentración para para la curva de 0,12–120µg/mL. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Puntos de la Curva Calibración Candesartán

Curva Calibración Candesartán		
	[ug/ml]	Área
C1	120	14,174
C1	120	14,1475
C1	120	14,0662
C2	60	6,9623
C2	60	7,0531
C2	60	6,7687
C3	24	2,7475
C3	24	2,845
C3	24	2,7461
C4	6	0,7011
C4	6	0,6828
C4	6	0,6759
C5	1,5	0,1571
C5	1,5	0,1631
C5	1,5	0,165
C6	0,12	0,0121
C6	0,12	0,0121
C6	0,12	0,0125

En la figura 34, se presenta la curva de calibración para candesartán donde se observa un coeficiente de correlación de 0,9998 indicando una fuerte correlación entre la variable x (concentración) y la variable y (Área). El LOD fue de 0,08 ug/mL y el LOQ de 0,12 ug/mL.

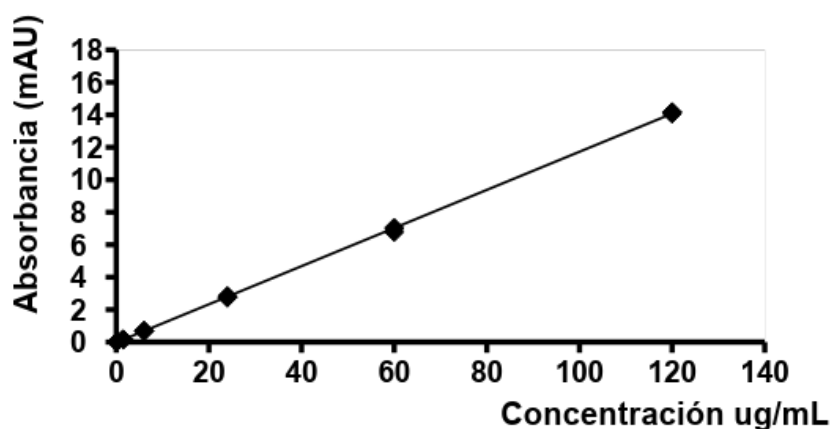


Figura SEQ Figura * ARABIC 34. Curva de calibración

Se realizaron pruebas de hipótesis para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración mediante el estadístico t de Student, Tabla 11. El test para la pendiente mostró un t calculado mayor al t tabulado, lo que indica no hay sesgo en la pendiente. Con respecto al intercepto, la prueba indica que no hay sesgo en el intercepto o error sistemático, y la prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación muestra un t calculado mayor al t tabulado, lo cual indica que hay una correlación significativa entre las dos variables.

Tabla 11. Prueba t para evaluar la linealidad

Hipótesis Nula	T calculado	t Tabulado (t de dos colas, n-2 g.l y 95% confianza)	Criterio	Decisión

t de la pendiente b	b=0	$t_b =$	279,5754303	2,1199	Si $t_{cal} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis	b es diferente de cero, no hay sesgo en la pendiente
t del intercepto a	a=0	$t_a =$	-1,33167719	2,1199	Si $t_{cal} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis	a = 0, no hay sesgo en el intercepto o error sistemático
t de la regresión	No hay correlación entre X y Y	$t =$	282,8144268	2,1199	Si $t_{cal} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis	Sí hay correlación

El ensayo de permeabilidad para candesartán a los dos rangos de pH, se realizó según lo descrito en la metodología, y los resultados de la cinética de paso de candesartán se muestran en la figura 35.

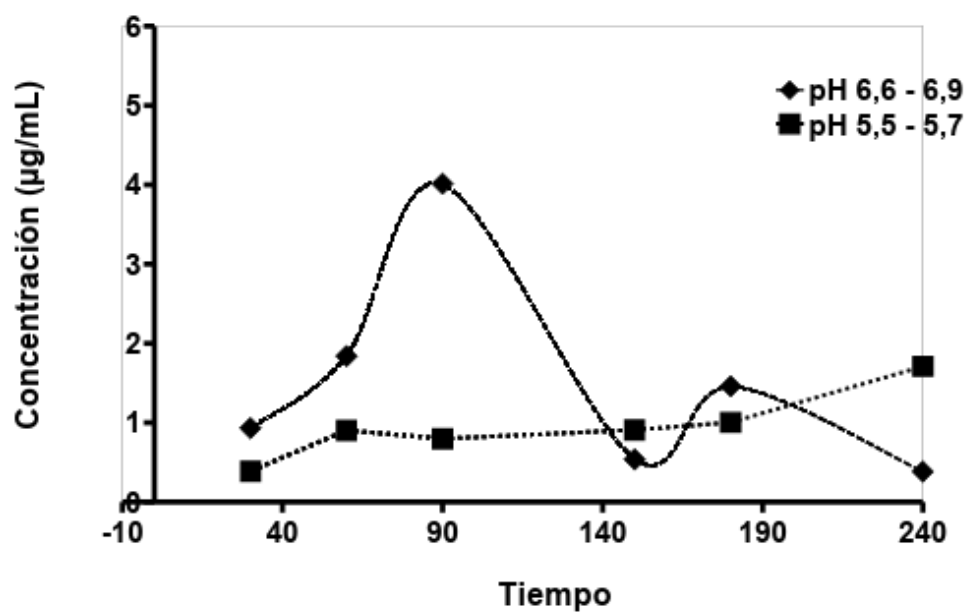
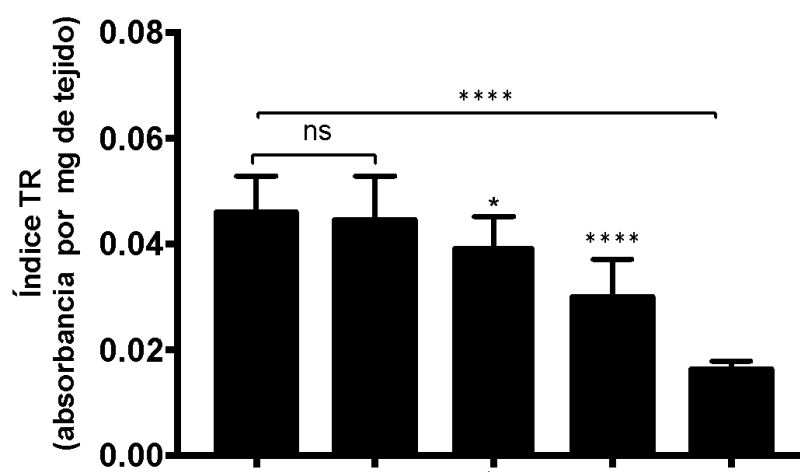
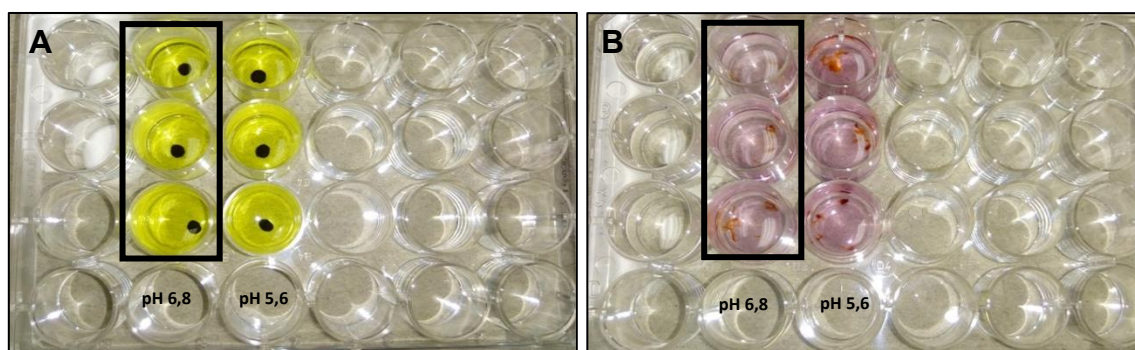


Figura SEQ Figura * ARABIC 35. . Perfil de permeación de candesartán a través de la mucosa oral porcina en dos condiciones de pH. n=3

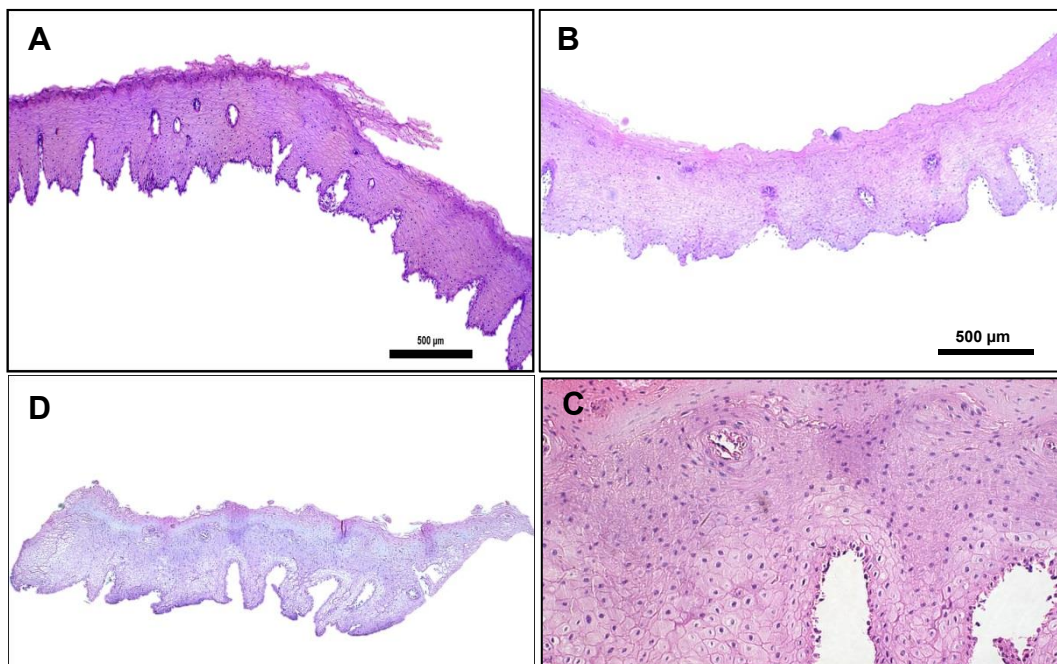
Los resultados de este ensayo muestran, que el paso de candesartán a través de mucosa oral porcina en el rango de pH ácido es de 0,388 $\mu\text{g/mL}$ a los 30 minutos de experimentación, y a ese mismo tiempo, el paso de la molécula solubilizada en el vehículo a pH fisiológico aumenta significativamente, logrando alcanzar una concentración 0,931 $\mu\text{g/mL}$; éste fenómeno de mayor paso de candesartán solubilizado en vehículo a pH fisiológico, sucede hasta los 90 minutos de experimentación, siendo este momento, el de mayor registro de permeación de candesartán y luego se evidencia un descenso significativo en el fenómeno de transporte. Caso contrario ocurre con candesartán solubilizado a pH ácido, donde se registra, que el fenómeno de difusión es más constante en el tiempo, e incluso tiene una cinética de paso con una tendencia leve al aumento.

Evaluación de la viabilidad posterior a los ensayos de permeabilidad

Para los estudios de viabilidad por MTT de mucosas expuestas a candesartán, se evaluaron 3 mucosas acumuladas de 3 ensayos independientes realizados en triplicado para cada rango de pH, figura 36 y 37.



Los resultados de este análisis sugieren que el índice TR calculado para las mucosas expuestas al candesartán solubilizado en el vehículo a los pH 5,5-5,7 y 6,6-6,9, disminuye significativamente respecto al calculado para las mucosas control (mucosa fresca) y mucosa expuesta al vehículo (PBS + Na₂CO₃[0,2M]) ($P < 0,0001$). Sin embargo, fue mayor al observado para las mucosas dañadas ($0,01538 \pm 0,00082$). Lo que podría indicar que el candesartán está afectando la viabilidad celular de las mucosas expuesta a este fármaco.



Para complementar los análisis de viabilidad obtenidos con el ensayo de reducción de MTT, se realizaron estudios histológicos de las mucosas expuestas a candesartán en el rango de los dos pH, y a su vez se evaluó un fragmento de mucosa previo al experimento de permeabilidad. El análisis histológico muestra que las mucosas expuestas a candesartán se ven afectadas en su arquitectura celular, en el rango de pH fisiológico, se evidencia una clara afectación de las capas celulares más superficiales, identificándose una zona edema intercelular en un patrón lineal, a pH ácido esa misma zona muestra alteración morfológica de las células. La vacuolización citoplasmática se evidencia en ambos rangos de pH, así como la conservación de la membrana basal. La muestra de tejido previo al experimento, es comparable con el fragmento de tejido seleccionado como mucosa fresca, conservándose la arquitectura celular, figura 38.

10. DISCUSIÓN

El fenómeno de transporte de compuestos a través de la mucosa bucal se puede evaluar en un entorno controlado a través de técnicas *in vitro*, sin embargo es necesario reconocer y controlar el mayor número de variables que puedan tener impacto sobre los resultados (Nicolazzo et al., 2004). Teniendo en cuenta esto y basados en los reportes de literatura, se estructuraron y desafiaron protocolos que permitieron garantizar la viabilidad e integridad de la mucosa oral antes y durante los ensayos de permeabilidad. Estos protocolos se encuentran actualmente disponibles en el laboratorio y se usan de manera rutinaria para preparar las soluciones requeridas en la toma de la muestra, el transporte, la separación de epitelio, el acondicionamiento de las celdas y en general para realizar todas actividades asociadas a estas pruebas experimentales.

La literatura reporta que el momento indicado para la toma de muestras de mucosa oral porcina es inmediatamente después del sacrificio del animal y esta debe ser transportada en las siguientes dos horas en una solución buffer al laboratorio (Kulkarni et al., 2009b, 2010a; Nicolazzo et al., 2003) Se ha demostrado que el medio de transporte de las mucosas también condiciona el rango de tiempo en él se mantienen viables las muestras, mucosas que son transportadas en

PBS permanecen viables por un periodo de 4h después del sacrificio, mientras que cuando son transportadas en una solución de Krebs-Ringer (Krebs), la viabilidad puede mantenerse hasta por 6h (Shojaei et al., 2001) 9h según (Nicolazzo et al., 2003) o hasta 20h de acuerdo con (Imbert and Cullander, 1999) aunque este mismo autor recomienda realizar ensayos de difusión empleando mucosas de máximo 8 h postmortem.

En este trabajo las mucosas fueron recolectadas a los primeros 15 min postmortem, sin embargo, el transporte hacia el laboratorio podría tomar más de dos horas. Aunque este lapso de tiempo fue difícil de controlar durante el trabajo, fue determinante para separar adecuadamente el epitelio del tejido conectivo, al igual que mantenerlo viable antes y durante los experimentos de permeabilidad.

A pesar de que se empleó una solución de Krebs bicarbonato a un pH de 7,4 gaseada con carbógeno para transportar las muestras al laboratorio, solo fue posible garantizar una viabilidad comparable al de una mucosa fresca cuando las mucosas se usaron durante 4h de experimentación. A las 12 y 16 h, las mucosas disminuyen su viabilidad en el mismo orden de magnitud, pero conservan la membrana basal. Cabe señalar que en términos operativos, puede ser más fácil dejar la mucosa acondicionada en las celdas de Franz durante 12 h y comenzar los ensayos de difusión cuando transcurra este tiempo hasta completar las 16h de experimentación, esto considerando que la integridad y viabilidad para estos dos tiempos fueron comparables, sin embargo, para esto, es necesario implementar nuevas estrategias que permitan aumentar la viabilidad e integridad de estos tejidos, los cuales son parámetros que condicionan los resultados de ensayos de permeabilidad (Rathbone et al., 1994).

En cuanto a la técnica de separación, los estudios realizados por (Kulkarni et al., 2009b), muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de permeación obtenidos a partir de un epitelio separado del tejido conectivo mediante la técnica de calor o aquellos que son separados quirúrgicamente, esto, sumado a las evidencias que sugieren que la función barrera de la mucosa está en el tercio superior del epitelio, soportan la idea de continuar usando este método de separación (Hooda et al., 2012; Morantes et al., 2018; Pather et al., 2008; Squier, 1991)

Por otro lado, han sido varios los métodos utilizados para evaluar la viabilidad de los tejidos, dentro de los que se destaca, el método enzimático del ensayo por MTT. Una prueba que de manera indirecta evalúa la viabilidad tisular a través de la actividad de las enzimas reductasas de tetrazolio, de ahí lo del índice TR (Imbert and Cullander, 1999). Aunque este método es uno de los más usados, (Nicolazzo et al., 2003) reportó inconsistencias entre los resultados del ensayo

y la evaluación histológica, debido a que lo registrado en el ensayo no mostraba la afectación del tejido que sí era significativa cuando se evaluaron histológicamente.

Teniendo en cuenta esto y los resultados que se obtuvieron en las pruebas preliminares con mucosas congeladas, en donde se evidenció que la actividad metabólica en estas mucosas se conservaba y fue comparable a la de una mucosa viable, fue importante implementar los análisis histológicos y buscar un buen control de daño.

De los tratamientos evaluados la exposición a tritón al 10% fue la que causó la mayor reducción en la actividad metabólica. Aunque el proceso congelación disminuyó el tiempo de exposición a tritón pasando de 18h a 3h lo que favorece la dinámica de experimentación, es claro que proceso de congelamiento por sí solo no afecta la viabilidad de las mucosas, esto debido a que la actividad de la tetrazolio reductasa no se ve afectada por el proceso de congelación (Nicolazzo et al., 2003)

El índice TR calculado para la mucosa fresca en este estudio ($0,0472 \pm 0,0078$) fue comparable a lo descrito por Imbert y colaboradores en 1999, en donde demostraron que la media del índice TR para mucosas frescas fue de 0,05; cabe señalar que en el estudio no reportan la desviación estándar, sin embargo, en una gráfica mostrada en este estudio se observa una baja dispersión (Imbert and Cullander, 1999). En otro estudio publicado en el 2003, reportan un índice TR para mucosa fresca de 0,009, menor al observado en este trabajo, estas diferencias en los resultados pueden ser explicadas por variaciones en las condiciones experimentales en las que se realizó el ensayo de reducción de MTT (Nicolazzo et al., 2003).

La media del coeficiente de permeabilidad para cafeína calculada en este trabajo fue de $6,2117 \pm 0,9557 \times 10^{-6}$ cm/s, este valor fue comparable al obtenido por Kulkarni et al 2009 ($6.03 \pm 0.36 \times 10^{-6}$ cm/s) usando mucosas con un espesor de 500 micras, un espesor similar al observado en las muestras procesadas en este trabajo, adicionalmente en otro trabajo publicado por este mismo autor reporta un coeficiente de permeabilidad para mucosa fresca de ($6.13 \pm 0.75 \times 10^{-6}$ cm/s) (Kulkarni et al., 2009b, 2010a).

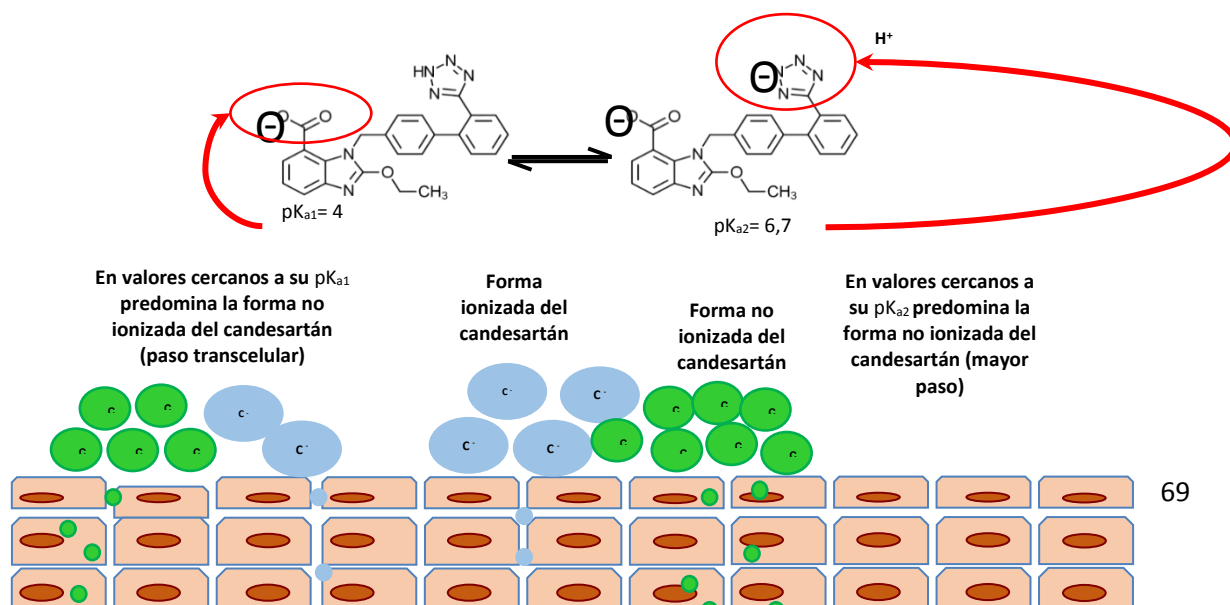
Kulkarni y colaboradores han reportado valores que van desde ($1.38 \pm 0.16 \times 10^{-5}$ hasta $10.8 \pm 1.75 \times 10^{-6}$) estas variaciones en los valores del coeficiente de permeabilidad pueden ser 20 veces mayores, bajo las mismas condiciones experimentales, incluso dentro del mismo laboratorio. En algunos casos se puede encontrar un coeficiente de variación entre el 20 y el 50% hasta el 80% en estudios de permeabilidad *in vitro* (Kulkarni et al., 2009b, 2010a).

Teniendo en cuenta que en la cavidad oral se pueden presentar variaciones en los valores de pH que van desde unos muy ácidos (pH 5,5) hasta el fisiológico (pH 6,8), surgió la idea de evaluar el efecto del pH sobre la permeabilidad de la mucosa oral frente a candesartán. Los resultados de este análisis dejaron ver un perfil de permeación diferencial para esta molécula, sin embargo no fue posible calcular el Paap, debido a que la cinética de paso no mostró una tendencia lineal no fue posible tener una ecuación a partir de la cual se determinará la pendiente cuyo valor es necesario para el cálculo de Paap, por lo tanto, las comparaciones se hicieron en términos de concentraciones en la cámara receptora en diferentes puntos del experimento.

Este comportamiento observado para el candesartán puede ser explicado por: i) la naturaleza química de ésta molécula, cuya estructura se caracteriza por la presencia de dos grupos ionizables, un grupo ácido con un pK_{a1} de 4 y otro básico con un pK_{a2} de 6,7 (Cagigal et al., 2001) y ii) por los principios básicos de la absorción de fármacos, que sugieren que la porción no ionizada de un fármaco es usualmente liposoluble y atraviesa la membrana por difusión pasiva (ruta transcelular) y la porción ionizada no puede atravesar la membrana celular o lo hace escasamente por la ruta paracelular.

El pK_a de un fármaco es el pH al cual la molécula tiene la mitad de sus formas ionizadas y la otra mitad en su forma molecular o sin disociar. Para un fármaco ácido en un pH ácido predominan las formas no ionizadas, para un fármaco básico a un pH básico también predominan las formas no ionizadas. Una molécula ionizada usualmente es hidrofílica y por tanto se disuelve en agua y su paso se da por la ruta paracelular, una molécula no ionizada es usualmente lipofílica y tomaría una ruta transcelular.

Teniendo en cuenta esto, en la figura 39 se propone un modelo a través del cual se busca explicar el fenómeno de permeación para el candesartán en dos rangos de pH.



Este modelo propone que en el rango de pH ácido el candesartán se comportaría como un ácido débil y habría predominio de su forma no ionizada o molecular, produciéndose el paso a través de la mucosa oral porcina por la ruta transcelular de manera constante en el tiempo, a pH básicos, actuaría como una base débil exhibiendo en mayor medida su forma molecular lo cual que favorece un paso de mayor concentración de candesartán a través de la ruta transcelular.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se implementaron las condiciones experimentales para usar la mucosa oral porcina en estudios de permeabilidad *in vitro* de fármacos. Se demostró que el método de recolección, transporte y separación del epitelio, permiten seleccionar mucosas viables e íntegras para las pruebas de permeabilidad.

Se demostró que la mucosa oral porcina conserva su viabilidad e integridad hasta por 4h de experimentación, sugiriendo este como el tiempo más adecuado para realizar estudios de permeabilidad de fármacos.

Se determinó que permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán cafeína y estradiol mostró un perfil diferencial que se asocia a la naturaleza química de las moléculas, siendo en su orden cafeína, candesartán y estradiol.

Se evidencio que el pH cambia el perfil de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a candesartán.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aduba, D.C., Hammer, J. a., Yuan, Q., Andrew Yeudall, W., Bowlin, G.L., and Yang, H. (2013). Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta Biomater.* 9, 6576–6584.
2. Ahad, A., Al-Jenoobi, F.I., Al-Mohizea, A.M., Akhtar, N., Raish, M., and Aqil, M. (2014). Systemic delivery of B-blockers via transdermal route for hypertension. *Saudi Pharm. J.*
3. Albarracín, P., Correa, X., and Galvis, S. (2018). Evaluación del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a la cafeína en función del espesor y viabilidad de la mucosa.
4. Amores, S., Domenech, J., Colom, H., Calpena, A.C., Clares, B., Gimeno, Á., and Lauroba, J. (2014). An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 60, 49–54.
5. Baena, Y., Dallos, L.J., Manzo, R.H., and León, L.F.P.D. (2011). Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos Resumen Standardization of Franz cells to evaluate drugs release from drug- Introducción. *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas* 40, 174–188.
6. Bermejo, M., and Gonzalez-Alvarez, I. (2009). HOW AND WHERE ARE DRUGS ABSORBED? In *PRECLINICAL DEVELOPMENT HANDBOOK*, pp. 249–280.
7. Bind, A.K., Gnanarajan, G., and Kothiyal, P. (2013). A Review: Sublingual Route for Systemic Drug Delivery. *Int. J. Drug Res. Technol.* 3, 31–36.
8. Bobade, N.N., Atram, S.C., Wankhade, V.P., Pande, S.D., and Tapar, K.K. (2013). A Review on Buccal Drug Delivery System. *Int J Pharm Sci Res* 3, 35–40.
9. Brodin, B., Steffansen, B., and Nielsen, C.U. (2010). Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability. In *Molecular Biopharmaceutics*, pp. 135–152.
10. Cagigal, E., González, L., Alonso, R.M., and Jiménez, R.M. (2001). pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 477–486.
11. Campisi, G., Paderni, C., Saccone, R., Fede, O., Wolff, a., and Giannola, L. (2010). Human Buccal Mucosa as an Innovative Site of Drug Delivery. *Curr. Pharm. Des.* 16, 641–652.
12. Cardona-Arias, J., Melissa, V.-A., and Caro-Londoño, A.M. (2016). Prevalencia de la hipertensión arterial y factores asociados en trabajadores de la Plaza Minorista José María Villa, Medellín (Colombia): estudio descriptivo transversal. *Arch. Med.* 16, 43–52.

13. Castro, P., Madureira, R., Sarmiento, B., and Pintado, M. (2016). Tissue-based in vitro and ex vivo models for buccal permeability studies. In *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*, pp. 189–202.
14. Cestário, E.D.E.S., Fernandes, L.A.B., Giollo-Júnior, L.T., Uyemura, J.R.R., Matarucco, C.S.S., Landim, M.I.P., Cosenso-Martin, L.N., Tácito, L.H.B., Moreno, H., Vilela-Martin, J.F., et al. (2018). Resistant Hypertension On Treatment (ResHypOT): Sequential nephron blockade compared to dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system plus bisoprolol in the treatment of resistant arterial hypertension - study protocol for a randomized control. *Trials* 19, 1–11.
15. Darwhekar, G.N., Jain, D.K., and Chouhan, J. (2012). Biopharmaceutical classification of candesartan and candesartan cilexetil. *Asian J. Pharm. Life Sci.* 2, 295–302.
16. Erickson-DiRenzo, E., Sivasankar, M.P., and Thibeault, S.L. (2016). Utility of cell viability assays for use with ex vivo vocal fold epithelial tissue. *Laryngoscope* 15, 942–953.
17. Fonseca-Santos, B., and Chorilli, M. (2018). An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* 86, 129–143.
18. Giannola, L.I., De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Campisi, G., and Wolff, a (2008). Current status in buccal drug delivery. *Pharm. Technol. Eur.* 20, 32+34–39.
19. Harris, D., and Robinson, J.R. (1992). Drug delivery via the mucoas membranes of the oral cavity. *J. Pharm. Sci.* 81, 1–10.
20. Havlíková, L., Nováková, L., Matyssová, L., Šícha, J., and Solich, P. (2006). Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1119, 216–223.
21. Hooda, R., Tripathi, M., and Kapoor, K. (2012). A Review on Oral Mucosal Drug Delivery System. *Pharma Innov.* 1, 14–21.
22. Hoogstraate, A.J., Cullander, C., Nagelkerke, J.F., Senel, S., Verhoef, J.C., and Junginger, H. E. & Boddé, H.E. (1994). Diffusion Rates and Tranport Pathways of Fluorescein Isothiocunate (FITC)-Labeled Model Compounds Through Buccal Epithelium. *Pharm. Res.* 11, 83–89.
23. Husain, A., Azim, S., Mitra, M., Bhasin, P.S., Husain, A., and Azim, S. (2011). A Review on Candesartan : Pharmacological and Pharmaceutical Profile. *J. Appl. Pharm. Sci.* 01, 12–17.
24. Imbert, D., and Cullander, C. (1997). Assessment of cornea viability by confocal laser scanning microscopy and MTT assay. *Cornea* 16, 666–674.

25. Imbert, D., and Cullander, C. (1999). Buccal mucosa in vitro experiments. I. Confocal imaging of vital staining and MTT assays for the determination of tissue viability. *J. Control. Release* 58, 39–50.
26. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., and & Jasti, B. (2009a). Porcine Buccal Mucosa as an In Vitro Model: Relative Contribution of Epithelium and Connective Tissue as Permeability Barriers. *J. Pharm. Sci.* 98, 471–483.
27. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., and Jasti, B. (2009b). Porcine buccal mucosa as an in vitro model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J. Pharm. Sci.* 98, 471–483.
28. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., and Jasti, B. (2010a). Porcine buccal mucosa as in vitro model: Effect of biological and experimental variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277.
29. Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., and & Jasti, B. (2010b). Porcine Buccal Mucosa as In Vitro Model: Effect of Biological and Experimental Variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277.
30. Leong, X.F., Ng, C.Y., Badiah, B., and Das, S. (2014). Association between hypertension and periodontitis: Possible mechanisms. *Sci. World J.* 2014.
31. López-Jaramillo, P., Sánchez, R. a., Diaz, M., Cobos, L., Bryce, A., Carrillo, J.Z.P., Lizcano, F., Lanas, F., Sinay, I., Sierra, I.D., et al. (2013). Latin American consensus on hypertension in patients with diabetes type 2 and metabolic syndrome. *J. Hypertens.* 31, 223–238.
32. Málek, F. (2013). Arterial hypertension and chronic heart failure. *Cor Vasa* 55, 259–263.
33. Martin-Cabezas, R., Seelam, N., Petit, C., Agossa, K., Gaertner, S., Tenenbaum, H., Davideau, J.L., and Huck, O. (2016). Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.* 180, 98–112.
34. Ministerio de Salud (2017). DÍA MUNDIAL DE L A HIPERTENSIÓN ARTERIAL Colombia. 4, 11.
35. Moharamzadeh, K., Franklin, K. L., Smith, L. E., Brook, I. M., & van Noort, R. (2014). Evaluation of the Effects of Ethanol on Monolayer and 3D Models of Human Oral Mucosa. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 05.
36. Morantes, S.J., Buitrago, D.M., Ibla, J.F., García, Y.M., and Lafaurie, G. I., Parraga, J.E. (2018). Biopolymer-Based Composites. In *Composites of Hydrogels and Nanoparticles: A Potential Solution to Current Challenges in Buccal Drug Delivery.*, pp. 107–138.

37. Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.
38. Narang, N., and Sharma, J. (2011). Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 18–22.
39. Ng, S.-F., Rouse, J.J., Sanderson, F.D., Meidan, V., and Eccleston, G.M. (2010). Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* 11, 1432–1441.
40. Nicolazzo, J.A., and C.Finnin, B. (2008). In Vivo and In Vitro Models for Assessing Drug Absorption Across the Buccal Mucosa. In *Drug Absorption Studies*, C. Ehrhardt, and K. Jin Kim, eds. (New York: American Association of Pharmaceutical Scientists), pp. 89–111.
41. Nicolazzo, J. a, Reed, B.L., and Finnin, B.C. (2003). The Effect of Various In Vitro Conditions on the Permeability Characteristics of the Buccal Mucosa. *J. Pharm. Sci.* 92, 2399–2410.
42. Nicolazzo, J. a., Reed, B.L., and Finnin, B.C. (2004). Assessment of the Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on the Buccal Permeability of Caffeine and Estradiol. *J. Pharm. Sci.* 93, 431–440.
43. Nicolazzo, J. a., Reed, B.L., and Finnin, B.C. (2005). Buccal penetration enhancers - How do they really work? *J. Control. Release* 105, 1–15.
44. Nielsen, H.M., and Rassing, M.R. (2002). Nicotine permeability across the buccal TR146 cell culture model and porcine buccal mucosa in vitro: Effect of pH and concentration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 151–157.
45. Patel, V.F., Liu, F., and Brown, M.B. (2012). Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. *J. Control. Release* 161, 746–756.
46. Pather, C.S.K. and I. (2015). Characterization Methods for Oral Mucosal Drug Delivery. In *Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy*, pp. 125–148.
47. Pather, S.I., Rathbone, M.J., and Şenel, S. (2008). Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5, 531–542.
48. Perera, V., Gross, A.S., and McLachlan, A.J. (2010). Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomed. Chromatogr.* 24, 1136–1144.
49. PubChem, I.N.C. for B. PubChem.
50. Rathbone, M.J., Drummond, B.K., and Tucker, I.G. (1994). The oral cavity as a site for systemic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, 1–22.

51. Roblegg, E., Fröhlich, E., Meindl, C., Teubl, B., Zaversky, M., and Zimmer, A. (2012). Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology* 6, 399–413.
52. Sanabria, L. (2017). Contribución a la implementación de un ensayo de permeación bucal, in vitro, empleando cafeína como compuesto modelo.
53. Sanchez, R. a, Ayala, M., Baglivo, H., Velazquez, C., Burlando, G., Kohlmann, O., Jimenez, J., Jaramillo, P.L., Brandao, A., Valdes, G., et al. (2009). Latin American guidelines on hypertension. Latin American Expert Group. *J. Hypertens.* 27, 905–922.
54. Sankar, V., Hearnden, V., Hull, K., Juras, D.V., Greenberg, M., Kerr, A., Lockhart, P., Patton, L., Porter, S., and Thornhill, M. (2011). Local drug delivery for oral mucosal diseases: Challenges and opportunities. *Oral Dis.* 17, 73–84.
55. Sattar, M., Sayed, O.M., and Lane, M.E. (2014). Oral transmucosal drug delivery - Current status and future prospects. *Int. J. Pharm.* 471, 498–506.
56. Shojaei, A.H. (1998). Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery : A Review Epithelium Lamina Propria. *J Pharm Pharm. Sci.* 1, 15–30.
57. Shojaei, A.H., Chang, R.K., Guo, X., Burnside, B.A., and Couch, R.A. (2001). Systemic Drug Delivery via the Buccal Mucosal Route. *Pharm. Technol.* 70–81.
58. Squier, C. a (1991). The Permeability of Oral Mucosa. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2, 13–32.
59. Squier, C. a., and Kremer, M.J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 52242, 7–15.
60. Sudhakar, Y., Kuotsu, K., and Bandyopadhyay, a. K. (2006). Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Release* 114, 15–40.
61. Wertz, P.W., and Squier, C. a (1991). Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8, 237–269.
62. Xia, B., Yang, Z., Zhou, H., Lukacova, V., Zhu, W., Milewski, M., and Kesisoglou, F. (2015). Development of a Novel Oral Cavity Compartmental Absorption and Transit Model for Sublingual Administration: Illustration with Zolpidem. *AAPS J.* 17, 631–642.