

**EVALUACIÓN DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA ORAL PORCINA FRENTE A
LA CAFEÍNA EN FUNCIÓN DEL ESPESOR Y VIABILIDAD DE LA MUCOSA**

PAULA ANDREA ALBARRACÍN VÉLEZ

ÁNGELA XIMENA CORREA LEGUIZAMÓN

JUAN SEBASTIÁN GALVIS DÍAZ

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.- MAYO 2018

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a la cafeína, en función del espesor y viabilidad de la mucosa
Grupo 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:	Pregrado
Estudiantes:	Paula Andrea Albarracín Vélez Juan Sebastián Galvis Díaz Ángela Ximena Correa Leguizamón
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesores temáticos:	Dra. Sandra Johanna Morantes Medina Dr. José Francisco Ibla Gordillo Dra. Jenny García

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARÍA CLARA RANGEL G.	Rectora
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrectora Académica
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SÁNCHEZ PARÍS	División Postgrados
MARÍA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GÓMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARÍA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DÍAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVÁN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“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”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Anatomía de la cavidad oral	3
2.2 Mucosa oral como ruta alternativa para la administración de fármacos	4
2.3 Mucosa oral porcina	5
2.4 Cafeína	5
2.5 Ensayo de viabilidad con MTT	6
2.6 Permeabilidad de la mucosa	7
2.7 Coeficiente de permeabilidad	7
2.8 Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC	8
3. Planteamiento del problema	9
4. Justificación	10
5. Situación Actual	12
6. Objetivos	14
7. Metodología del Proyecto	15
7.1. Tipo de estudio	15
7.2. Población y	15
7.3. Muestra.	15
7.4 Métodos y técnicas para la recolección de la información	15
7.4.1 Conservación y transporte	16
7.4.2 Separación del epitelio	16
7.4.3 Acondicionamiento de la mucosa oral en Celdas de Franz	17
7.4.4 Evaluación de viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT	17
7.4.5 Análisis histomorfométrico	18
7.4.6 Evaluación del coeficiente de permeabilidad en mucosa oral frente a cafeína	19
7.4.7 Metodología HPLC	20
7.5 Hipótesis de estudio	21

7.6 Plan de análisis de la información	21
8. Consideraciones éticas.	22
9. Resultados	23
10. Discusión	35
11. Conclusiones	38
12. Referencias bibliográficas	39
13. Anexos	42

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Condiciones cromatográficas del HPLC para cafeína.	20
TABLA 2. Estadística descriptiva de mediciones de espesor para mucosa fresca	25
TABLA 3. Estadística descriptiva para índice de Viabilidad Mucosa Oral Porcina en diferentes tiempos de experimentación.	30
TABLA 4. Valores de espesor, índice TR y coeficiente de permeabilidad para mucosa con cafeína	32
TABLA 5. Estadística descriptiva para las evaluaciones de espesor, Índice TR y coeficiente de permeabilidad para mucosas tratadas con cafeína	32
TABLA 6. Estadística descriptiva para índice de Viabilidad de Mucosa Oral Porcina expuesta a Cafeína	33

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Anatomía de la mucosa oral.	3
FIGURA 2. Estructura de la cafeína.	6
FIGURA 3. Recolección de la muestra.	15
FIGURA 4. Transporte de la muestra	16
FIGURA 5. Acondicionamiento para la separación.	16
FIGURA 6. Mucosa después de la separación y disposición en las celdas de Franz.	17
FIGURA 7. Mucosa en MTT Y Dimetilsulfoxido.	18
FIGURA 8. Programa imageJ para las mediciones.	19
FIGURA 9. Imagen de espesor epitelial.	19
FIGURA 10. Mucosas puestas sobre las cámaras receptoras.	19
FIGURA 11. Equipo shimadzu prominence.	20
FIGURA 12. Mucosa oral porcina sin tejido conectivo.	23
FIGURA 13. Mediciones de espesor mucosa fresca.	24
FIGURA 14. Mucosa oral porcina procesada en el laboratorio del instituto UIBO.	25
FIGURA 15. Índice de viabilidad de mucosa porcina comparando fresca vs dañada.	26
FIGURA 16. Viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT.	27
FIGURA 17. Mucosa fresca y mucosa dañada.	28
FIGURA 18. Índice de viabilidad de mucosa oral en diferentes tiempos.	29
FIGURA 19. Influencia del tiempo de experimentación y tratamiento con cafeína.	30
FIGURA 20. Índice de viabilidad de mucosa oral porcina expuesta a cafeína.	32
FIGURA 21. Mucosa oral porcina tratada con cafeína a las 4 horas.	33
FIGURA 22. Viabilidad por ensayo de reducción MTT en mucosas tratadas.	34

RESUMEN

EVALUACIÓN DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA ORAL PORCINA FRENTE A LA CAFEÍNA, EN FUNCIÓN DEL ESPESOR Y VIABILIDAD DE LA MUCOSA

Antecedentes: Las rutas transepiteliales se han explorado como alternativas para la administración de fármacos. Dentro de ellas se encuentra la mucosa oral, ya que ofrece muchas ventajas sobre las rutas convencionales. Se han utilizado diferentes moléculas como control de paso, una de ellas, es la cafeína, una molécula de naturaleza hidrofílica que difunde fácilmente a través de la mucosa. Una amplia variación en los parámetros cinéticos calculados para esta molécula ha sido descrita en la literatura. Estas variaciones han sido asociadas a diferencias en los métodos de procesamiento de las muestras, cambios en el espesor y alteraciones en la viabilidad.

Objetivo: Evaluar el coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a cafeína, en función del espesor y viabilidad de la mucosa.

Materiales y métodos: Las muestras de mucosa oral porcina fueron transportadas y procesadas siguiendo un protocolo previamente establecido en el laboratorio. Una vez separado el epitelio, se evaluó su viabilidad a través del ensayo de reducción de MTT a diferentes tiempos de experimentación. La viabilidad tisular se reportó en términos de unidades de absorbancia por mg de tejido (índice TR). Adicionalmente se determinó el espesor de mucosas frescas y mucosas expuestas a cafeína, finalmente se evaluó el coeficiente de permeabilidad de la cafeína. Como controles, se emplearon mucosas frescas y mucosas sin actividad metabólica aparente. 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 ($0,0471 \pm 0,0078$) sin observarse diferencias significativas $p > 0,05$. Los resultados de espesor en las pruebas de difusión de cafeína fueron comparables entre sí, al igual que la viabilidad. Una mayor variación fue observada para el coeficiente de permeabilidad.

Conclusiones: Para el grupo de mucosas evaluado, se observó que no hay una clara correlación entre los valores del coeficiente de permeabilidad calculados para cafeína, el índice TR y el espesor de las mucosas.

Palabras claves: mucosa oral porcina, viabilidad, espesor, coeficiente de permeabilidad.

ABSTRACT

EVALUATION OF PORCINE ORAL MUCOUS PERMEABILITY COEFFICIENT COMPARED TO CAFFEINE IN FUNCTION OF MUCOUS THICKNESS AND VIABILITY

Background: Trans-epithelial routes have been explored as alternatives for pharmaceutical administration. Among them is the oral mucous because it offers advantages with regards to conventional routes. Different molecules have been used as passage control; one of them being caffeine – which has a hydrophilic nature and is easily diffused through mucous. An ample variation of the kinetic parameters calculated for this molecule has been described in literature. These variations have been associated with differences in process methods of samples, thickness variations and viability alterations.

Objective: to evaluate the permeability coefficient of porcine oral mucous with compared to caffeine regarding thickness and viability.

Materials and methods: Porcine oral mucous samples were transported and processed following a previously established protocol in the laboratory. Once the epithelium had been separated, its viability was evaluated by means of the MTT reduction with varying trial times. Tissue viability was reported in terms of absorbency units per mg of tissue (TR index). The thickness of fresh mucous and those exposed to caffeine were determined as well as the caffeine's permeability coefficient. Fresh mucous and mucous without apparent metabolic activity were used as controls. The results were compared by means of parametric and non-parametric tests depending on the Shapiro-Wilk normality test. The statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results: The mucous' viability after four hours of testing (0.0478 ± 0.0076) is comparable to that of fresh mucous (0.0478 ± 0.0076). Thickness results from the caffeine diffusion tests were compared among them as well as viability. A higher variation was observed for the permeability coefficient.

Conclusions: No clear co-relation was observed between calculated permeability coefficient for caffeine, the TR index and mucous thickness among the evaluated samples.

Key words: porcine oral mucous, viability, thickness, permeability coefficient.

INTRODUCCIÓN

La entrega de fármacos a través de rutas transepiteliales se han explorado como alternativa para la administración de estos. La mucosa oral, la cual presenta más ventajas que la vía gastrointestinal, presenta mayor permeabilidad, es altamente vascularizada y muestra tiempos de recuperación cortos después de un daño o tensión. Sin embargo, la mucosa bucal también actúa como una barrera fisiológica para prevenir la absorción de agentes exógenos (Bobade et al., 2013; Giannola et al., 2008). Para superar las propiedades de barrera de la mucosa, es importante conocer la estructura del tejido y entender los procesos involucrados en el transporte de fármacos a través de esta barrera (Imbert & Cullander, 1999).

La mucosa oral consta de regiones hidrofílicas y lipofílicas, por lo tanto, se ha sugerido que puede proporcionar dos vías para el transporte de fármacos, una es la vía paracelular (entre las células) y la otra es la vía transcelular (a través de las células) (Castro et al., 2016; Nicolazzo et al., 2003).

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 estudios de permeabilidad de fármacos, esto debido a que su morfología y permeabilidad son muy similares a las de la mucosa bucal humana (Nicolazzo et al., 2003).

La barrera de permeabilidad de la mucosa bucal se ha atribuido al tercio superior del epitelio, que a diferencia del estrato córneo, contiene células con una variedad de organelos funcionales que contribuyen con esta función (Rathbone & Tucker, 1993). Otros estudios indican que la lámina basal también podría desempeñar un papel importante como barrera de absorción (Sudhakar et al., 2006).

Pruebas in vitro han demostrado que la función de barrera de la mucosa se puede ver afectada por pérdida de integridad y viabilidad de la mucosa. Para realizar estudios de permeabilidad de compuestos es fundamental emplear condiciones experimentales que conserven estas dos propiedades y así obtener datos más reproducibles en los ensayos de permeabilidad (Rathbone & Tucker, 1993).

Se ha demostrado que el espesor de la mucosa también aporta a la variación en los resultados de permeabilidad, (Nicolazzo et al., 2009) hacen un recuento de estudios en los que emplean mucosas con diferentes espesores (500 μm ; 500 - 600 μm ; 600-800 μm ; 770 ± 280 μm ; 736 ± 110 μm y hasta 1000 μm) y concluyen que estas diferencias en el espesor generan variaciones en los resultados de permeabilidad (Kulkarni et al., 2009).

Algunos estudios muestran que un aumento en el espesor de la mucosa de 100 μm disminuye significativamente la permeabilidad de fármacos (Kulkarni et al., 2008). Esto indica la importancia de mantener un espesor uniforme mientras se llevan a cabo ensayos de permeabilidad (Kulkarni et al., 2009).

De acuerdo con la ley de difusión de Fick, la permeabilidad de un difusor es inversamente proporcional al espesor de la membrana. Otros estudios de permeabilidad indican que un aumento en espesor de la mucosa, causa una mayor disminución en la permeabilidad de los difusores lipofílicos que en los difusores hidrofílicos (Vries et al., 1991).

En este trabajo se determinó la influencia del tiempo de separación del epitelio sobre la viabilidad del tejido, se evaluaron 4h, 12h y 16h, el análisis se realizó mediante evaluación histológica y el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (MTT), el cual se ha utilizado como método Gold estándar para evaluar la viabilidad de mucosa bucal (Imbert & Cullander, 1999).

Adicionalmente, con esta investigación se quiso evaluar el coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina en función del espesor y viabilidad de la mucosa, utilizando cafeína (CAF) como modelo de permeabilidad hidrofílico, debido a las propiedades fisicoquímicas de este fármaco que favorecen su fácil difusión a través de la mucosa bucal. Los resultados obtenidos estuvieron direccionados a explorar el comportamiento de estas variables bajo las condiciones experimentales establecidas previamente en el laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO

El cuerpo humano interactúa con el medio ambiente en formas diferentes; por lo tanto, todas las superficies que están en contacto con el entorno actúan como barreras. La mucosa bucal actúa como una barrera fisiológica para evitar la absorción de sustancias exógenas. Para emplearla como una vía de administración es importante superar estas propiedades de barrera, conocer su estructura (ver figura 1) y comprender los procesos implicados en el transporte del fármaco a través de esta (Sankar et al., 2011).

La mucosa bucal representa un 60% de la superficie total dentro de la cavidad oral y su función de barrera está garantizada principalmente por: la saliva, las uniones celulares en el epitelio y los gránulos de recubrimiento. Pese a su función de barrera se ha demostrado que esta estructura ofrece una buena oportunidad para que los fármacos sean absorbidos (Squier & Kremer, 2001).

2.1 Anatomía de la cavidad oral:

La cavidad bucal humana incluye mucosa lingual, palatina, labial y gingival, que muestran una considerable variabilidad estructural, con tres tipos principales de mucosa según su función: mucosa masticatoria, mucosa de revestimiento y mucosa especializada (Squier & Kremer, 2001).

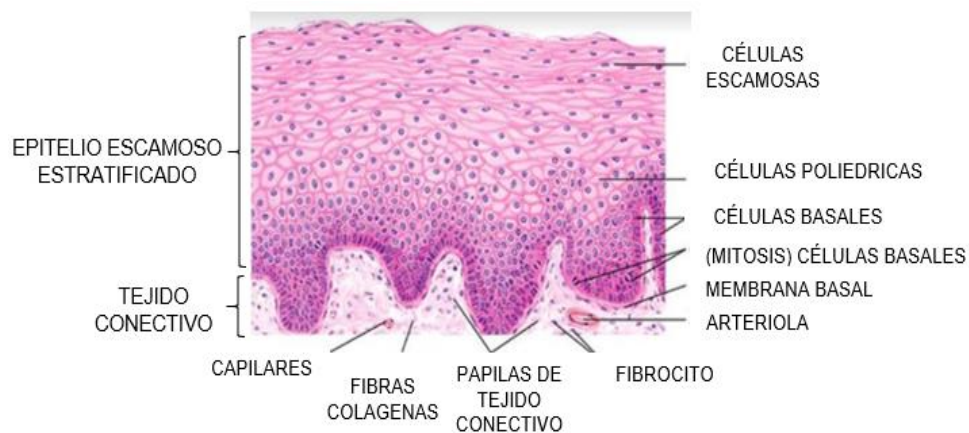


Figura 1. Anatomía de la mucosa oral adaptación de (Ferrer & Vanegas, 2017).

Estas regiones pueden usarse para el suministro de diferentes agentes terapéuticos tópicos (Imbert & Cullander, 1999).

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 membrana basal (Squier & Kremer, 2001). Al analizar las capas de células epiteliales de la mucosa bucal por medio de microscopía óptica mediante histopatología y reacciones de inmunohistoquímica se puede evaluar morfología de las células del tejido y organización desmosomal de las células (Campisi et al., 2010).

2.2 Mucosa oral como ruta alternativa para la administración de fármacos:

La mucosa bucal está constituida por regiones hidrófilas y lipófilas, por esta razón se ha sugerido que esta tiene dos vías para el transporte de fármacos: paracelular (entre las células) y transcelular (a través de las células) (Sattar et al., 2014; Sudhakar et al., 2006; Squier, 1991).

Un fármaco debe interactuar con sus receptores en los sitios de acción o dianas terapéuticas para ejercer sus efectos farmacológicos o tóxicos. El paso esencial, por lo tanto, después de la administración del fármaco por cualquier vía extravascular es la absorción hacia la circulación sistémica para ser distribuida a tejidos y órganos (Bind et al., 2013). Las barreras que el fármaco tiene que cruzar antes de alcanzar el flujo sanguíneo están integradas por membranas celulares semipermeables en todas las vías de administración (Hooda et al., 2012).

A pesar de que la vía oral es la vía más comúnmente empleada para la administración de medicamentos, la mucosa bucal (carrillo) posee muchas ventajas sobre otras vías, ya que los fármacos que son administrados a través de esta ruta, no se degradan en el tracto gastrointestinal ni están sujetos al metabolismo de primer paso en el hígado (Shinkar et al., 2012).

Por lo general en estos estudios in vitro de administración de fármacos transdérmicos se prefiere el uso de tejido no queratinizado, ya que el tejido queratinizado, por su capa más superficial (estrato córneo), ha demostrado ser la principal barrera limitante para la absorción del fármaco,

teniendo en cuenta esto, para estudios de permeabilidad en mucosa, se prefieren las regiones no queratinizadas (Nicolazzo, 2008).

2.3 Mucosa oral porcina:

Debido a que la mucosa bucal humana es difícil de obtener en cantidades suficientes para estudios de permeabilidad in vitro, además de las consideraciones éticas (Squier, 1991). Se han usado modelos de mucosa bucal de diversos animales tales como conejos, perros, monos, hámsteres y cerdos, a través del tiempo en diferentes estudios experimentales in vitro (Squier & Kremer, 2001). Sin embargo, la mucosa oral porcina por su similitud a la mucosa oral humana en estructura, morfología y permeabilidad, se ha sugerido como modelo estándar en estudios de coeficiente de permeabilidad y absorción de fármacos in vitro (Nicolazzo et al., 2003; Kulkarni et al., 2009).

Existen métodos para determinar el coeficiente de permeabilidad usando diferentes tipos de ensayos de difusión, sin embargo, para validar los resultados, es importante asegurar que la mucosa esté viable e íntegra y en lo posible con pocas variaciones en el espesor (Nicolazzo et al., 2003).

2.4 Cafeína:

Se han utilizado diferentes moléculas como control del paso de fármacos en estudios in vitro de la mucosa oral, una de ellas es la cafeína. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y, por lo tanto, no tiene estereoisómeros. La cafeína es un compuesto estimulante del sistema nervioso central, con efectos farmacológicos similares a los de otras metilxantinas. Su solubilidad acuosa es de 21 mg/mL, tiene un PK_a de 14.0 a 25 °C y su estructura está representada en la figura 2 (Lozano et al., 2007).

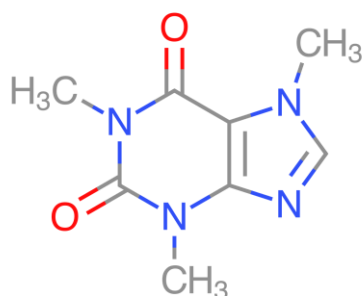


Figura 2. Estructura de la cafeína.

2.5 Ensayo de viabilidad con MTT:

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul llamado formazán, permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir de manera indirecta la supervivencia y proliferación celular (Mossman, 1983).

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mossman, 1983). Varios estudios sugieren que el ensayo de reducción del MTT es una prueba fácil, fiable, sensible y reproducible que se puede realizar rutinariamente en la mayoría de los laboratorios (Imbert & Cullander, 1997).

Al evaluar la viabilidad de la mucosa bucal y al determinar los límites del uso de tejidos en condiciones experimentales in vitro, pueden aparecer diferentes variables que pueden afectar los resultados (Roblegg et al., 2012). Diferentes estudios han 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).

2.6 Permeabilidad de la mucosa:

La permeabilidad de la mucosa oral se refiere a la propiedad de la membrana de permitir el paso de diferentes moléculas, la cual puede alterarse tanto por exceso del paso como por defecto (Sankar et al. 2011). Algunos estudios de permeabilidad in vitro en donde se emplean diversos marcadores químicos, muestran que la difusión de estos compuestos varía en las diferentes partes de la cavidad oral, sugiriendo que la mucosa no queratinizada es una alternativa para la administración de fármacos, ya que es mucho más permeable que otras partes de la cavidad oral (Hooda et al., 2012)

En estudios de bicapas de membrana, se ha evaluado la función de barrera ofrecida por el epitelio y la región del tejido conectivo. Han encontrado que la disminución de permeabilidad en la membrana se le atribuye a un aumento en el espesor de tejido conectivo. Sin embargo el epitelio actúa como una barrera primaria para la penetración de todos los difusores estudiados (Squier & Kremer 2001; Hooda et al., 2012).

2.7 Coeficiente de permeabilidad:

Para poder establecer cómo varía el coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral frente a la cafeína en función de la viabilidad y el espesor de la mucosa, es importante entender las leyes de Fick. La primera Ley de Fick relaciona el flujo difusivo de la cafeína con la concentración. Esta ley postula que el flujo va desde una región de alta concentración a las regiones de baja concentración, con una magnitud que es proporcional al gradiente de concentración, por consiguiente la cafeína se moverá desde una región de alta concentración a una de baja concentración atravesando la mucosa oral porcina (Kulkarni et al., 2008).

Una de las formas para calcular el coeficiente de permeabilidad es:

$$P_{app} = \left(\frac{dC_r}{dt} \right) * \left(\frac{V_r}{A * C_o} \right)$$

Donde $\frac{dC_r}{dt}$ = Es la pendiente de la gráfica de concentración vs tiempo de difusión de cada mucosa.

V_r =Volumen de la cámara receptora

A =Área de la mucosa

C_o =Concentración de la Cámara donadora

Dentro de los modelos in vitro 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 animal, humano o sintético. Las celdas de Franz permiten evaluar la cinética de liberación a partir de diferentes sistemas farmacéuticos, especialmente aquellos de liberación controlada de moléculas biológicamente activas (Roblegg et al., 2012; Rouso et al., 2010; Baena, 2011)

2.8 Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC:

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy se conoce como cromatografía. Existen diferentes tipos de cromatografías y una de ellas es la cromatografía líquida de alta eficiencia (high-performance liquid chromatography (HPLC)). Esta es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar física y cuantitativamente los distintos componentes de una solución (Díaz et al., 2011).

Esta metodología se caracteriza por la presencia de dos fases; una fase móvil y una fase estacionaria. La fase móvil es un solvente que fluye a través de una columna o fase estacionaria y que actúa como portador de la muestra a analizar. La fase estacionaria comúnmente está constituida por partículas sólidas microporosas esféricas de sílice muy puro, empaquetadas dentro de la columna y que son permeables al disolvente (Díaz et al., 2011).

A diferencia de la cromatografía de gases, el análisis por HPLC no está limitado por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. El ensayo de HPLC es capaz de separar moléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular, además es una técnica sensible, de fácil adaptación para determinaciones cuantitativas exactas (Mossman, 1983; Méndez & Carmen, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La administración de medicamentos a través de la mucosa bucal humana, se ha considerado como una opción a la administración de medicamentos para aquellas sustancias que se degradan en el tracto gastrointestinal o en el hígado. La mucosa bucal actúa como una barrera fisiológica para evitar la absorción de sustancias exógenas. Para emplear la mucosa oral humana como una vía de administración es importante superar las propiedades de barrera, conocer su estructura y comprender los procesos implicados en el transporte del fármaco a través de esta (Hooda et al., 2012).

Es importante tener en cuenta que la disponibilidad de la mucosa oral humana es limitada, por lo tanto, se ha visto la necesidad de sustituirla por mucosa oral animal, haciendo una buena elección de la mucosa con la cual se vaya a trabajar, ya que esta debe ser similar en estructura, morfología, y comportamiento fisiológico a la humana (Nicolazzo et al., 2003).

El mecanismo alternativo para estudiar la permeabilidad del tejido seleccionado es el empleo de métodos e instrumentos de difusión in vitro, como pueden ser celdas de Franz, cámaras Ussing u otros aparatos de difusión similar. Usando estos instrumentos es posible evaluar la permeabilidad de la mucosa frente a moléculas de diferente naturaleza química y además se pueden analizar áreas específicas del epitelio de la cavidad oral bajo condiciones controladas (Sudhakar et al., 2006). La viabilidad es un parámetro que se ha ignorado en estudios donde se utilizan modelos in vitro, se ha descrito también que tiene el potencial para afectar directamente los resultados obtenidos, por esta razón, es fundamental evaluar cuidadosamente este parámetro (Rathbone & Tucker, 1993).

Muchas investigaciones se centran en estudiar la mucosa oral como ruta alternativa para la administración de fármacos, propiedades como la viabilidad, el espesor y el coeficiente de permeabilidad de diferentes moléculas varía ampliamente entre estudios. Por esta razón, el grupo UIBO de la universidad El Bosque, quiso estudiar la variación en los resultados del coeficiente de permeabilidad de la cafeína en mucosa oral porcina y la influencia que pudiera tener los resultados de viabilidad y de espesor de la mucosa en las condiciones experimentales establecidas en el laboratorio.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años numerosos estudios en todo el mundo han centrado su atención en las rutas orales transepiteliales como alternativas para la administración y liberación de fármacos, esto con el fin de obtener una mejor actividad terapéutica y menos efectos adversos (Giannola et al., 2008; Delphine Imbert & Cullander, 1999).

La cavidad oral como vía de administración tiene varias ventajas entre las que se encuentran: una reducción significativa de los efectos secundarios relacionados con la dosis, permite un ingreso directo del fármaco a la circulación sistémica, evita el efecto de primer paso y su degradación gastrointestinal, además esta vía ofrece una rápida recuperación celular tras el estrés o daño local, así como la capacidad para soportar condiciones ambientales extremas como el cambio en el pH y la temperatura .

La mucosa oral en comparación con la administración parenteral es relativamente simple, no invasiva y evita los riesgos de infecciones o lesiones asociadas a la vía parenteral, aunque esta presenta limitantes como lo son: restricción en actividades como comer y beber por algunos minutos, una vez se coloca el fármaco en el sitio de absorción. Por otro lado, existe la posibilidad de que el paciente pueda tragar el fármaco y perder su acción por el contacto con la saliva. Los 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 (Kulkarni et al., 2011).

En términos de acceso a la muestra de mucosa oral porcina para ensayos in vitro, esta exige menores consideraciones éticas y su obtención es de bajo costo. También es importante señalar que estudios de permeabilidad realizados en este modelo exhiben una buena correlación con resultados obtenidos en estudios in vivo (Méndez & Carmen, 2008). Dentro de los modelos in vitro 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 animal (Kulkarni et al., 2009).

Pese a que este es un modelo ampliamente aceptado para estudios de permeabilidad de fármacos, existe una gran limitante con relación a la obtención de resultados reproducibles. Se ha descrito que en este modelo el coeficiente de variación puede llegar a ser hasta del 80% entre

laboratorios. En ensayos independientes realizados por el mismo laboratorio el resultado puede variar hasta un 20% (Markiewicz et al., 2007).

Esta variabilidad en las estimaciones de permeabilidad puede ser explicada por limitaciones en el control de las condiciones pre experimentales, experimentales y pos experimentales. El uso de diferentes regiones de la mucosa, condiciones transporte, métodos de procesamiento de la muestra pueden producir cambios en la viabilidad, integridad y espesor de la mucosa. Por otro lado la temperatura, velocidad de agitación, el tipo, naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor pueden condicionar los valores de coeficiente de permeabilidad que se obtengan (Kulkarni et al., 2011).

La realización de este estudio permitirá obtener unos valores de referencia que podrán ser comparados con los descritos en la literatura para cafeína, una molécula que difunde fácilmente a través de la mucosa. Se establecerá qué influencia tiene la viabilidad y el espesor sobre la variación del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral frente a cafeína.

En la literatura se muestran diferencias con respecto a los protocolos empleados para la preparación, transporte y mantenimiento del tejido, así como las estrategias empleadas para realizar los análisis de permeabilidad, por lo cual es importante para esta investigación encontrar las condiciones experimentales que garanticen un mínimo de variabilidad en los valores del coeficiente de permeabilidad de la cafeína y que esté a su vez sirva como un control interno del manejo de la mucosa.

5. SITUACIÓN ACTUAL

Algunos de los principales obstáculos para los agentes terapéuticos en la administración oral, son el metabolismo pre sistémico y la inestabilidad en entornos ácidos, que resultan en una inadecuada o disminuida absorción (Markiewicz et al., 2007). En las últimas décadas, en laboratorios de todo el mundo se están explorando rutas transmucosales alternativas a la oral y parenteral. La administración transmucosal de fármacos ha recibido un gran interés debido a que se ha demostrado una mejor biodisponibilidad sistémica comparada con la vía parenteral, esto debido a que la mucosa oral tiene un suministro de sangre adecuado, una superficie flexible, lisa y de recuperación rápida después de la exposición al estrés (Jiménes et al., 1993).

La región del epitelio en donde se forma una barrera de permeabilidad para el transporte de difusores es el tercio superior (Markiewicz et al., 2007). El cual cuenta con una carga negativa a pH fisiológico debido a la presencia del ácido siálico (Collins & Dawes, 1987) y residuos de sulfato; los dos desempeñan un papel en la propiedad de la mucoadhesión que combinada con la superficie de la célula epitelioide forma una capa gelatinosa que favorece el paso del fármaco (Srivastava & Garg, 2015).

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 (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 y en varios de sus trabajos emplea la cafeína como compuesto difusor. Su primer trabajo fue publicado en el 2003, en donde establece las condiciones experimentales para evaluar el coeficiente de permeabilidad para esta molécula (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).

En el 2008, Kulkarni y colaboradores evaluaron la contribución del epitelio y el tejido conectivo sobre la permeabilidad de la cafeína en mucosa bucal de cerdo. En el 2009, evaluaron como factores biológicos y 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.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a la cafeína, en función del espesor y viabilidad de la mucosa.

Objetivos específicos

1. Establecer la reproducibilidad del método de separación de la mucosa oral porcina a través de la medición del espesor de la mucosa.
2. Determinar la viabilidad de la mucosa oral porcina y su variación en función del tiempo de separación del epitelio empleando el ensayo de MTT.
3. Analizar la dependencia del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a la cafeína con respecto a los resultados obtenidos de espesor y viabilidad de la mucosa.

7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

7.1 Tipo de estudio:

Estudio experimental

7.2 Población:

Cerdos destinados a sacrificio para consumo humano del frigorífico Ble

7.3 Muestra:

Mucosa oral porcina (carrillo) de animales que con edades que oscilaron entre 4 a 6 meses y con un peso entre 80-110kg.

7.4 Métodos y técnicas para la recolección de la información

Se realizó la toma de muestra inmediatamente después de la muerte del animal o hasta máximo una hora después de la misma, esto debido a que todas las pruebas que requieren el uso de la mucosa bucal porcina, deben ser tomadas en un lapso de tiempo no mayor a 9 h. Se realizó una incisión con bisturí o cuchillo desde la comisura de la boca en línea recta hacia arriba y atrás hasta la oreja de aproximadamente 6-8 cm para lograr visibilidad de la zona de donde se procedió a tomar la muestra (*Ver Figura 3*). Se procuró obtener fragmentos de mucosa bucal de 5x5 cm de área y 0.5 -1 cm de profundidad, evitando maltratar o desgarrar el tejido. Siempre se aseguró que las muestras estuvieran libres de maltrato, tanto hechas por el propio animal como con el bisturí y que se evidenciara una superficie lisa y sin hematomas.



Figura 3. Recolección de la muestra.

7.4.1 Conservación y transporte:

Una vez se recolectó la muestra, esta se lavó con solución salina hasta remover la mayor cantidad de sangre, posteriormente se introdujo en un frasco estéril que contenía una solución de Kreb's Bicarbonato Ringer gaseada con carbógeno a un pH de 7.4 y 4°C (Ver Figura 4), para así garantizar la viabilidad e integridad del tejido. Una vez se tomaron las muestras necesarias, estas fueron transportadas de manera inmediata al laboratorio del Instituto UIBO de la Universidad El Bosque.



Figura 4. Transporte de la muestra.

7.4.2 Separación del epitelio:

La separación se hará poniendo un fragmento de mucosa durante 1 minuto en solución salina (60°C) (ver figura 5). Transcurrido este tiempo, se retirará la mucosa de la solución con la ayuda de una pinza algodonerera, luego se pondrá sobre una caja de Petri limpia y estéril. Con la ayuda de una espátula fina, se separará el epitelio de lo que queda de tejido conectivo evitando romper la membrana.

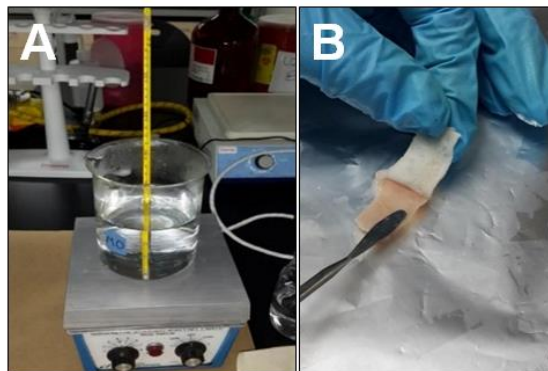


Figura 5. (A) Acondicionamiento para la separación (B) Separación manual.

7.4.3 Acondicionamiento de la mucosa oral en Celdas de Franz:

El sistema de celdas de Franz se acondicionó, garantizando un flujo de agua continuo sin burbujas que permaneció a 37 °C durante todo el estudio. Antes de llevar a cabo los experimentos de difusión, las celdas fueron atemperadas por al menos 1 hora de flujo de agua continuo para igualar su temperatura. En cada celda se dispuso un agitador magnético para asegurar que la solución en la cámara donadora se mantuviera homogénea durante todo el experimento. Una vez se tuvo atemperada las celdas y la mucosa separada, esta se dispuso sobre la celda, verificando que la lámina basal quedara sobre la cámara receptora y el epitelio hacia la cámara donadora (Ver Figura 6).

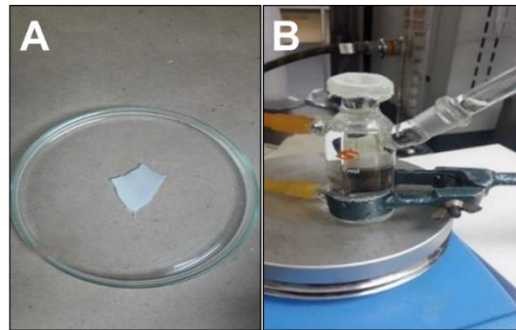


Figura 6. (A) Mucosa después de la separación y (B) disposición de mucosa en celda de FRANZ.

7.4.4 Evaluación de viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT:

La viabilidad tisular fue evaluada en mucosa fresca (inmediatamente después de separado el epitelio), a las 4, 12 y 16h de experimentación. La viabilidad de mucosas expuestas a cafeína también fue analizada. Para el ensayo, se tomó una muestra del tejido epitelial usando un punch de 4 mm de diámetro. Las muestras fueron dispuestas 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 80 RPM, por 80 minutos a 37 °C (Ver Figura 7). 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).

Como control de daño se emplearon mucosas congeladas, hervidas y expuestas a Tritón al 10% durante 3h.

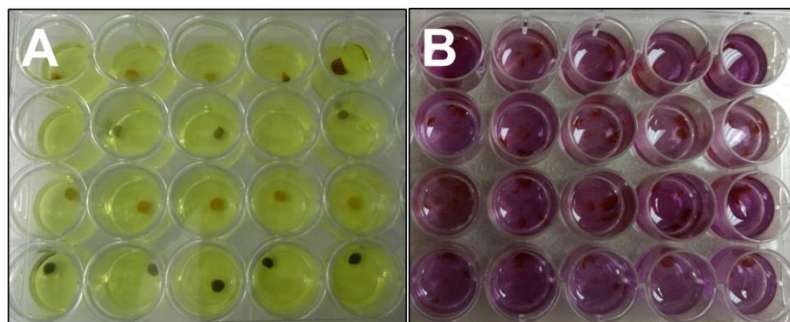


Figura 7. (A) Mucosas en MTT (B) Mucosas en Dimetilsulfoxido.

7.4.5 Análisis histomorfométrico:

El tejido epitelial de mucosa oral porcina fue fijado en formol neutro al 10% y procesado para inclusión en parafina, 10 micrómetros de espesor fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Las mediciones de espesor se realizaron usando un microscopio de luz ZEISS equipado con una cámara digital axiocam 503 mono, acoplada a un software para el procesamiento de imágenes.

El espesor fue expresado como el valor medio de la distancia entre los valles y crestas epiteliales, hasta la capa más externa de la mucosa. Las mediciones fueron realizadas con el programa ImageJ como se observa en la (Ver Figura 8 y 9).

Se realizaron 10 medidas al azar en las secciones histológicas de 15 mucosas independientes. Se calcularon las medidas de tendencia central y se reportaron a través de tablas y gráficas. El análisis fue realizado por 3 observadores de manera independiente y como complemento se realizó un estudio de precisión, adicionalmente algunas mediciones al azar fueron comparadas con las reportadas por un software que actualmente se está desarrollando en colaboración con un docente de la facultad de bioingeniería de la universidad el Bosque.

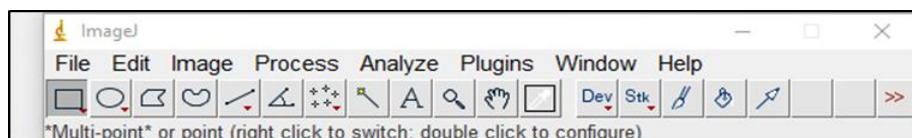


Figura 8. Programa ImageJ para las mediciones.

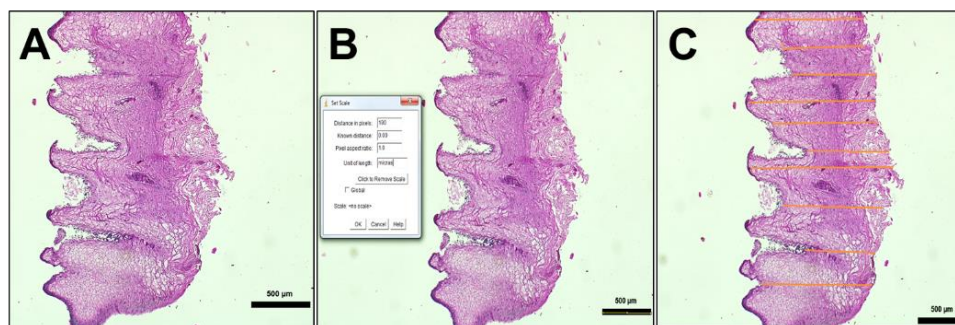


Figura 9. (A) Imagen de espesor epitelial (B) Estableciendo condiciones (C) 10 puntos diferentes incluyendo crestas y valles.

7.4.6 Evaluación del coeficiente de permeabilidad en mucosa oral frente a cafeína:

Después de separar el epitelio y acondicionarlo en las celdas de Franz se preparará una solución de cafeína 20 mg/ml en KBR atemperado a 37 °C. La cámara donadora de la celda de Franz será cargada con un mililitro de esta solución y la cámara receptora con cinco mililitros de KBR. La mucosa bucal de cerdo, se colocará con disposición del epitelio hacia la cámara donadora y la lámina basal hacia la cámara receptora. (Ver figura 10). El ensayo de difusión se realizará por 4 h tomando muestras de 500 microlitros cada 30 minutos, reponiendo en cada toma el mismo volumen para garantizar que el volumen inicial no cambie. La concentración de cafeína en la cámara donadora se analizará mediante un estudio por HPLC.

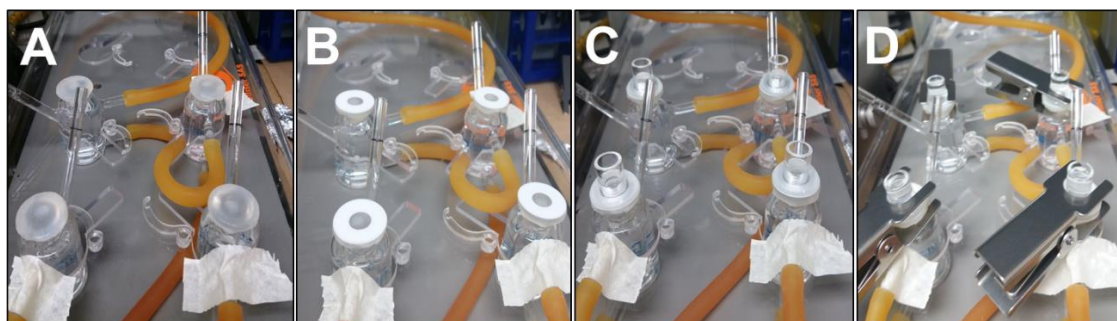


Figura 10. (A) Mucosa puesta sobre la cámara receptora, (B) Adaptación de halos para la cámara donadora, (c) Colocación de la cámara donadora, (D) adaptación de abrazaderas de celdas.

7.4.7 Metodología HPLC:

Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de cafeína y la validación de la técnica fueron realizadas por estudiantes de último semestre del programa de Bioingeniería (Ferrer Alejandra, 2017) Los análisis fueron realizados en un equipo Shimadzu Prominence-i (Ver figura 11) el cual fue programado como se muestra en la tabla 1.



Figura 11. Equipo shimadzu prominence-i lc-2030.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas del HPLC para cafeína.

Fase Móvil	
Solventes: Metanol – Agua	(45 %– 55%, v/v)
Flujo	1,000 mL/min.
Longitud de onda	254 – 273 nm
Temperatura de la columna	40°C
Presión	4500 psi
Tiempo de Corrida	5 minutos.
Fase Estacionaria	
Columna	C18 5µm
LC Columna	150 x 4,6 mm

7.5 Hipótesis de estudio

El aumento del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a cafeína, se asocia con una disminución de la viabilidad y espesor de la mucosa.

7.6 Plan de análisis de la información

En el trabajo se presentarán los resultados de la estadística descriptiva a través de tablas, incluyendo mínimos, percentil, mediana, máximo, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Todos los experimentos fueron realizados con mínimo tres réplicas en tres ensayos independientes. Cuando fue posible se aumentó el (n) y se reportó en las tablas que resumen los resultados de la estadística descriptiva.

Los resultados fueron comparados a través de la prueba de Kruskal Wallis con post hoc prueba de U Mann-Whitney con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$)

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 serán tomadas de animales de experimentación, sino de animales que han sido destinados para sacrificio y posterior consumo humano, no se hizo una solicitud de aval al comité de ética.

9. RESULTADOS

Objetivo 1. Establecer la reproducibilidad del método de separación de la mucosa oral porcina a través de la medición del espesor de la mucosa.

Para el desarrollo de este trabajo se decidió emplear epitelio sin tejido conectivo, teniendo en cuenta que en varios estudios se sugiere que, entre el epitelio y el tejido conectivo, es el epitelio el que más aporta a la función de barrera de la mucosa oral (Sudhakar et al., 2006). Teniendo en cuenta esto, el epitelio se separó por la técnica de calor y después de evaluar el espesor de 14 mucosas frescas se estableció que las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, favorecen la separación del epitelio sin una pérdida de la membrana basal (Ver Figura 12)

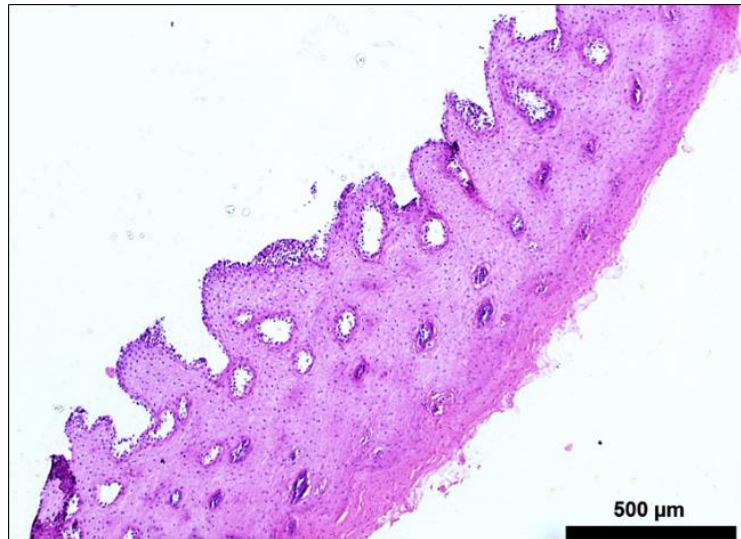


Figura 12. Mucosa Oral Porcina sin tejido conectivo procesada en el Laboratorio del Instituto UIBO.

La media del espesor de la mucosa fresca 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. En la *Figura 13* se muestra el promedio y la desviación estándar obtenida por cada observador.

Mediciones de Espesor Mucosa Fresca

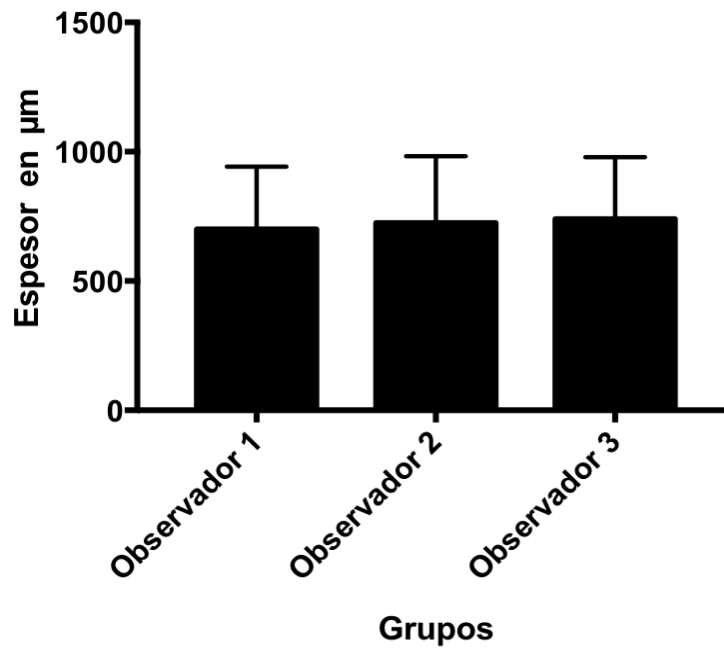


Figura 13. Análisis de espesor para mucosa oral porcina fresca. En la figura, cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar del espesor de 14 mucosas evaluadas en 10 puntos independientes por tres observadores diferentes.

En la tabla 2 se resumen los datos de la estadística descriptiva, mostrando evidencia de la variación en los resultados. A pesar de que se observaron importantes diferencias en estas mediciones los resultados obtenidos por cada observador fueron comparables.

Tabla 2. Estadística descriptiva de mediciones de espesor para mucosa fresca

Número de observadores	Observador 1	Observador 2	Observador 3
Mínimo	242	275	204
Percentil 25%	507,3	525	595,5
Mediana	684	706,5	756
Percentil 75%	856,8	874	882,5
Máximo	1410	1569	1562
Promedio	699,8	724,5	739,1
Desviación Estándar	241,9	257,8	240,1
Coeficiente de Variación	34,57%	35,59%	32,49%
Número de mediciones	140	140	140

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 homogénea y en todos los casos se conservó la integridad de la lámina basal ya que se observa continua, sin rupturas, se identifican crestas y valles, tal y como se observa en mucosas frescas procesadas inmediatamente después del sacrificio. El análisis de espesor para esta muestra mostró un valor $559,83 \pm 118,7$, el cual se encuentra dentro del rango de variación calculado previamente en este trabajo (Ver Figura 14).

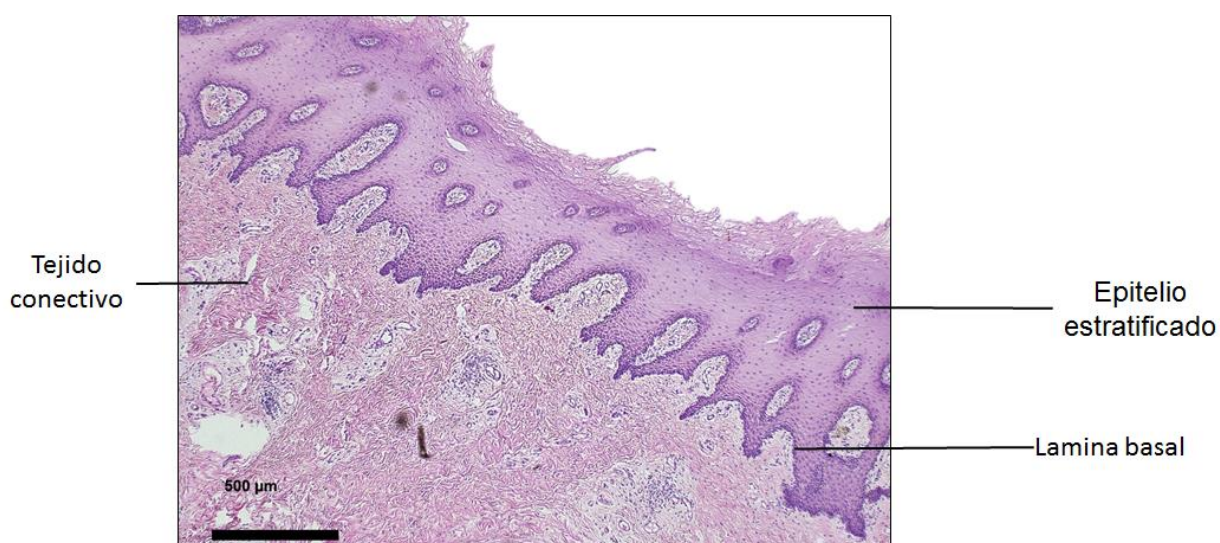


Figura 14. Mucosa Oral Porcina procesada en el Laboratorio del Instituto UIBO

Para complementar este análisis se realizó un estudio piloto que tuvo como objetivo determinar la concordancia de las mediciones realizadas por los tres observadores y la obtenida por un software que está siendo desarrollado en colaboración con el programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque. Para este piloto se eligieron 15 mucosas al azar, incluyendo mucosas frescas, tratadas y algunas obtenidas de los experimentos de viabilidad a diferentes tiempos de experimentación.

Los resultados de este análisis indicaron que hay una buena concordancia entre los valores calculados por los tres observadores y el reportado por el software, siendo el más concordante el obtenido por el observador uno (ICC= 0,75). (Ver anexo 1).

Un análisis de precisión para este observador demostró que las mediciones en dos tiempos y puntos diferentes tienen un coeficiente de correlación intra-clases de 0,877.

Objetivo 2: Determinar la viabilidad de la mucosa oral porcina y su variación en función del tiempo de separación del epitelio empleando el ensayo de MTT.

El ensayo de actividad metabólica fue realizado para muestras de mucosas frescas y mucosas después de 4, 12 y 16h de experimentación. Para validar los resultados obtenidos fue necesario incluir un control de daño y/o sin actividad metabólica aparente. Inicialmente se probaron condiciones previamente reportadas en la literatura (tratamiento con DMSO), sin embargo, por los resultados obtenidos en estos primeros experimentos, fue necesario explorar otros protocolos para causar daño a la mucosa.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la *Figura 15* y sugieren que la mayor reducción en la actividad metabólica se observa en mucosas congeladas, hervidas y tratadas con tritón al 10% por 3h ($0,0147 \pm 0,0013$).

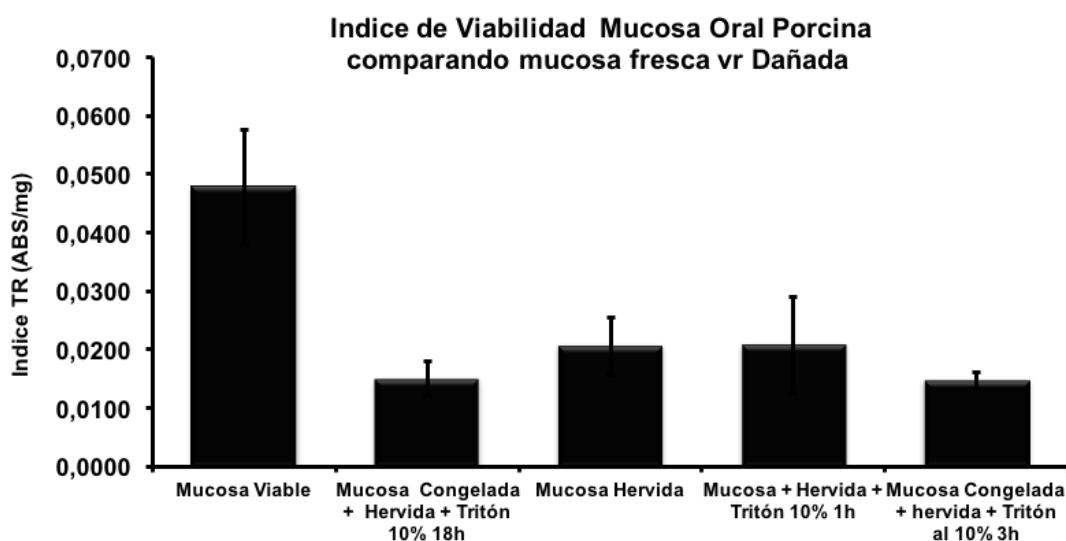


Figura 15. Índice de viabilidad para mucosa bucal porcina fresca (inmediatamente después de separar el epitelio) y mucosas dañadas por diferentes métodos (Mucosa congelada + hervida + tritón al 10% 18h), (mucosa hervida), (mucosa hervida + tritón al 10%), (mucosa congelada hervida + tritón al 10% 3h).

No se observaron diferencias importantes en el promedio del índice TR calculado para las mucosas congeladas + hervidas + expuestas a tritón al 10% a las 3h ($0,0147 \pm 0,0013$) y 18h de exposición ($0,0149 \pm 0,003$). El promedio del índice TR para mucosa hervida sola ($0,02 \pm 0,005$) y mucosa hervida con tritón 10% 1h ($0,02 \pm 0,008$), tampoco muestra diferencias. Al comparar la media del índice TR para mucosas viables con el de las mucosas dañadas se observa una disminución en estos valores. En la *Figura 16A*, se muestra la inactivación de las reductasas de tetrazolio, que lleva a que el MTT no se metabolice a cristales de formazan como se observa en la *Figura 16B*.

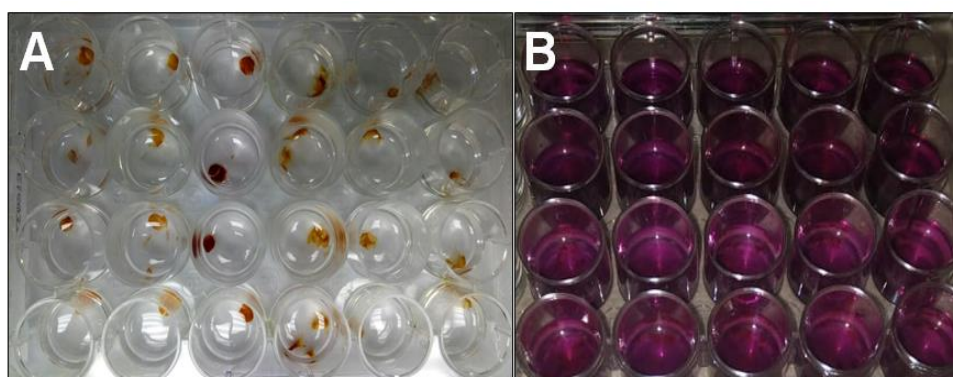


Figura 16. A). Viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT en Mucosas Dañadas, B) Mucosa bucal porcina fresca (inmediatamente después de separar el epitelio).

Los resultados obtenidos por histología, sugieren que la integridad celular se ve afectada cuando la mucosa se congela, se hierve y se expone a tritón al 10% durante 3 h, a comparación de la mucosa fresca, ya que se evidencian cambios en la estructura celular, además se observó un ensanchamiento de las células, similar a lo descrito por Nicolazzo en el año 2003, en donde usaron mucosa congelada. En los resultados de la medición del espesor en la mucosa dañada por este método se observó un aumento en el espesor, que puede ser comparable a lo descrito por (Diaz et al., 2005) (*Ver Figura 17*).

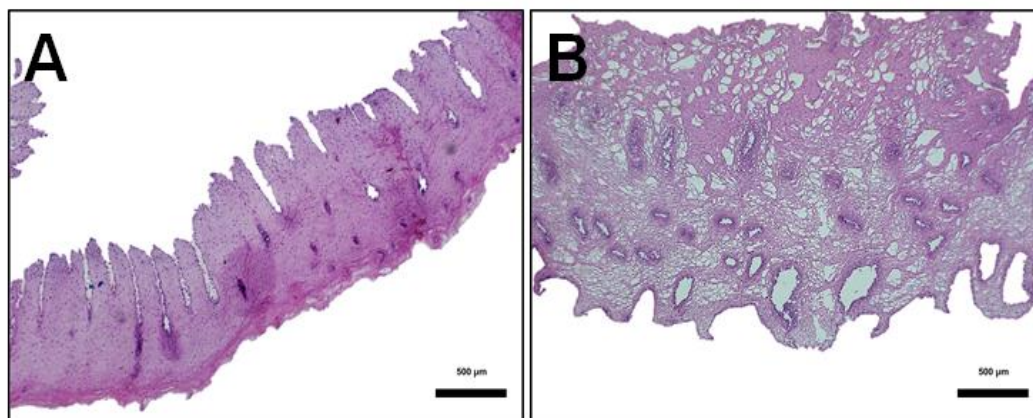


Figura 17. A) Mucosa fresca (inmediatamente después de separar el epitelio) B) Mucosa dañada (Congelada + tritón al 10% durante 3h)

Los resultados de actividad metabólica y los análisis de espesor de la membrana celular para las condiciones fresca y dañada, arrojaron datos reproducibles en los experimentos con mucosa oral porcina. Los índices de viabilidad se redujeron significativamente después de que las mucosas fueron expuestas a los diferentes tratamientos en comparación con las mucosas viables.

Ensayo de actividad metabólica a diferentes tiempos de experimentación:

En este trabajo se evaluó la influencia del tiempo experimentación sobre la viabilidad tisular, esto con el fin de identificar cual es el tiempo máximo en el que la mucosa se mantiene viable para realizar las pruebas de difusión de cafeína y las de otras moléculas en trabajos futuros.

El análisis de resultados mostró que la mediana del índice TR calculada para mucosas frescas (0,0459) muestra diferencias estadísticamente significativas cuando se compara con la calculada para mucosas dañadas (0,01627) ($p < 0,0001$) y para las mucosas a las 12 (0,0334) y 16 h de experimentación (0,02836) ($p < 0,0001$). El índice TR a las 4h (0,04512) fue comparable al observado para mucosas frescas (0,0459) ($p > 0,7132$). Sugiriendo que este tiempo es el más adecuado para realizar los estudios de permeabilidad (*Ver Figura 18*). En la tabla 3 se muestran los resultados de la estadística descriptiva para este grupo datos.

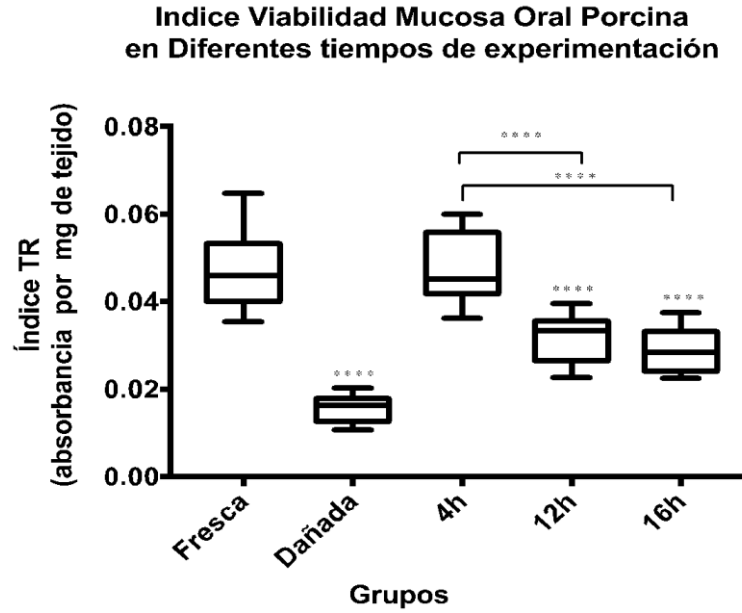


Figura 18. Comparación de Índice TR de mucosa oral porcina a diferentes tiempos de experimentación. En la figura, la línea horizontal dentro de caja representa la mediana; los límites de la caja representan el percentil 25 y 75 y los bigotes representan los máximos y mínimos obtenidos para cada grupo. **** $p < 0.0001$ (Kruskal– Wallis ANOVA con Mann-WhitneyU post test.).

TABLA 3. 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	0,007857	0,002984	0,007611	0,005332	0,004959
Coefficiente de Variación	16,65%	19,41%	15,92%	16,98%	17,12%
Número de mucosas (n)	24	13	24	20	19

Los resultados obtenidos por histología, sugieren que la integridad celular se ve afectada cuando la mucosa se expone a un tiempo mayor de 4 h, ya que se evidencia cambios en la estructura

celular y una disminución en el espesor de la mucosa a las 12 h, a diferencia de la mucosa expuesta por 16 h, donde se observó palidez citoplasmática, pérdida de núcleos y un aumento significativamente en el espesor de la mucosa (Ver figura 19).

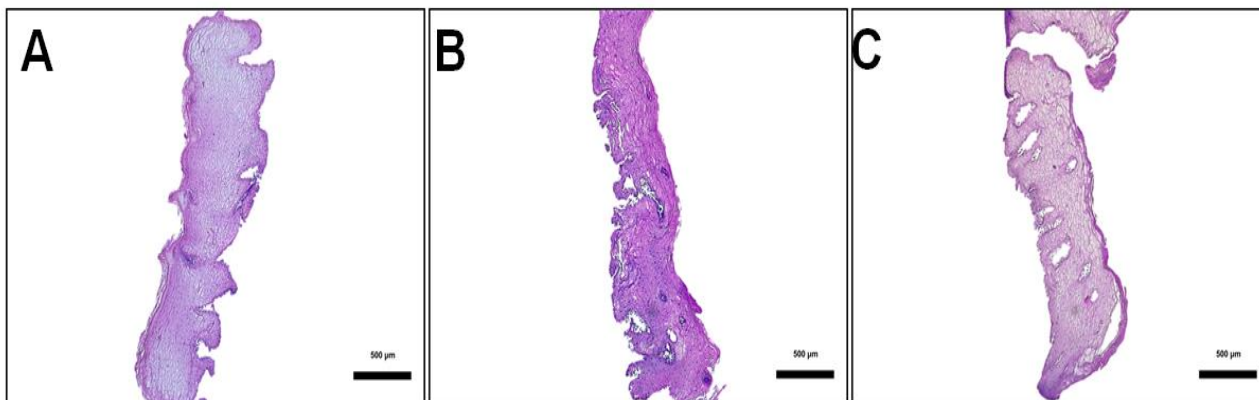


Figura 19. Influencia del tiempo de experimentación y el tratamiento con cafeína 0,5 mg/mL en mucosa oral porcina. A) Mucosa tratada con cafeína a las 4h, B) Mucosa tratada con cafeína a las 12 h, C) Mucosa tratada con cafeína a las 16 h.

Objetivo 3. Analizar la dependencia del coeficiente de permeabilidad de la mucosa oral porcina frente a la cafeína con respecto a los resultados obtenidos de espesor y viabilidad de la mucosa.

Teniendo en cuenta que la literatura reporta una amplia variación en los parámetros cinéticos calculados para cafeína (flujo en estado estacionario, constante de permeabilidad y cantidad acumulada a las 4h). Este trabajo quiso determinar cuál era la influencia del espesor y viabilidad de la mucosa sobre las variaciones observadas para el coeficiente de permeabilidad para esta molécula en la mucosa oral porcina. El flujo en estado estacionario y cantidad acumulada no fueron evaluados en este trabajo.

Para alcanzar este objetivo, primero se realizó el ensayo de difusión de cafeína durante 4h de experimentación, transcurrido este tiempo se tomaron 4 muestras, 3 fueron empleadas para realizar el ensayo de reducción de MTT y la última fue procesada para el análisis histomorfométrico. En total, se compararon los resultados de 12 mucosas acumuladas de 3 ensayos independientes realizados en cuádruplicado.

En la tabla 4, se reportan los resultados del análisis de espesor, índice TR y coeficiente de permeabilidad. En la figura 20 y la tabla 5, se muestran los resultados del índice TR para mucosas frescas, dañadas, expuestas al vehículo y a cafeína por 4h.

TABLA 4. Valores de espesor, índice TR y coeficiente de permeabilidad para mucosa con cafeína

Mucosa	Espesor μm	índice TR	Coeficiente de Permeabilidad (cm/s)
1	1047.9340	0.037323591	6.9.E-06
2	656.4090	0.03567871633	7.2.E-06
3	1048.9340	0.038836531	7.2.E-06
4	918.0290	0.04994907573	3.6.E-06
5	419.1400	0.03148694464	6.9.E-06
6	992.6320	0.02557018314	7.2.E-06
7	1040.0470	0.03940500338	7.2.E-06
8	764.2640	0.033928838	3.6.E-06
9	846.1160	0.029654259	7.0.E-06
10	692.7360	0.03813572267	6.5.E-06
11	620.1140	0.03618492	4.6.E-06
12	532.1580	0.044113096	6.2.E-06

TABLA 5. Estadística descriptiva para las evaluaciones de espesor, Índice TR y coeficiente de permeabilidad para mucosas tratadas con cafeína

	Espesor	Índice TR	Coeficiente de Permeabilidad
Mínimo	419,1	0,02555	3,61e-006
Percentil 25%	629,2	629,2	629,2
Mediana	805,2	0,03549	6,89e-006
Percentil 75%	1028	0,03738	7,16e-006
Máximo	1049	0,04642	7,23e-006
Promedio	798,2	0,03534	6,167e-006
Desviación Estándar	216,7	0,005566	1,407e-006
Coeficiente de Variación	27,15%	15,75%	22,81%
Número de mucosas (n)	12	12	12

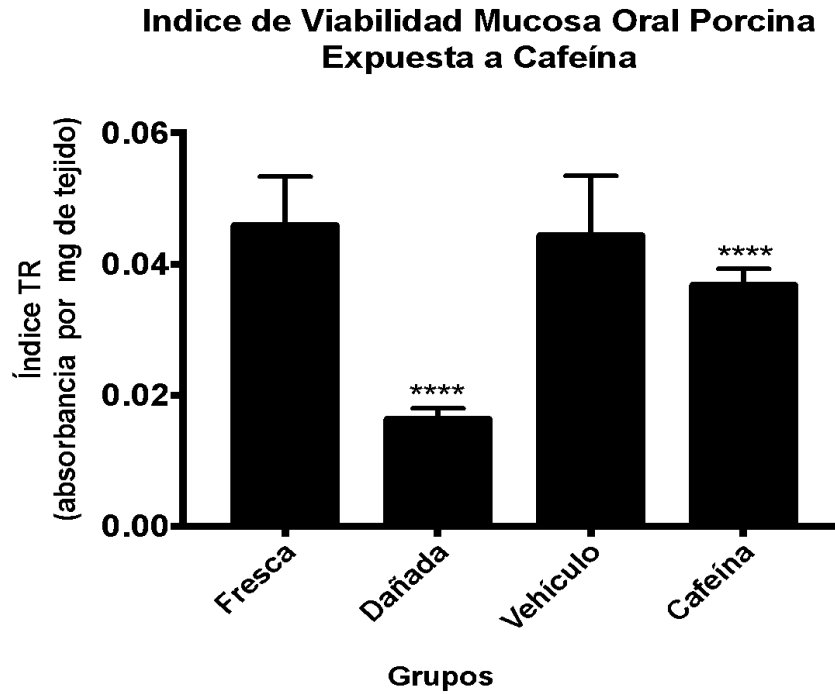


Figura 20. Índice TR de mucosa oral porcina expuesta cafeína y vehículo Na₂Co₃. En la figura, cada barra representa la mediana con un intervalo de confianza del 95%. **** $p < 0.0001$ (Kruskal – Wallis ANOVA con U Mann-Whitney U post test.)

Tabla 6. Estadística descriptiva para índice de Viabilidad de Mucosa Oral Porcina expuesta a Cafeína.

	Fresca	Dañada	Vehículo	Cafeína
Mínimo	0,03534	0,01073	0,02921	0,02557
Percentil 25%	0,04009	0,01264	0,03915	0,0321
Mediana	0,0459	0,01627	0,04437	0,03675
Percentil 75%	0,05332	0,01793	0,0535	0,03926
Máximo	0,06472	0,02022	0,05994	0,04995
Promedio	0,04718	0,01538	0,04553	0,03669
Desviación Estándar	0,007857	0,002984	0,008503	0,006428
Coefficiente de Variación	16,65%	19,41%	18,68%	17,52%
Número de mucosas (n)	24	13	29	12

Los resultados obtenidos para el coeficiente de permeabilidad muestran una variación que no puede ser explicada por las diferencias en el espesor y la viabilidad de la mucosa que se observaron en este grupo de datos. El análisis de correlación mostró que entre el espesor y el

índice TR, el espesor es el que tiene el mayor coeficiente de correlación $R = 0,47$. En la tabla 6, se resumen los resultados de la estadística descriptiva evidenciándose que el coeficiente de permeabilidad y espesor son los parámetros que más varían entre las mucosas. El coeficiente de variación calculado para el índice TR fue solo del 15,6%, el cual fue muy similar al obtenido para mucosas frescas (16,95 %).

Los resultados obtenidos sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativas en el índice TR de mucosa fresca (0,0459) y mucosa con vehículo (0,04437), a diferencia de la mucosa tratada con cafeína (0,03675) y dañada (0,01627) ya que se observa una disminución en el índice TR (Ver Tabla 6). Esto indica que el tratamiento con cafeína, puede haber contribuido a una tasa más rápida de muerte celular afectando la viabilidad celular de la mucosa tratada.

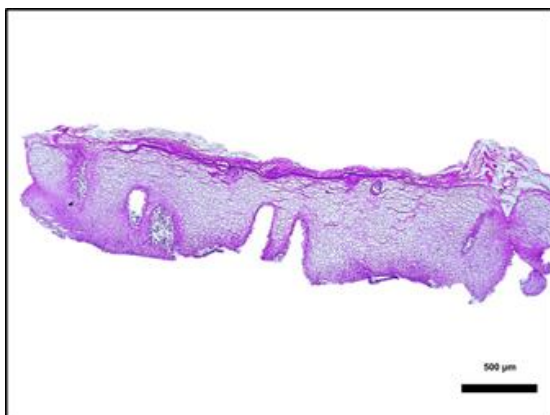


Figura 21. Mucosa oral porcina tratada con Cafeína durante un tiempo de 4 h.

Los análisis realizados por histología, muestran que la viabilidad celular se ve afectada cuando la mucosa se expone a tratamiento tanto con cafeína, ya que se evidencia palidez citoplasmática, pérdida de núcleos, espongiosis intracelular, aunque la membrana basal se conserva íntegra e intacta, a diferencia de la mucosa fresca donde se observa crestas y valles definidos, presencia de núcleos viables, membrana basal integra (ver figura 21).

En la figura 22, se observan la actividad metabólica de las células expuestas al vehículo y a la cafeína.

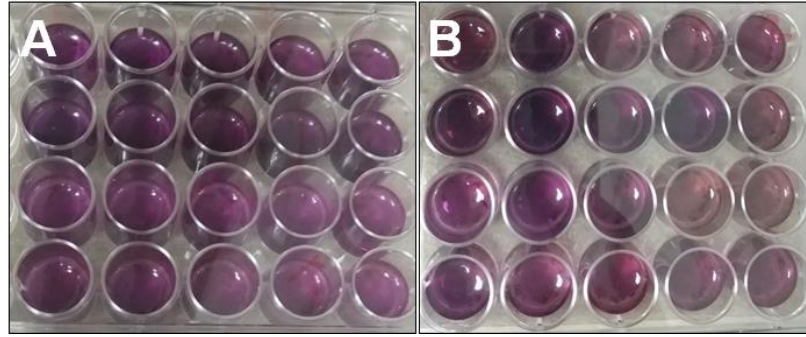


Figura 22. Viabilidad tisular por ensayo de reducción de MTT, A) mucosa bucal porcina con vehículo (Na_2CO_3) cuatro mucosas por quintuplicado, B) Mucosa bucal porcina con en tratamiento con cafeína) cuatro mucosas por quintuplicado.

10. DISCUSIÓN

La actividad metabólica y los análisis de espesor de la mucosa dañada en diferentes condiciones, arrojaron datos reproducibles en los experimentos con mucosa oral porcina. Se realizaron unas pruebas preliminares tratando la mucosa con DMSO, siguiendo protocolos descritos en la literatura (Nicolazzo et al., 2003), sin embargo, los cambios en la textura dificultaron que estas mucosas pudieran ser usadas como control de daño en los estudios de permeabilidad.

Se evidencio que las mucosas cuando eran congeladas con los diferentes tratamientos, mostraron una mayor reducción en la viabilidad. Estos resultados son comparables a lo publicado por Nicolazzo et al, 2003, en donde usaron mucosas con DMSO solo y mucosa congeladas más DMSO, mostrando una mayor disminución en la viabilidad por efecto del congelamiento (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 et al., 1999). En otro estudio publicado en el 2003, reportan un índice TR para mucosa fresca de 0,009, veces menos al observado en este trabajo, estas diferencias en los resultados pueden ser explicadas por variaciones en las condiciones experimentales empleadas en las que se realizó el ensayo de reducción de MTT (Nicolazzo et al., 2003).

Histológicamente se evidenció cambios en la morfología de la mucosa dañada por congelación, ya que se observó pérdida de núcleos, palidez citoplasmática, vacuolización y descamación de las capas superficiales, esto pudo ser generado por la cristalización del hielo en el tejido, el cual puede dañar permanentemente la matriz intracelular y la estructura de las capas celulares, estos datos son comparables a lo descrito por (Lee et al., 2002), los cuales son similares a los resultados obtenidos en este trabajo. Además de esto, se observó un incremento del espesor de la mucosa *dañada* por congelación más tritón al 10% durante 3h, el cual puede ser producido al hervir las mucosas, ya que estas pueden absorber agua y generar un ensanchamiento en las células, similar a lo descrito por (Díaz et al., 2005).

Las mucosas en tratamiento con cafeína arrojaron datos reproducibles en la actividad metabólica y los análisis de espesor, la media del índice TR de mucosa expuesta a cafeína mostró que no existe diferencias estadísticamente significativas entre mucosa fresca y mucosa tratada a las 4 h, a diferencia de los resultados en el índice TR de mucosa en tratamiento a las 12 y 16 h, en las cuales se observan diferencias estadísticamente significativas, esto se debe a que el tiempo es una variable importante ya que influye en una reducción notable de la actividad metabólica celular. Estos datos son comparables a lo descrito por (Imbert & Cullander, 1999), donde hicieron experimentos con KBR y PBS, donde demostraron que la actividad metabólica se ve reducida por la influencia del tiempo después 4 h (Imbert et al., 1999)

Histológicamente se observa una relación directamente proporcional entre la pérdida de viabilidad y los cambios histomorfométricos de la mucosa oral tratada a las 12 y 16 h, ya que en el tejido expuesto a tratamiento, se presentó una disminución en el tamaño de las células, palidez citoplasmática, vacuolización, descamación de las capas superficiales lo que generó una disminución del espesor a las 12 h a diferencia del tiempo de 16 h ya que en este se observó edema intracelular, que pudo ser producto de la entrada de líquido al interior de la célula, lo que generó un ensanchamiento en el tamaño de las células, observándose en estos dos tiempos una variación importante en el espesor.

La idea de comparar las mediciones de espesor, realizadas por tres observadores con la calculada por un software, estuvo soportada por la necesidad de facilitar y automatizar este tipo de mediciones en busca de valores más exactos y que permitan el análisis de toda el área de la mucosa que se encuentra en inclusión de parafina.

Se evidencio que los resultados de coeficiente de permeabilidad no tenían relación con las variables de espesor y viabilidad tisular, ya que con el grupo de datos que se analizó se observa que no hay una correlación entre los valores del índice TR, el espesor de las mucosas y el coeficiente de permeabilidad calculados para cafeína.

La media del coeficiente de permeabilidad para cafeína calculada en este trabajo fue de $6,16 \pm 1,40$ cm/s, este valor fue comparable al obtenido por Kulkarni et al 2009 (6.03 ± 0.36 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 $(6.13 \pm 0.75 \text{ cm/s})$ (Kulkarni et al. 2010).

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. 2010).

11. CONCLUSIONES

- 1.** El método de separación por calor establecido en el laboratorio no afecta las estructuras que conforman el epitelio de la mucosa oral porcina. Esta metodología puede ser usada de manera rutinaria en estudios de permeabilidad de fármacos.
- 2.** Los valores de espesor calculados para el epitelio de la mucosa oral porcina, son comparables a los reportados por otros trabajos publicados en la literatura científica y aunque se presentan diferencias en las mediciones realizadas en este estudio, estas diferencias pueden ser propias del tejido y no un efecto del método de separación o de cuantificación.
- 3.** Las condiciones experimentales empleadas en este trabajo garantizan la viabilidad de la mucosa hasta por 4h. A las 12h y 16h las mucosas aún se conservan viables, sin embargo, esta viabilidad no es comparable a la observada a las 4h y a la de mucosas frescas.
- 4.** Se demuestra que no hay una clara correlación entre los valores del coeficiente de permeabilidad calculados para cafeína, el índice TR y el espesor de las mucosas. Se sugiere tener un mayor número de datos con diferencias en el espesor

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baena Y. Estudio Físicoquímico De La Liberación Del Diclofenac A Partir De Complejos Polielectrolito- Fármaco. Universidad Nacional de Colombia; 2011.
2. Bhati R, Nagrajan RK. A detailed review on oral mucosal drug delivery system. *Int J Pharm* 2012;3(03):659–81.
3. Bind A, Gnanarajan G, Kothiyal P. A Review: Sublingual Route For Systemic Drug Delivery. *Int J Drug Res Technol*. 2013;3(2):31–6.
4. Bobade NN, Atram SC, Wankhade VP, Pande SD, Tapar KK. Review Article A Review on Buccal Drug Delivery System. 2013;3(1):35–40.
5. Borbás E, Sinkó B, Tsinman O, Tsinman K, Kiserdei É, Démuth B, et al. Investigation and mathematical description of the real driving force of passive transport of drug molecules from supersaturated solutions. *Mol Pharm*. 2016;13(11):3816–26.
6. Campisi G, Paderni C, Saccone R, Fede O, Wolff A, Giannola L. Human Buccal Mucosa as an Innovative Site of Drug Delivery. *Curr Pharm Des*. 2010;16(6):641–52.
7. Castro P, Madureira R, Sarmento B, Pintado M. Tissue-based in vitro and ex vivo models for buccal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. 2016. 189-202 p.
8. Cl H. [Application Note] Analysis of Local Anest Hetic S Using Xbridge™ C 18 [Application Note]. Alliance Sci What's Possible are trade- Marks Waters Corp. 2007;1:1–2.
9. Collins LMC, Dawes C. The Surface Area of the Adult Human Mouth and Thickness of the Salivary Film Covering the Teeth and Oral Mucosa. *J Dent Res*. 1987;66(8):1300–2.
10. de Vries ME, Boddé HE, Verhoef JC, Ponc M, Craane WIHM, Junginger HE. Localization of the permeability barrier inside porcine buccal mucosa: a combined in vitro study of drug permeability, electrical resistance and tissue morphology. *Int J Pharm*. 1991;76(1–2):25–35.
11. Del Consuelo ID, Pizzolato GP, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J Pharm Sci*. 2005;94(12):2777–88.
12. Giannola L, De Caro V, Giandalia G, Siragusa M, Campisi G, Wolff A. Current status in buccal drug delivery. *Pharm Technol Eur*. 2008;20(5):32–9.
13. Gomis Yagües V. Tema 4. Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución. 2008;0–31.

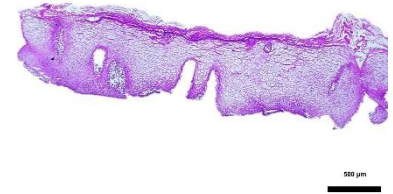
14. Hooda R, Tripathi M, Kapoor K. A Review on Oral Mucosal Drug Delivery System. *Pharma Innov.* 2012;1(1):14–21.
15. Imbert D, Cullander C. Assessment of cornea viability by confocal laser scanning microscopy and MTT assay. *Cornea.* 1997;16(6):666–74.
16. Imbert D, Cullander C. Buccal mucosa in vitro experiments. I. Confocal imaging of vital staining and MTT assays for the determination of tissue viability. *J Control Release.* 1999;58(1):39–50.
17. Jiménez-Castellanos MR, Zia H, Rhodes C. Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 1993;19:143–94.
18. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather SI, Li X, Jasti B. Porcine Buccal Mucosa as an In Vitro Model: Relative Contribution of Epithelium and Connective Tissue as Permeability Barriers. *J Pharm Sci.* 2009;98(2):471–83.
19. Kulkarni UD, Mahalingam R, Li X, Pather I, Jasti B. Effect of Experimental Temperature on the Permeation of Model Diffusants Across Porcine Buccal Mucosa. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2011;12(2):579–86.
20. Lozano RP, García YA, Tafalla DB, Farré Albaladejo M. Cafeína: Un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones.* 2007;19(3):225–38.
21. Markiewicz MR, Margarone JE, Barbagli G, Scannapieco FA. Oral Mucosa Harvest: An Overview of Anatomic and Biologic Considerations. *EAU-EBU Updat Ser.* 2007;5(5):179–87.
22. Méndez a, Carmen M Del. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. 2008-
23. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65:55–63.
24. Ng S-F, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11(3):1432–41.
25. Nicolazzo J. FB. In Vivo and In Vitro Models for Assessing Drug Absorption Across the Buccal Mucosa. In: *Drug Absorption Studies Biotechnology: Pharmaceutical Aspects.* 2008. p. 89–111.
26. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The Effect of Various In Vitro Conditions on the Permeability Characteristics of the Buccal Mucosa. *J Pharm Sci.* 2003;92(12):2399–410.
27. Rathbone MJ, Tucker IG. Mechanisms, barriers and pathways of oral mucosal drug

- permeation. *Adv Drug Deliv Rev.* 1993;12(1–2):41–60.
28. Roblegg E, Fröhlich E, Meindl C, Teubl B, Zaversky M, Zimmer A. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology.* 2012;6(4):399–413.
 29. Sanabria LM, Martínez JA, Baena Y. Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina Resumen Validation of an analytical HPLC-DAD methodology Introducción. *Rev Colomb Ciencias Químico Farm.* 2017;46(2):202–19.
 30. Sankar V, Hearnden V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr A, et al. Local drug delivery for oral mucosal diseases: Challenges and opportunities. *Oral Dis.* 2011;17(SUPPL. 1):73–84.
 31. Sattar M, Sayed OM, Lane ME. Oral transmucosal drug delivery - Current status and future prospects. *Int J Pharm.* 2014;471(1–2):498–506.
 32. Shah V, Bellantone RA, Taft DR. Evaluating the Potential for Delivery of Irinotecan via the Buccal Route: Physicochemical Characterization and In Vitro Permeation Assessment Across Porcine Buccal Mucosa. *AAPS PharmSciTech* 2017;18(3):867–74.
 33. Shinkar DM, Dhake AS, Setty CM. Drug Delivery from the Oral Cavity: A Focus on Mucoadhesive Buccal Drug Delivery Systems. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012;66(5):466–500.
 34. Shojaei AH, Chang RK, Guo X, Burnside BA, Couch RA. Systemic Drug Delivery via the Buccal Mucosal Route. *Pharm Technol.* 2001;(June):70–81.
 35. Squier C, Kremer M. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;29:7–15.
 36. Squier CA. The Permeability of Oral Mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):13–32.
 37. Srivastava N, Garg MM. Current Status of Buccal Drug Delivery System : a Review. *J Drug Deliv Ther.* 2015;5(1):34–40.
 38. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release.* 2006;114(1):15–40.
 39. Summary I. In Summary: Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations. *Nutr Today [Internet].* 37(1):26–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057583>
 40. Thakur RA, Michniak BB, Meidan VM. Transdermal and buccal delivery of methylxanthines through human tissue in vitro. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007;33(5):513–21.

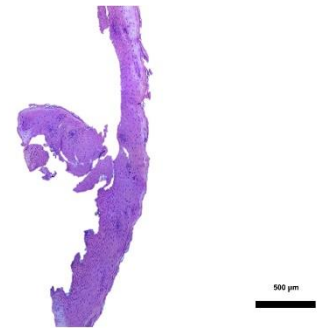
13. ANEXOS

ANEXO 1

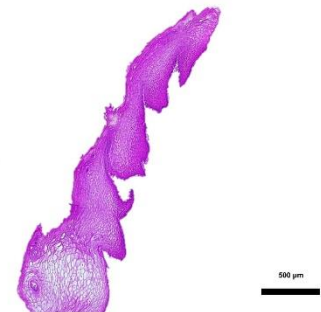
MUCOSA 90	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	734.028	735.013	686.177
2	782.360	834.750	777.508
3	823.100	885.444	746.265
4	857.815	721.347	730.356
5	805.743	695.077	679.084
6	659.804	806.810	685.287
7	298.631	703.549	728.739
8	672.160	814.668	793.805
9	761.557	1.084.145	778.154
10	767.746	891.949	688.702
PROMEDIO	716.294	817.275	729.408



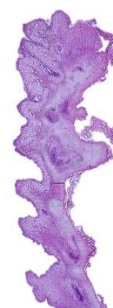
MUCOSA 105	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	486.669	444.762	271.132
2	425.287	406.699	263.074
3	1.188.601	384.619	247.904
4	275.380	608.658	263.315
5	187.629	1.090.836	310.972
6	243.155	1.130.900	389.276
7	264.459	249.046	372.277
8	378.488	270.808	391.514
9	411.806	265.764	460.408
10	274.306	254.606	405.896
PROMEDIO	413.578	539.121	337.577



MUCOSA 106	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	823.783	751.967	270.232
2	741.608	610.608	357.293
3	494.216	543.766	400.263
4	582.678	583.705	365.512
5	441.412	387.662	368.616
6	547.905	368.285	473.300
7	300.014	472.031	621.518
8	475.277	424.649	769.442
9	413.184	325.908	787.286
10	434.351	122.762	773.381



PROMEDIO	525.443	459.134	518.684
MUCOSA 108	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	576.431	584.170	667.500
2	274.328	472.847	915.749
3	532.384	540.385	874.333
4	458.544	917.955	451.566
5	247.138	671.029	595.165
6	899.413	975.997	589.670
7	500.108	954.008	616.302
8	642.961	956.173	548.757
9	649.640	976.195	460.724
10	979.167	952.744	528.203
PROMEDIO	576.011	800.150	624.797



500 µm

MUCOSA 109	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	674.049	663.930	614.936
2	459.397	479.481	395.456
3	434.250	607.996	630.811
4	375.064	514.182	362.681
5	618.056	454.874	536.231
6	531.295	691.007	448.673
7	667.570	576.431	392.841
8	566.015	534.733	543.691
9	705.075	677.163	442.739
10	528.063	548.611	413.070
PROMEDIO	555.883	574.841	478.113



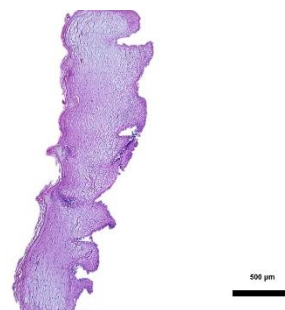
500 µm

MUCOSA 111	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	612.776	642.821	393.669
2	525.454	576.389	405.180
3	437.996	452.043	431.538
4	482.639	437.514	381.455
5	427.210	372.111	305.699
6	491.660	385.557	431.632
7	382.953	246.748	352.708
8	462.575	379.045	468.547
9	397.308	408.440	268.873
10	517.536	414.025	426.352
PROMEDIO	473.811	431.469	386.565



500 µm

MUCOSA 112	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	687.535	662.576	569.426
2	514.463	620.518	639.078
3	623.426	698.754	582.239
4	391.915	726.101	593.499
5	660.307	746.536	379.065
6	507.527	663.276	621.714
7	566.068	787.789	609.620
8	791.248	680.635	691.925
9	743.088	571.231	631.992
10	808.879	473.306	701.193
PROMEDIO	629.446	663.072	601.975



MUCOSA 158	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	597.475	587.175	641.810
2	833.398	6.944	741.012
3	878.808	882.771	730.133
4	911.391	722.431	687.520
5	796.684	898.259	936.863
6	552.083	900.725	745.938
7	992.509	753.288	869.807
8	262.996	722.523	812.917
9	816.083	795.685	861.818
10	777.809	439.822	797.164
PROMEDIO			



MUCOSA 159	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	1.563.491	529.932	1.453.125
2	1.696.492	768.609	1.619.825
3	1.038.073	861.853	1.001.084
4	973.616	975.046	1.114.632
5	1.108.863	1.086.223	851.638
6	872.219	854.117	1.049.308
7	842.864	852.252	972.899
8	1.101.242	1.128.899	717.541
9	960.149	996.600	471.462
10	1.006.543	994.445	592.973



PROMEDIO	413.578	539.121	337.577
-----------------	---------	---------	---------

MUCOSA 160	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	816.762	1.111.117	495.476
2	938.528	1.076.478	664.466
3	531.885	1.255.207	900.093
4	932.426	870.060	888.689
5	584.366	986.851	885.800
6	899.312	893.333	714.472
7	615.994	709.371	906.265
8	1.102.467	938.586	1.208.086
9	1.104.712	939.818	1.084.847
10	1.087.743	951.319	1.284.306
PROMEDIO	861.420	973.214	903.250



MUCOSA 161	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	746.625	788.814	862.714
2	570.840	670.364	619.617
3	638.898	659.731	675.479
4	303.060	719.287	619.420
5	678.160	651.983	672.016
6	824.644	482.951	592.927
7	478.361	683.948	610.798
8	700.667	703.294	663.506
9	705.502	694.583	604.728
10	692.445	781.751	520.051
PROMEDIO	633.920	683.671	644.126



MUCOSA 162	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	818.716	960.658	778.136
2	339.373	803.495	720.879
3	710.814	708.878	603.560
4	664.865	341.074	772.959
5	688.043	902.517	673.407
6	789.509	719.094	541.692
7	348.833	757.947	709.443
8	726.392	733.658	721.725
9	526.245	621.693	610.887



10	859.072	843.264	671.855
PROMEDIO	647.186	739.228	680.454

MUCOSA 164	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	872.882	704.998	639.587
2	686.570	642.961	635.438
3	529.158	653.894	442.341
4	493.129	490.125	388.152
5	340.295	457.293	414.709
6	441.027	465.563	364.583
7	316.658	483.438	458.363
8	500.771	733.527	709.883
9	427.986	766.638	510.656
10	642.173	670.786	420.587
PROMEDIO	525.065	606.922	498.430



MUCOSA 165	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	953.440	691.835	755.280
2	490.186	713.362	672.198
3	755.781	712.990	828.714
4	695.693	787.215	853.928
5	748.592	754.647	746.102
6	295.323	810.598	770.992
7	873.524	644.759	726.278
8	948.552	806.161	824.580
9	402.912	968.576	708.276
10	872.385	986.502	892.800
PROMEDIO	703.639	787.665	777.915



MUCOSA 166	Observador 1	Observador 2	Observador 3
1	864.332	691.835	808.457
2	542.256	713.362	645.903
3	689.584	712.990	683.367
4	796.722	787.215	814.123
5	700.882	754.647	861.913
6	465.550	810.598	752.306
7	769.276	644.759	344.716
8	491.402	806.161	239.570



9	778.041	968.576	723.019
10	962.106	986.502	697.529
PROMEDIO	706.015	795.635	657.090