TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

Título: Desarrollo Galénico y Biofarmacéutico de un Medicamento de Liberación Controlada: MICROESFERAS DE DEXAMETASONA INTRAVÍTREA EN EL TRATAMIENTO DE LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD

Autor: Mª de la Cruz Rivas García

Tutor: Manuel Guzmán Navarro

Curso: 2015-2016

Universidad de Alcalá
COMISIÓN DOCENTE

FACULTAD DE FARMACIA
Campus universitario
Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Telf. (+34) 918 854 680
FAX (+34) 918 854 680
E-mail: decanato.farmacia@uah.es
http:/www.uah.es/farmacia

ANEXO 9

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

(Segunda Página de Memoria del Trabajo Fin de Grado)

D/Dª **Manuel Guzmán Navarro**
Profesor del Departamento de **Ciencias Biomédicas**
como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de
D/Dª **Mª Cruz Rivas García**

Titulado:

Desarrollo Galénico y Biofarmacéutico de un Medicamento de Liberación Controlada:
Microesferas de dexametasona intravítrea en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el/la alumno/a **Mª Cruz Rivas García**, bajo mi dirección, alcanzando los objetivos de aprendizaje y las competencias transversales previstas en la guía docente de la asignatura (artículo 10 de la presente Normativa).

Con esta fecha considero APTO el mencionado trabajo y autorizo a su presentación y defensa pública.

Alcalá de Henares ...**6**. de ...**julio**.... de **2016**....

Fdo.: Manuel Guzmán Navarro

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Índice

	Página
Resumen/Abstract	1
I. Introducción	3
1.1 Fisiología y anatomía ocular	3
1.2 Patologías oculares: Degeneración macular asociada a la edad	4
1.3 Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oculares	5
1.4 Tratamientos	6
1.5 Micropartículas. Alternativa a los implantes intraoculares	8
1.5.1 Preparación de sistemas farmacéuticos en microesferas	
1.5.2 Estrategias tecnológicas para la optimización de la formulación	
II. Objetivos	13
III. Materiales y métodos	14
3.1 Fuentes bibliográficas	14
3.2 Materias primas y equipos	14
3.3 Métodos	16
3.3.1 Preparación de las microesferas	
3.3.2 Determinación del tamaño de partícula	
3.3.3 Estudio morfológico de las microesferas	
3.3.4 Análisis térmico	
IV. Resultados y discusión	19
4.1 Rendimiento del método de obtención de las microesferas	19
4.2 Caracterización del sistema farmacéutico en microesferas	20
4.2.1 Distribución del tamaño de las microesferas	
4.2.2 Estudio morfológico	
4.2.3 Análisis térmico	
V. Conclusiones	24
VI. Bibliografía	25

RESUMEN

Las terapias que tratan enfermedades crónicas que afectan al segmento posterior del ojo necesitan niveles constantes de fármaco durante periodos de tiempo prolongados. Para alcanzar concentraciones terapéuticas se requiere la administración de frecuentes inyecciones intravítreas, lo que puede producir efectos adversos importantes. Concentraciones sostenidas de fármaco se pueden obtener con formas de liberación controlada como son las micropartículas (MPs). Al mismo tiempo se consigue minimizar el efecto invasivo en la cavidad vítrea, debido al tamaño de las micropartículas y al pequeño calibre de las agujas que se necesitan para su administración.

Este trabajo ha consistido en la revisión bibliográfica de una forma de administración de dexametasona (DXM) en microesferas (MSs), que se ha acompañado de un desarrollo experimental consistente en su elaboración a partir de un copolímero biodegradable de los ácidos láctico y glicólico (PLGA) mediante de la técnica de evaporación del disolvente.

Las MSs elaboradas resultaron ser esféricas, con superficie lisa y con un tamaño comprendido entre 2-40µm, en las que la DXM se encuentra encapsulada en forma parcialmente amorfa como se deduce de los estudios de microscopía electrónica, de dispersión de luz y de calorimetría.

Estas MSs desarrolladas pueden ser una alternativa a la formulación que se utiliza actualmente en terapéutica, en forma de implante de DXM (Ozurdex) y para cuya administración se requieren agujas con un calibre mucho mayor.

ABSTRACT

Therapies to treat those chronic diseases that affect the posterior segment of the eye need constant drug concentrations during long periods. To achieve therapeutic concentrations we need to administer frequent intravitreal injections, which supposes important adverse effects. Sustained drug concentrations can be obtained with controlled release forms as microparticles (MPs). At the same time, it becomes

possible to minimize the invasive effect in the intravitreal cavity due to the size of the microparticles and the small needle gauge that are need for its administration.

The aim of this work has been to do a literature review about dexamethasone in a drug dosage form as microspheres (MSs), followed by an experimental work focused to the development of this platform prepared with the biodegradable polylactic-poliglycolic acid copolymer (PLGA) by an emulsion solvent-evaporation technique.

The elaborated MSs were spherical, with smooth surface and a size between 2-40 µm where DXM is encapsulated inside mainly in amorphous form, as it follows in the studies of electronic microscopy, light dispersion and calorimetry.

These developed MSs could be an alternative to the current market formulation used in DXM therapy (Ozurdex), whose administration required the use of large gauge needles.

PALABRAS CLAVE

Microesferas, dexametasona, vía ocular, administración intravítrea, liberación controlada.

KEY WORDS

Microspheres, dexamethasone, via ocular, intravitreal administration, controlled release.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo galénico y biofarmacéutico tiene entre sus objetivos encontrar para cada principio activo la forma de dosificación o presentación medicamentosa que mejor se adapte al tratamiento de una enfermedad dada. Ello incluye la selección de los componentes de la formulación, de la forma farmacéutica y del proceso tecnológico de elaboración para que de esta manera se transforme el fármaco en un medicamento estable, seguro y eficaz.

1.1 Fisiología y anatomía ocular

El globo ocular posee una anatomía bien definida y está compuesto por dos zonas diferenciadas: el segmento posterior y el segmento anterior.

Lo componen tres capas:

- Capa externa: formada por la esclerótica y la córnea. Posee función protectora.
- Capa media o túnica vascular: compuesta por la coroides, cuerpo ciliar e iris. Posee función nutritiva y vascular.
- Capa interna: se encuentra la retina que contiene células neuronales como conos, bastones y ganglionares entre otras; células pigmentadas y de sostén. En su área posterior presenta una pequeña mancha amarillenta llamada mácula, en cuyo centro se encuentra la fóvea central donde hay mayor agudeza visual. El nervio óptico transmite la información visual hasta el cerebro mediante impulsos eléctricos.

En la mácula se encuentra una elevada concentración de fotorreceptores (120.000 conos por célula/mm^2) que son responsables de la visión en color. Está poco vascularizada y tiene alto requerimiento metabólico. Posee ese característico color amarillento por contener un pigmento xantófilo el cual la protege de procesos de estrés oxidativo [1].

Una mácula es normal cuando no presenta elementos ajenos como pigmentos anormales, neovascularización o hemorragias.

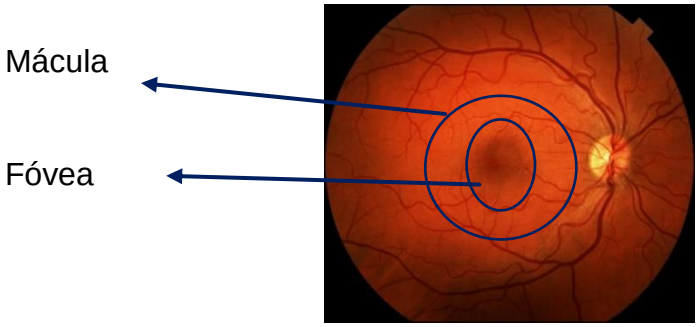


Figura 1: *visión de una mácula fisiológicamente normal.*

1.2 Patologías oculares. Degeneración Macular Asociada a la Edad

Las patologías oculares del segmento posterior del ojo afectan a estructuras internas como son: la retina, el nervio óptico, la mácula y humor vítreo. Se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión en un gran número de pacientes. Es por tanto primordial instaurar de inmediato un tratamiento y mantener concentraciones eficaces en el lugar de acción durante el mayor tiempo posible [2].

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la principal causa de pérdida visual central severa e irreversible en individuos mayores de 55 años en el mundo Occidental y ello limita sus actividades diarias rutinarias [3]. Su incidencia es 4 veces mayor en pacientes que superan los 75 años.

La DMAE es producida por una lesión en la mácula, en donde tiene lugar una pequeña mancha que lesiona el centro del campo visual. El proceso de DMAE está relacionado con el grado de alteración pigmentaria y con la presencia de drusas [4].

Sus síntomas principales son: agudeza visual central disminuida, discromatopsia (alteración de la percepción de los colores), escotoma central (un punto ciego en el campo visual) y metamorfopsia (distorsión de la imagen).

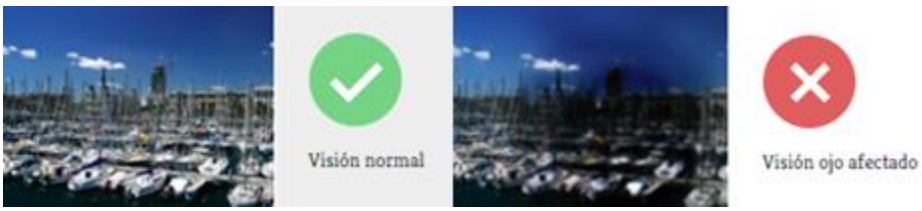


Figura 2: *Visión fisiológicamente normal de un paisaje y visión afectada por la DMAE*

Se trata de una enfermedad multifactorial; algunos de estos factores no son modificables como la edad, sexo, raza, hipertensión, hormonales, antecedentes familiares de enfermedad y otros son modificables como el tabaquismo, obesidad, dieta rica en grasas animales o luz solar [5]. Entre estos factores de riesgo, el más importante es la edad, numerosas investigaciones demuestran la relación entre DMAE y población senil [6].

Otras lesiones posibles de producirse en el segmento posterior del ojo son, bien inflamatorias como la uveítis o bien degenerativas como el glaucoma (producido por el deterioro del nervio óptico y aumento de la presión intraocular) o la retinopatía diabética (producida por un deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina del fondo de ojo). [7]

En la DMAE se pueden diferenciar dos tipos [8].

- La forma seca, no neovascular o atrófica: es la forma más común de DMAE y tiene distintas fases. Produce la aparición de drusas (depósitos amarillos de desechos metabólicos de la retina) y zonas de atrofia como consecuencia de la desaparición progresiva de epitelio pigmentario retiniano. El paciente nota su visión borrosa y la necesidad de aumento de luz para leer. Se produce una pérdida de agudeza visual progresiva, que puede conducir a la pérdida de la visión central en ambos ojos.
- La forma húmeda, neovascular o exudativa: ocurre con menor frecuencia pero es más agresiva y con peor pronóstico. Se produce una grave y rápida disminución de la agudeza visual debido al crecimiento de vasos sanguíneos (neovasos) anormales y frágiles debajo de la mácula, que hacen que se acumule sangre y dañe la mácula. No es reversible.

1.3 Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oculares

Es importante que en la farmacoterapia se alcancen concentraciones eficaces del principio activo en el lugar de acción, para ello el fármaco debe superar las barreras biológicas previas a la diana farmacológica. En el segmento anterior del ojo se presenta la barrera hemato-acuosa que la componen los capilares del epitelio de la

retina, el iris, el epitelio ciliar y el pigmentario retinal. En el segmento posterior la hematorretiniana (interna y externa) compuesta principalmente por células endoteliales. Ésto origina que resulte complicado obtener concentraciones eficaces con las administraciones tópica o sistémica [9].

Las vías de administración más comunes son la tópica, que se realiza en la córnea; y la parenteral, que incluye periocular e intravítrea [10] [11].

Pero las enfermedades a las que se refiere este trabajo afectan al segmento posterior del ojo y son devastadoras, por lo que se pretende una instauración rápida del tratamiento y que las concentraciones terapéuticas se mantengan el mayor tiempo posible. Se recurre a las inyecciones perioculares o intravítreas in situ. La administración intraocular de fármacos es la vía más utilizada. Se recurre a este tipo de administración cuando se han agotado otras vías menos agresivas o en aquellos casos en los que la severidad de la patología lo exige [12].

La inyección intravítrea consiste en el depósito directo de la formulación en la cavidad vítrea, por tanto las concentraciones de principio activo que se alcanzan en el lugar de acción son superiores a las que se logran empleando otras vías de administración y se disminuyen los efectos secundarios derivados de la administración sistémica o de la tópica. Se emplea en patologías vitreorretinianas que son la causa más frecuente de ceguera en los países desarrollados [13] [14].

Pero esta vía también lleva asociados efectos secundarios que pueden dar lugar a desprendimiento de retina, cataratas, hemorragia vítrea y atrofia óptica, entre otras. El número de inyecciones es directamente proporcional al riesgo de aparición de estos efectos adversos, por lo que deben disminuirse. Para dar respuesta a este objetivo, surge la necesidad de desarrollar sistemas de liberación controlada [15].

1.4 Tratamientos

La DMAE seca carece de un tratamiento eficaz, tan sólo puede frenarse su evolución para evitar la pérdida completa de la visión. Se debe intentar evitar los factores de riesgo y adoptar hábitos de vida saludables. La administración de complejos antioxidantes consigue ralentizar la enfermedad y evitar que se convierta en DMAE húmeda [16].

La DMAE húmeda se puede tratar con fármacos intravítreos antiangiogénicos que inhiben el crecimiento de los vasos sanguíneos mediante la inhibición del factor de crecimiento vascular (VEGF). Son: ranibizumab, bevacizumab y pegaptanib sódico. Son administrados mediante inyecciones de forma periódica, puesto que su vida media es corta [16].

También se emplea terapia fotodinámica (TFD) con verteporfina. Esta alternativa sólo debe considerarse ante la imposibilidad de la aplicación del tratamiento intravítreo antiangiogénico. Actualmente se utiliza en combinación con inhibidores de la angiogénesis como el bevacizumab, que es un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular, inhibiendo la angiogénesis y la vasculogénesis. Ésto produce una disminución de la neovascularización coroidea. Sería ideal además que estas terapias combinadas evitasen la muerte neuronal, incluyendo agentes neuroprotectores o antiinflamatorios [17].

En el tratamiento de esta patología ocular también se utilizan los corticoides. Poseen actividad vasoconstrictora y antiproliferativa inhibiendo factores de crecimiento angiogénico y la neovascularización, lo que resulta interesante para estabilizar la barrera hematorretiniana y para proteger los receptores de la retina.

Los corticoides son fármacos antiinflamatorios eficaces para el tratamiento de patologías agudas y crónicas del segmento posterior del ojo como la uveítis [18]. En concreto, la dexametasona es un corticoide fluorado de larga duración de acción que posee elevada actividad antiinflamatoria e inmunosupresora y una baja potencia mineralcorticoide. Es el fármaco más empleado en enfermedades que cursan con inflamación ocular, edema y neovascularización.

Los corticoides llevan asociados efectos secundarios como: aumento de la presión intraocular, cataratas subcapsulares y midriasis. La administración intravítrea de glucocorticoides puede conducir a la progresión de cataratas y el desarrollo de glaucoma inducido por estos medicamentos [19].

Actualmente se están logrando grandes avances en el diseño y desarrollo de nuevas estrategias de liberación de fármacos en el segmento posterior del ojo con los objetivos siguientes [20]:

-Conseguir una liberación prolongada.

-Traspasar las barreras oculares para liberar niveles terapéuticos constantes de fármaco en el lugar de acción.

-Evitar los efectos adversos derivados de la administración sistémica y las frecuentes inyecciones intravítreas.

-Pequeña cantidad de fármaco requerida durante el tratamiento.

-Menores complicaciones en los pacientes.

Algunos de estos sistemas farmacéuticos pueden ser degradables o biodegradables, como son los implantes y los sistemas coloidales donde se incluyen dendrímeros, liposomas, micropartículas, nanopartículas, complejos poliméricos, etc. Todos éstos pueden administrarse vía intravítrea.

Ozurdex® es un implante biodegradable e inyectable intravítreo de 700µg de dexametasona con una liberación lenta y de acción prolongada. Ha demostrado reducir la inflamación inhibiendo el edema y la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Es capaz de mantener concentraciones óptimas en el vítreo y retina durante 6 meses, con concentraciones mayores los dos primeros meses [20][21]. Sin embargo, su uso está limitado debido a que se trata de una técnica invasiva que requiere incisión quirúrgica para su implantación y en algunos casos también para su retirada. El calibre de aguja que se emplea es de 22G (0,7mm).

1.5 Micropartículas. Alternativa a los implantes intraoculares.

Las micropartículas presentan un notable interés como vehículos transportadores de fármacos en el segmento posterior del ojo. Su tamaño está comprendido entre 1-1000µm [10]. Se diferencian dos tipos de MPs: aquellas cuya estructura está formada por una cubierta externa en cuyo interior se encuentra el núcleo líquido o sólido, se denominan microcápsulas. Y aquellas que poseen una estructura consistente en una matriz polimérica en la que se encuentra el fármaco en forma de dispersión o suspensión, son las microesferas (MSs).

Poseen una gran versatilidad, permiten la incorporación de numerosos fármacos, son lo suficientemente pequeñas para ser administradas mediante una inyección convencional con agujas de pequeño calibre y lo suficientemente grandes para liberar los principios activos durante un periodo de tiempo que oscila entre semanas e incluso meses. Además se pueden fabricar con relativa facilidad y presentan buena reproducibilidad en su obtención.

Se logra con ellos una liberación controlada y prolongada de fármacos por la poca fluctuación en la concentración de principio activo y poder realizar una única inyección o al menos administraciones lo más separadas posibles en el tiempo. Evitan la cirugía de implantación y eliminación necesaria para otros dispositivos, tal y como se mencionó en el apartado anterior.

La administración de estos sistemas se realiza mediante la inyección de una suspensión de los mismos, a través de una aguja cuyo tamaño varía en función del tamaño de los sistemas y de la vía de administración (intravítrea o periocular). Para las MPs se propone un calibre de 30G (0,3mm). En este tipo de inyecciones se emplean como vehículos soluciones fisiológicas que son isotónicas como la solución tampón fosfato salino (PBS) y solución salina balanceada (BSS), de pH 7,4; debido a la naturaleza del humor vítreo, que es estéril. Sin embargo, debido a la tendencia que pueden poseer las partículas de quedarse adheridas a las jeringas, algunos investigadores han estudiado el uso de vehículos viscosos, como soluciones acuosas de ácido hialurónico o de hidroxipropilmetilcelulosa.

Condiciones necesarias para utilizar estos sistemas de administración intravítrea [15]:

- ✓ Diámetro de partícula compatible con el de la aguja para permitir su inyección. Máximo en 150µm.
- ✓ Inocuidad y fácil eliminación de los productos de degradación.
- ✓ Resistir los procesos de esterilización a los que de forma forzosa se deben someter estos productos.

1.5.1 Preparación de sistemas farmacéuticos en microesferas

Los diferentes métodos o técnicas de elaboración de micropartículas también son importantes, puesto que repercuten en el tamaño de partícula, y por tanto, en su capacidad de liberación. Método de extracción/evaporación del solvente de la emulsión, agregación por ajuste de pH o calor, coacervación, polimerización, técnica de atomización-congelación, y spray-drying [22].

El método extracción/evaporación se basa en la eliminación del disolvente volátil en el que previamente se ha solubilizado el polímero.

La técnica de evaporación del disolvente consiste en elaborar una emulsión que puede ser: O/A, A/O, O/O y A/O/A, dependiendo de la naturaleza del polímero y principio activo que se emplee. Para llevar a cabo la preparación de MSs se ha empleado la emulsión S/O/A. Este tipo de emulsión produce sistemas menos porosos debido a la ausencia de una fase interna acuosa.

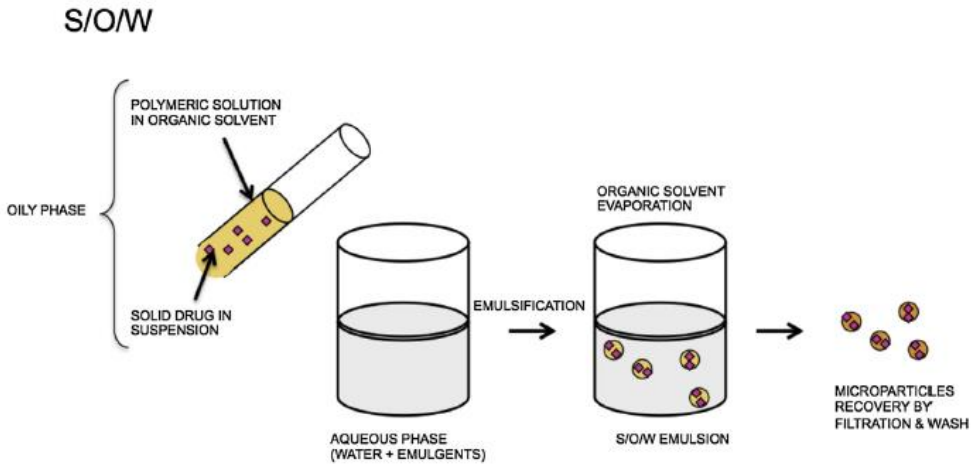


Figura 3: *Obtención de las MPs por medio de la dispersión del principio activo en fase sólida en la solución orgánica que contiene el polímero [22].*

1.5.2 Estrategias tecnológicas para la optimización de la formulación

La liberación del fármaco tiene lugar del siguiente modo:

Las MPs de polímeros hidrofóbicos como PLGA que contienen fármacos también hidrofóbicos como la dexametasona presentan una liberación del fármaco en tres fases: primeramente tiene lugar una liberación inmediata, seguido por una fase de

liberación controlada y por último una combinación de difusión y erosión del polímero [23].

Los polímeros más comúnmente empleados en la elaboración de MPs son el ácido poliláctico (PLA) y ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLAGA), que poseen excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Permiten la liberación controlada del fármaco y cuando se hidrolizan dan lugar a metabolitos naturales como son el ácido láctico y glicólico que se eliminan de organismo fácilmente y sin toxicidad mostrada [24]. Éstos aportan la ventaja de desaparecer del lugar donde se han administrado una vez han liberado el fármaco, sin necesidad de ser retirados. Están aprobados por la FDA y EMA para su uso en humanos. La velocidad de degradación de estos polímeros puede ser de meses e incluso años en función de su composición y del peso molecular. Polímeros amorfos de bajo peso molecular son útiles en el desarrollo de sistemas de cesión controlada donde se pretende que el material desaparezca del lugar de acción una vez ejercido el efecto.

El aporte de sustancias que protejan de la oxidación a la retina y el nervio óptico son imprescindibles. Además las sustancias oleosas añadidas a la formulación de las MPs han demostrado ser útiles en la modulación de cesión del principio activo. Se favorece su estabilidad y se ve incrementada la eficacia de encapsulación [22].

La vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles y forma parte de una familia de compuestos poliprenoides. En su estado natural, la vitamina E tiene ocho formas isoméricas, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen un anillo aromático (llamado cromano) con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Existen formas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ) para ambas familias de compuestos, que se determinan por el número de grupos metílicos en el anillo aromático. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica, siendo la más eficaz α-tocoferol. Ha demostrado poseer efectos beneficiosos derivados fundamentalmente de su capacidad antioxidante. El estrés oxidativo es uno de los factores de riesgo implicados en la patogénesis de determinadas enfermedades oftálmicas. El daño tisular debido a la oxidación se produce mediante una reacción en cadena que fundamentalmente se inicia por la

producción de radicales libres de oxígeno. Debido a estas condiciones, la retina posee un ambiente pro-oxidativo y como consecuencia, tanto la retina como su epitelio pigmentario, tienen su propio sistema antioxidante para protegerse; el cual está compuesto fundamentalmente por vitaminas (C y E) y carotenoides (Luteína y Zeaxantina). La administración de vitaminas antioxidantes ayudaría a retrasar el daño oxidativo que se produce. Además la vitamina E tiene actividad antiproliferativa, lo que proporciona una protección añadida a la hora de realizar inyecciones intraoculares repetidas; evitando o disminuyendo el desprendimiento de retina traccional, cuyo agente desencadenante entre otros es la proliferación de fibroblastos [23].

La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína de cadena simple cuya función es transportar sustancias. Está formada por 585 aminoácidos y un peso molecular de 68kDa. Es la proteína mayoritaria del plasma sanguíneo y la más abundante en el organismo [25]. Es sintetizada en el hígado y se encuentra en un 67% en forma de α-hélice. Posee ligandos que forman complejos y éstos son transportados por el organismo. Debido a que es biocompatible, biodegradable y presenta buena eficacia de encapsulación, la HSA es buena candidata para la microencapsulación. Varios estudios afirman que la albúmina es capaz de interferir con la degradación del polímero, reduciendo el efecto inmediato de liberación del principio activo (efecto Burst) mediante la formación de complejos con el mismo; de este modo se mantiene la integridad durante más tiempo [26]. Además, el control sobre la cesión también puede atribuirse a procesos físicos que impiden la salida de la sustancia activa a través de los poros de las MPs.

La esterilización es uno de los factores críticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos por vía intraocular. Se prefiere un proceso de esterilización final del producto a la preparación de la formulación en condiciones asépticas. Dentro de los métodos finales de esterilización, los que más frecuentemente se usan son: óxido de etileno, calor seco/húmedo y radiaciones ionizantes. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no pueden emplearse con polímeros termolábiles como el PLGA, siendo la esterilización por radiación gamma el método de elección; que realizado a baja temperatura la exposición del polímero es menor, evitándose por

consiguiente cambios estructurales en éste [27]. Las ventajas que aporta la radiación gamma son: alto poder de penetración, baja reactividad química, pequeños cambios de temperatura en la muestra y niveles bajos de residuos.

II. OBJETIVOS

Los objetivos generales que hemos pretendido alcanzar con este trabajo han sido:

- ✓ Mostrar de manera integrada los contenidos formativos recibidos y las competencias adquiridas en las distintas materias en Farmacia.
- ✓ Realizar una revisión bibliográfica que permita conocer el estado de la ciencia en la actualidad en esta área.
- ✓ Adquirir nuevas competencias en el Laboratorio durante la parte experimental.

Por otra parte, como objetivos específicos en la realización de la parte experimental se han establecido:

1. Preparación de un sistema farmacéutico de microesferas con un polímero biodegradable incorporando un fármaco antiinflamatorio.
2. Caracterización de las microesferas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (morfología), medidas de dispersión de la luz (tamaño) y análisis calorimétrico (estado de agregación).
3. Conocer, observar y aprender cómo se realiza una administración intravítrea y cómo se determinar la eficacia de la formulación mediante técnicas electrorretinográficas e inmunohistoquímicas en animales de experimentación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fuentes bibliográficas

Para realizar la parte documental y experimental de este trabajo se han utilizado diferentes fuentes bibliográficas para la obtención de resultados y elaboración de conclusiones acerca del desarrollo galénico y biofarmacéutico de las micropartículas de dexametasona.

Se ha recopilado información gracias a las herramientas de bases de datos como SciFinder, PubMed, Scopus y Web of Science, las cuales recopilan información y permiten el acceso a referencias bibliográficas como artículos, revistas, libros en línea, etc.

Se han encontrado un total de 23 referencias bibliográficas entre las distintas bases de datos consultadas, para ello hemos incluido las palabras clave de este trabajo y se ha considerado un intervalo de tiempo de 6 años (2010-2016). Las citas incluidas se han seleccionado en base al contenido de los distintos epígrafes de que se compone el trabajo y han sido nombradas con el estilo Vancouver y la ayuda de RefWorks.

3.2 Materias primas y equipos

Para la realización del trabajo experimental de preparación y caracterización de un sistema farmacéutico en microesferas, se han utilizado las siguientes materias primas y equipamiento:

<u>Materias primas</u>

Copolímero poli-(láctico-co-glicólico). (Resomer® RG 503), PLGA, empleado para elaborar estas formulaciones. Obtenido de Boehringer Ingelheim (Pharma GmbH & Co., Ingelheim am Rhein, Alemania). Se conserva protegido de la humedad a 4-8ºC. $[C_3H_4O_2]_x$ $[C_2H_2O_2]_y$.

Alcohol polivinílico (PVA): como agente emulgente de la emulsión se ha empleado un polímero sintético soluble en agua: PVA, comercializado por Merck KGaA (Alemania). Es coadyuvante y estabilizante de la emulsión en la etapa de preparación de las MSs. $[-CH_2CHOH-]_n$.

Albúmina sérica humana (FITC-HSA): fue suministrada por Tevu Bio (España) y se encuentra conjugada con isotiocianato de fluoresceína lo que permite su visualización y cuantificación mediante técnicas fluorimétricas. Se ha utilizado como modelo de proteína para su encapsulación.

Dexametasona (DXM): principio activo de la formulación. Es un polvo blanco, cristalino, que funde aproximadamente a 268-271ºC y posee bajo peso molecular (392,5g/mol). Es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en diclorometano, muy soluble en acetona y bastante en etanol. Debe ser protegido de la luz y conservado a 2-8ºC en lugar fresco y seco [28]. Su fórmula corresponde a $C_{22}H_{29}FO_5$.

Fue suministrada por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Vitamina E o α-tocoferol acetato: corresponde a la fórmula $C_{31}H_{52}O_3$. Suministrada por Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA).

Agua Milli Q: se trata de un agua ultrapura y estéril (filtrada por una membrana de 0,22µ), obtenida mediante resinas intercambiadoras de iones y carbón activo. Se utiliza como fase acuosa.

Diclorometano o cloruro de metileno (DCM): disolvente clase 2 [28]. Posee 97% de pureza. Se utiliza como fase orgánica. Es un líquido volátil que posee baja tensión superficial y por tanto hay que tener precaución a la hora de trabajar. Suministrado por Scharlab (España), de calidad Farmacopea.

Resulta tóxico para el ser humano, sin embargo ha sido aprobado por la FDA como solvente en las industrias química y farmacéutica. Su uso debe limitarse debido a su toxicidad inherente pero si se encuentra como ingrediente del producto final, deberá ser en una concentración inferior a 600ppm [28].

Ácido hialurónico: polisacárido empleado para redispersar las MSs y facilitar su posterior liofilización y administración en los animales de experimentación. Lubrica, humecta y protege la superficie externa de los ojos.

Filtro de mallas de Nylon Millipore® de 2, 20 y 40µm.

Equipos

Balanza Metler-Toledo AG245 (precisión de 0,1mg). Sonicador B.Braun Labsonic®u. Homogeneizador JK ‘’Jankel and Kunkel’’ IKA®-Labortechnik ULTRA-TURRAX T25. Agitador Selecta agimatic. Equipo de filtración a vacío de laboratorio. Liofilizador del laboratorio Telestar Cryodos. Analizador de tamaño de partícula MICROTRAC SRA Leeds and Northrup instruments. Microscopio electrónico de barrido (SEM) Zeiss DSM 950. DSC3 Metler Toledo.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparación de las microesferas

Para la preparación de las MSs se ha empleado la técnica de extracción-evaporación del solvente orgánico a partir de un sistema disperso S/O/A. Se elaboraron dos formulaciones de MSs, F1 y F3 cuya composición se recoge en la Tabla1.

Formulación	Polímero	Dexametasona	Vitamina E	HSA
F1	183.5 mg	20 mg		
F3	200 mg	19.9 mg	20 µg	20 µg

Tabla 1: *composición de cada una de las formulaciones de MSs.*

- Para obtener las MSs F1 se procedió de la siguiente manera:

Se pesan 20mg de DXM que se interponen en 1ml de DCM, se añaden 200mg de PLGA y se agita para formar una primera dispersión (S/O). A continuación, a esta dispersión se añade una disolución al 2% de PVA (5ml) obteniéndose así el sistema S/O/W. Esta mezcla se lleva a agitación en un homogeneizador JK IKA®-Labortechnik (8000rpm, 1min).

A un vaso de precipitados conteniendo 100ml de PVA al 0.1% se adicionó el sistema disperso anterior. Se tapa con papel de aluminio, que se perfora para permitir la evaporación del solvente orgánico a medida que se va extrayendo desde la fase interna a la acuosa externa. Se mantiene en agitación magnética durante 3h para lograr la maduración de las MSs.

- La elaboración de las MSs F3 se realizó por el mismo procedimiento con las siguientes particularidades:

En este caso, 20µg de la albúmina humana (HSA) se adicionan a 20µg de vitamina E en un tubo Eppendorf de baja adsorción a proteínas (low-binding) sonicando durante 10 segundos en baño de hielo para reducir el riesgo de desnaturalización de la proteína. El conjunto se añade a la primera dispersión S/O del PLGA (200mg) y DXM (19.9mg) en 1ml de DCM. A continuación se procede como se ha indicado para F1.

Seguidamente se procede al lavado de las MSs de ambas formulaciones con agua Milli Q para eliminar el PVA y a su filtración a vacío a través de mallas de Nylon de tamaño de poro 40, 20 y 2µm para obtener dos fracciones de tamaños: 2-20µm y 20-40µm. Dichas fracciones se depositan en tubos Eppendorf con Ácido Hialurónico oftálmico al 0.1% empleado como vehículo para facilitar la redispersión de las MSs. Luego se congelan a -80ºC para posteriormente proceder a su liofilización y finalmente se conservan como producto sólido en tubos herméticamente cerrados a una temperatura comprendida entre 4-8ºC.

3.3.2 Determinación del tamaño de partícula

Mediante el equipo MICROTRAC SRA reseñado anteriormente, se realizó por duplicado un análisis de la distribución de tamaños en una muestra homogénea de MSs. Primero se analiza una solución acuosa del ácido hialurónico al 0,1% para establecer la señal de fondo (blanco). A continuación se realizan las medidas de las muestras de MSs F1 y F3.

Funcionamiento del equipo de medida de dispersión de luz láser [29].

Cuando la luz pasa a través de un sistema coloidal, es dispersada en todas las direcciones por las partículas, y el rayo luminoso se vuelve claramente visible. Este efecto llamado Tyndall es el causante de la visibilidad de un haz de luz solar en una habitación oscura debido a la presencia de partículas de polvo en la atmósfera.

En los gases, líquidos y disoluciones existen variaciones (inhomogeneidades) del índice de refracción, debidas a fluctuaciones locales de la densidad. La consecuente

dispersión de luz reduce la intensidad del rayo transmitido. Dicho efecto es más pronunciado en el caso de dispersiones coloidales. La medida de la intensidad, la polarización y la distribución angular de la luz dispersada constituyen un conjunto de parámetros que se pueden utilizar para estudiar la forma, el tamaño e incluso las interacciones de las partículas.

3.3.3 Estudio morfológico de las microesferas

Para determinar la morfología de las MSs se emplearon los siguientes equipos:

Se trata de un SEM estándar (situado en el Centro de apoyo a la investigación (CAI), en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá) que consta de una lámpara de tungsteno que genera un haz de electrones secundarios que permite la obtención de imágenes de alta resolución (aumentos de hasta x300.000). Las muestras para su observación fueron previamente desecadas a vacío y recubiertas superficialmente (en un evaporador catódico) con una película de oro de 25 nm, ya que se necesitan materiales conductores para la visualización de las imágenes.

3.3.4 Análisis térmico

Permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, como por ejemplo la pureza de compuestos cristalinos o el polimorfismo. Se calcula teniendo en cuenta el área bajo la curva del termograma (AUC) y los pesos de cada muestra. Además, sobre la base del estado de agregación de la sustancia se puede predecir el comportamiento del sistema farmacéutico con respecto al proceso de liberación del fármaco; si se encuentra al estado cristalino se liberará más lentamente que si se halla al estado amorfo.

El análisis térmico se llevó a cabo en el equipo DSC3 Metler Toledo con cápsulas de aluminio perforadas (40µL) en las que se depositó la muestra a analizar. El DSC mide el flujo de calor en la muestra y en un material inerte de referencia (cápsula vacía) de forma independiente. El análisis se ha realizado en el rango de temperatura -10 a 300ºC, a una velocidad de 10ºC/min, en corriente de nitrógeno. En estas condiciones, realizamos los termogramas del DSC para dexametasona base, PLGA y las MSs elaboradas F1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el método descrito en materiales y métodos se elaboraron dos formulaciones diferentes de MSs cuya composición aparece descrita en la tabla 1.

4.1 Rendimiento del método de obtención de las microesferas

Una vez liofilizadas las distintas fracciones granulométricas calculamos el rendimiento global del proceso mediante pesada y balance entre los materiales de partida y el peso final de MSs, lo que se representa en la figura 4.

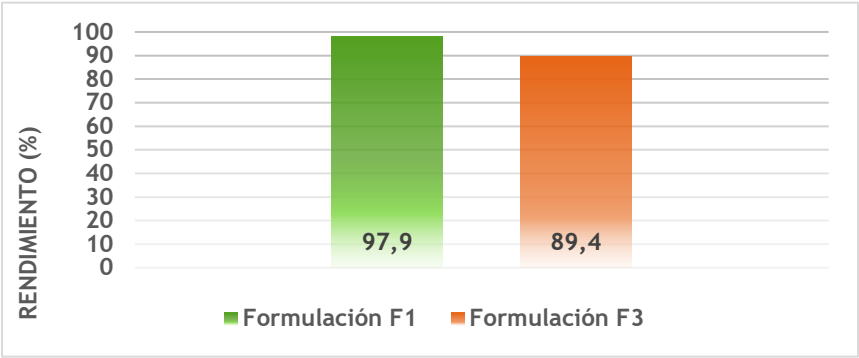


Figura 4: *Rendimiento (%) de obtención de las MSs F1 y F3 elaboradas por extracción-evaporación del solvente (S/O/W).*

En la tabla 2 se muestra el rendimiento obtenido para cada una de las fracciones en que se han separado las MSs:

	F1 Dexametasona	F3 D+Vit E+HSA
2-20 µm	20.4	17.4
20-40 µm	76.8	71.3

Tabla 2: *Rendimiento (%) de las fracciones granulométricas obtenidas.*

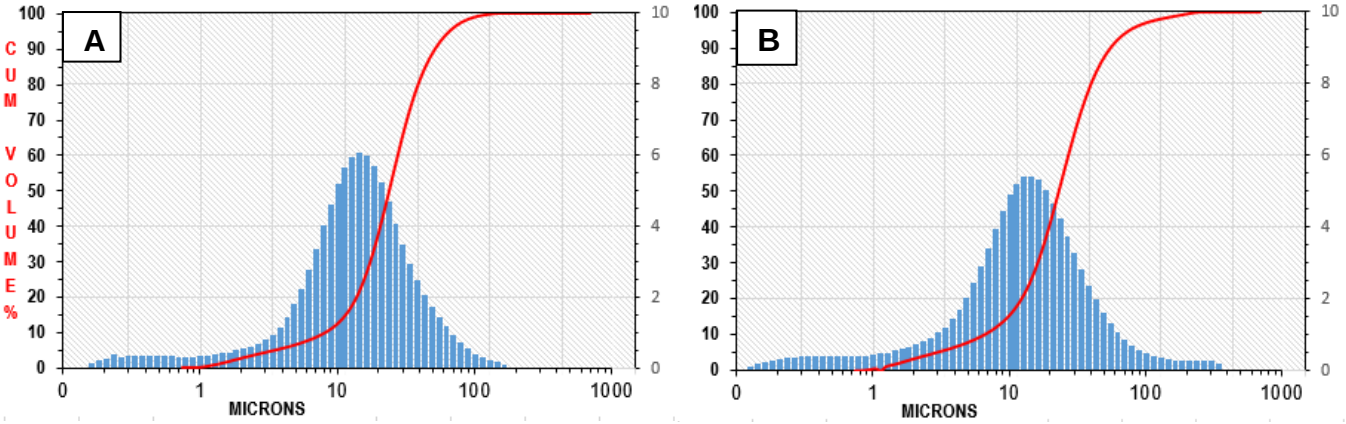
Si bien no se ha realizado un análisis cuantitativo de la carga de albúmina y de DXM pero en otros trabajos del Laboratorio se ha encontrado que tanto las MSs F1 como las F3 con tamaño entre 20-40µm tienen una carga de fármaco de aproximadamente 80µg DXM por mg de MSs. Mientras que para las MSs F1 y F3 con tamaño comprendido entre 2-20µm su carga fue de 40-50µg DXM por mg de MSs.

Las MSs con tamaño de 20-40µm son las que se han utilizado para la administración en los animales de experimentación, debido a su presumible más lenta velocidad de cesión.

4.2 Caracterización del sistema farmacéutico en microesferas

4.2.1 Distribución del tamaño de las microesferas

El análisis de tamaño medio para las MSs elaboradas de F1 y F3 se muestra en las figuras 5 y 6 respectivamente.



Figuras 5 y 6: *Analisis granulométrico mediante dispersión de luz láser de las MSs F1 y F3 respectivamente.*

Se observa una distribución normal del tamaño con una moda para ambas formulaciones de 26,16µm; si bien las medias aritméticas resultan ser ligeramente diferentes: 28,34µm y 30,28µm para F1 y F3 respectivamente.

Una forma de expresar la dispersión del tamaño de partícula se basa en el factor SPAN que viene determinado por la siguiente fórmula:

Para F3: $SPAN = \frac{d95-d10}{d50} = \frac{58,3}{24,22} = 2,41$ Para F3: $SPAN = 3,05$

En donde d95,d10 y d50 son los percentiles 95%,10% y 50% del tamaño de partícula respectivamente.

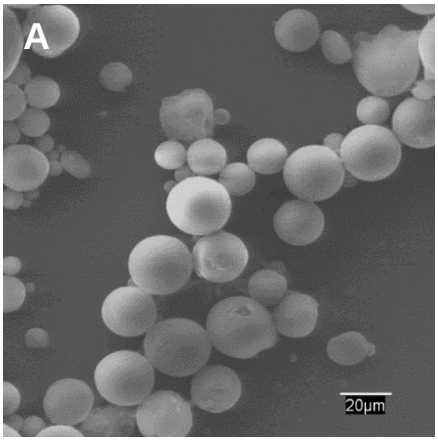
No se observa una tendencia significativa a la variación del tamaño de partícula y de la dispersión ($SPAN$) de F1 con respecto a F3.

DATA BASE DISPLAY - MICROTRAC STANDARD RANGE PARTICLE ANALYZER - Ver 3.01											
MEDIDA TAMAÑO PARTÍCULA *MICROPARTÍCULAS DEXAMETASONA + HSA + Vit E*							MªCRUZ RIVAS GARCÍA. TFG				
Meas/Pres #:	30	-	1			*param #2:*	0,000		*Lot Code:*		
param #1	0,000					*param #3:*	0,000		*Account#:*		
Id #1:		D+P+E			*Summary Data*		*Id #2:*			MEDIDA EN H@O	
Distrib. Format:		Volume/High					*Date: 26/05/16*			Time: 17:31	
Filter:		On			dv	0,1183	*Chan Progression:*			Geom/8rt2	
Run Time:		120 seconds			10%	6,62	*Upper Channel Edge:*			704,00	
Run #:		AVG of 2 runs			50%	23,37	*Lower Channel Edge:*			0,69	
Loading Index:		0,89			95%	77,92	*Number of Channels:*			80	
Laser Intensity:		1,073			mv	30,28	*Fluid Refractive Index:*			n/a	
Residuals:		Disabled			ma	11,92	*Transparent Particles:*			No	
Above Residuals:		0,00			cs	0,503	*Spherical Particles:*			n/a	
Below Residuals:		0,00			sd	17,24	*Part. Refractive Index:*			n/a	

Figura 7: Base de datos suminitrada por el analizador de partícula.

4.2.2 Estudio morfológico

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite analizar la morfología de las MSs.



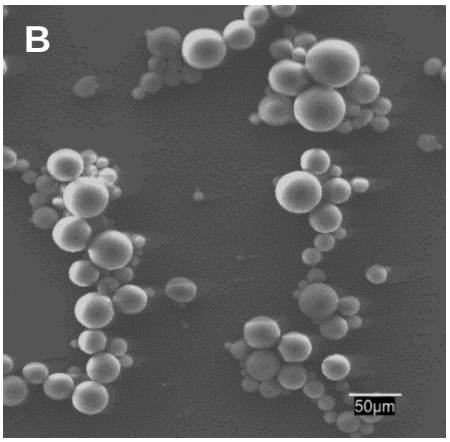


Figura 8: *Microfotografías al SEM de microesferas de 20-40µm F1 (figura A) y F3 (figura B).*

En la figura 8 correspondiente a las MSs F1 y F3 (figuras A y B) observamos su dispersión y la distribución de tamaños no es muy amplia.

En ambos casos las microesferas obtenidas presentan una superficie lisa, son esféricas y sin la presencia de poros en la superficie.

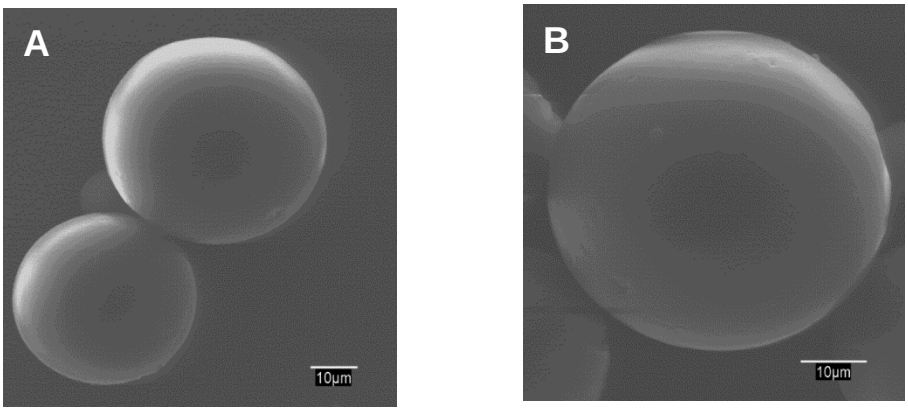


Figura 9: *Microfotografías al SEM de la superficie de las MSs de 20-40µm de F1 (A) y F3 (B).*

4.2.3 Análisis térmico

En la figura 10 se muestran los termogramas obtenidos por DSC en las condiciones indicadas en el apartado de Materiales y Métodos para DXM base (4,92mg, ——), PLGA (4,20mg, ——) y MSs de F1 (8,38mg, ——)

El termograma correspondiente a DXM, materia prima que se halla en forma cristalina muestra un solo pico correspondiente a la temperatura de fusión (T_F), que es de primer orden con un valor de 268-271ºC. Para el polímero (PLGA), sin embargo, se registra una temperatura de transición vítrea (Tg) que corresponde a la transición de estado sólido a cáuchico, ésta es de 56,10ºC. Al finalizar el proceso las muestras quedan carbonizadas.

En el termograma de MSs F1 se observa una disminución tanto de la T_F del fármaco como de la Tg de PLGA y de igual modo con las entalpías registradas tal y como se muestra en la tabla 3.

También se aprecia, de igual modo, una reducción del área de los correspondientes picos; lo que se traduce en una disminución de las entalpías de dichos procesos, como se muestra en la tabla 3

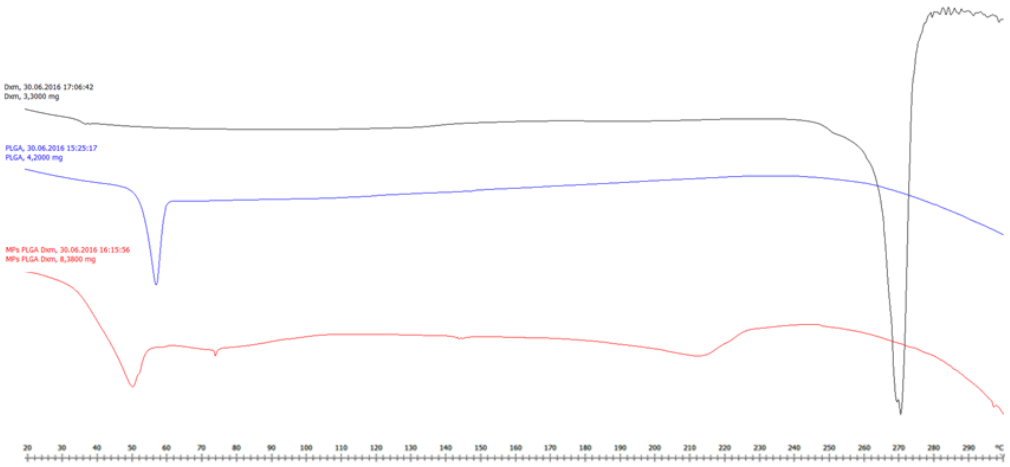


Figura 10: termogramas obtenidos tras realizar la DSC para cada una de las muestras.

	Entalpia ΔH (J/g)	**Tª (ºC)**
Dexametasona [(a)]	103,10	269,94
PLGA [(b)]	7,37	56,10
MSs F1	5,24 [(a)] 6,95 [(b)]	212,33 [(a)] 49,06 [(b)]

Tabla 3: Entalpías, TF y Tg registradas en la DSC de las distintas muestras a analizar.

Del cambio entálpico se deduce que la DXM en la formulación F1 de MSs ha perdido su cristalinidad inicial y se encuentra parcialmente amorfa. Por otro lado, la significativa disminución de las temperaturas de cambio de estado sugiere la posible existencia de interacciones entre el fármaco y el polímero, por lo que permite postular una liberación de la DXM lenta y sostenida dependiente de la degradación del polímero.

V. CONCLUSIONES

1. Las ventajas que presentan las MSs frente al implante Ozurdex hacen de éstas un sistema farmacéutico más idóneo para tratar determinadas patologías oculares que afectan al segmento posterior del ojo.
2. El método empleado para la elaboración de las microesferas permite obtenerlas con un elevado rendimiento de producción y de fármaco encapsulado.
3. Las MSs obtenidas presentan morfología esférica y una superficie lisa, no porosa. Su tamaño se halla mayoritariamente comprendido entre 20-40µm, apropiadas para su administración en el segmento posterior del ojo.
4. Los ensayos que se han realizado con las MSs permiten predecir una liberación sostenida del fármaco, que podría ser la adecuada para los requerimientos terapéuticos; si bien resulta imprescindible realizar estudios más profundos de este sistema farmacéutico.
5. Gracias a la colaboración con el Dr. Pedro de la Villa, se ha podido conocer también cómo se realiza una administración intravítrea y se evalúa la eficacia de las formulaciones administradas por esta vía.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Alm A, Ehinger B. Sección 8: Retina en Adler fisiología del ojo, 10º edición. Kaufman K.L., Aim A. Desarrollo y estructura de la retina. Madrid. Mosby 2003; 319-408.
2. Rincón Alarcón A, Molina Martínez I.T. Sistemas de cesión controlada por vía intraocular. Arch Soc Esp Oftalmol 2006; 81 (2):57-60.
3. Rigo Oliver, E. Degeneración macular asociada a la edad. Aspectos clínicos en el manejo de los anti-VEGF. Tesis Doctoral [Internet] 2012; pág 17. Citado en 2016. Disponible en http://hdl.handle.net/10803/96881.
4. Fine L.S., Berger J.W., Maguire M.G. Age-related macular degeneration. N Engl J Med 2000; 342 (7): 483-491.
5. Instituto de Microbiología Ocular [Internet]. Barcelona: 2012. Citado en 2016. Disponible en: http://www.imo.es/patologia/dmae/.
6. Chávez Pardo I, González Varona D, de Miranda Remedios D.I. Degeneración macular relacionada con la edad. Revista Archivo Médico de Camagüey 2008; 12(2).
7. Teleoftalmología Guainia.com [Internet]. Guainía: 2012. Citado en 2016. Disponible en: http://www.teleoftalmologia.com.co/guainia/patologias-oculares/alteraciones-del-segmento-posterior.html
8. Arias Barquet L. Epidemiología, etiopatogenia y factores de riesgo de la DMAE. La medicina hoy (Barc) 2003; pág 308.
9. Gaudana R, Ananthula H.K., Parenky A, Mitra K. Ocular drug delivery. AAPS J 2010; 12 (3): 348–360.
10. Herrero-Vanrell R, Refojo M.F. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. Adv. Drug. Deliv 2001; Rev. 52 (1): 5-16.
11. Geroski D.H., Edelhauser H.F. Drug delivery for posterior segment eye disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41 (5): 961-964.
12. Martínez Sancho, C. Desarrollo de microesferas biodegradables de Aciclovir para administración intraocular 2004; pág 14.
13. Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymer devices. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57 (14): 2033-2046.
14. Acharya N, Young L. Sustained-release drug implants for the treatment of intraocular disease. Int Ophtalmol Clin 2004; 44 (3): 33-39.

15. Rodríguez Villanueva J. Diseño y caracterización de sistemas microparticulares de administración intraocular. Trabajo de Investigación del Máster en Farmacia y Tecnología Farmacéutica 2013; pág: 9-14.
16. Ruiz-Moreno J, Arias-Barquet L, Armadá-Maresca F, Boixadera-Espax A., García-Layana A., Gómez-Ulla-de-Irazazábal F, et al. Guías de práctica clínica de la SERV: Tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa. Arch Soc Esp Oftalmol 2009; 84 (7): 333-344.
17. Antoszyk A.N., Tuomi L, Chung C.Y., Singh A. FOCUS Study Group. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration (FOCUS): year 2 results. Am J Ophthalmol 2008; 145 (5): 862-874.
18. Barcia E, Herrero-Vanrell R, Diez A, Álvarez-Santiago C, López I, et al. Downregulation of endotoxin-induced by intravitreal injection of PLGA microspheres loaded with dexamethasone. Exp Eye Res 2009; 89 (2): 238-345.
19. Carnahan M.C., Goldstein D.A. Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids. Curr Opin Ophthalmol 2000; 11(6): 478-483.
20. Pooja Bansal, Satpal Garg, Yograj Sharma, and Pradeep Venkatesh. Posterior Segment Drug Delivery Devices: Current and Novel Therapies in Development. J Ocul Pharmacol Ther 2016; 32 (3): 135-138.
21. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2015. Ozurdex. Obtenido de Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS - CIMA: http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar
22. Herrero-Vanrell R, Bravo-Osuna I, Andrés-Guerrero V, Vicario de la Torre M, Molina Martínez I.T. The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies. Prog Retin Eye Res 2014; 42: 27-43.
23. Rodriguez Villanueva J, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Molina Martinez IT, Guzman Navarro M. Optimising the controlled release of dexamethasone from a new generation of PLGA-based microspheres intended for intravitreal administration. Eur J Pharm Sci 2016; http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.03.012

24. Sansdrap P y Möes A.J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. J Control Release 1997; 43: 47-58.
25. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. Nat Struct Biol 1998; 5(9): 827-835.
26. Sudlow G, Birkett D.J., Wade D.N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol 1976; 12 (6): 1052-1061.
27. Herrero-Vanrell R, Ramirez L, Fernandez-Carballido A, Refojo MF. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. Pharm Res 2000; 17(10): 1323-8.
28. España Ministerio de Sanidad y Consumo y Boletín Oficial del Estado. Real Farmacopea Española en Internet. Monografías; 2008.
29. Información técnica Microtrac. Consultado en www.microtrac.com/laser-diffraction-systems-for-particle-size-measurements.

Agradecimientos

A mi tutor, Manuel Guzmán, por permitirme ampliar mis conocimientos en este campo de la ciencia, haciéndome partícipe de diversas actividades durante el TFG.

A Javier Rodríguez, que se encuentra realizando el Doctorado en la Universidad de Alcalá, por la ayuda prestada durante la parte experimental de este trabajo.

A Laura Ramírez y al grupo de Neurofisiología Visual del Dr. Pedro de la Villa de esta universidad.