HPLC-ICP-MS PARA LA EVALUACIÓN DE PIROFOSFATO BIOACCESIBLE PROCEDENTE DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN

María Álvarez-Barciela[1], Alejandro Ogando-Cortés[2], Paloma Herbello-Hermelo[1], Pilar Bermejo-Barrera[1], María Raquel Domínguez-González[1], Pablo Taboada-Antelo[2], Antonio Moreda-Piñeiro[1]

[1]Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE), Instituto de Materiales (iMATUS). Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidade de Santiago de Compostela. Avenida das Ciencias s/n. 15782-Santiago de Compostela, España.

[2]Grupo de Física de Coloides y Polímeros (GFCP). Instituto de Materiales (iMATUS). Departamento de Física de Partículas. Facultad de Física, Universidade de Santiago de Compostela, España.

getee@usc.es, geteeanalitica.es

Abstract

El síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford es una enfermedad genética extremadamente rara que causa la disminución, a nivel plasmático, del pirofosfato inorgánico (PPi) a valores casi nulos, produciendo calcificación vascular acelerada, accidentes cardiovasculares y muerte prematura. Una posible terapia es la administración oral del PPi encapsulado en nanotransportadores disminuyendo su degradación digestiva. Para cuantificar su bio-accesibilidad y biodisponibilidad, se desarrolló una metodología analítica utilizando cromatografía líquida de alta resolución con plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS). El programa optimizado permitió la completa resolución y especiación del PPi y del fosfato inorgánico (Pi) en menos de 5 min. Al evaluar la bio-accesibilidad, se descartaron las nanopartículas de PLGA por la degradación total del PPi, mientras que los liposomas (DPPC/DMPG) mostraron una bio-accesibilidad del 80-90%. Finalmente, mediante un sistema *gut-on-a-chip*, se cuantificó que un 11,5% del PPi bioaccesible atraviesa la barrera intestinal, validando la viabilidad de esta estrategia terapéutica.

1. Introducción

El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es una enfermedad genética extremadamente rara caracterizada por un envejecimiento prematuro y complicaciones cardiovasculares que tiene como consecuencia una muerte prematura a una edad promedio de 14,6 años [1]. Esta enfermedad está causada por una mutación en el gen LMNA, lo que tiene como consecuencia la síntesis de una proteína aberrante y tóxica denominada progerina [1]. La acumulación de esta proteína provoca una deformación en la estructura del núcleo celular y tiene como consecuencia la desregulación del metabolismo del pirofosfato inorgánico (PPi) a nivel plasmático [2].

En condiciones fisiológicas normales, la enzima ENPP1 es la encargada de sintetizar el PPi a partir de moléculas de ATP [3]. Sin embargo, la desregulación metabólica del PPi causada por la progeria está caracterizada por la hiperactivación de dos enzimas: la CD39 y la TNAP. Por un lado, la enzima CD39 degrada el ATP disponible transformándolo en adenosín monofosfato (AMP) y fosfato inorgánico (Pi), lo que deja sin sustrato para la síntesis de PPi a la ENPP1. Por otro lado, la TNAP hidroliza y destruye el PPi libre que logre formarse, convirtiéndolo a Pi [3]. Como consecuencia, la concentración plasmática de PPi, principal inhibidor natural de la calcificación vascular, se reduce a cantidades casi nulas. La ausencia del PPi desencadena una calcificación vascular acelerada, que desemboca en accidentes cardiovasculares o accidentes cerebrovasculares (ictus), responsables de la muerte prematura producida en esta enfermedad [2].

Estudios recientes indican que el PPi administrado por vía oral se puede llegar a absorber e incrementar temporalmente su concentración plasmática [3, 4]. Sin embargo, para evitar que el compuesto se degrade durante el proceso de digestión, es necesaria la implementación del uso de nanotransportadores para su protección como liposomas o nanotransportadores poliméricos. Por este motivo, es necesario el desarrollo y validación de una metodología analítica que permita cuantificar la bio-accesibilidad del PPi encapsulado tras una digestión gastrointestinal *in vitro* y evaluar su posterior biodisponibilidad.

2. Desarrollo de la metodología analítica

Para realizar la especiación y cuantificación del PPi en presencia de Pi, se optimizó un método de cromatografía

líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (HPLC-ICP-MS). El sistema instrumental empleado consta de un equipo HPLC PerkinElmer Flexar acoplado a un espectrómetro de masas ICP-MS NexION® 300X.

Para llevar a cabo la separación cromatográfica se utilizó una columna de intercambio aniónico Dionex IonPac AS7 (4 × 250 mm) protegida por una pre-columna analítica Dionex IonPac AG7 (4 × 50 mm). Tras evaluar métodos en gradiente e isocrático se consiguió una separación de Pi y PPi en modo isocrático utilizando como fase móvil una disolución de citrato sódico (Fig. 1).

La detección mediante ICP-MS se llevó a cabo midiendo el isótopo ^{31}P, detallándose las condiciones utilizadas en la Tabla 1.

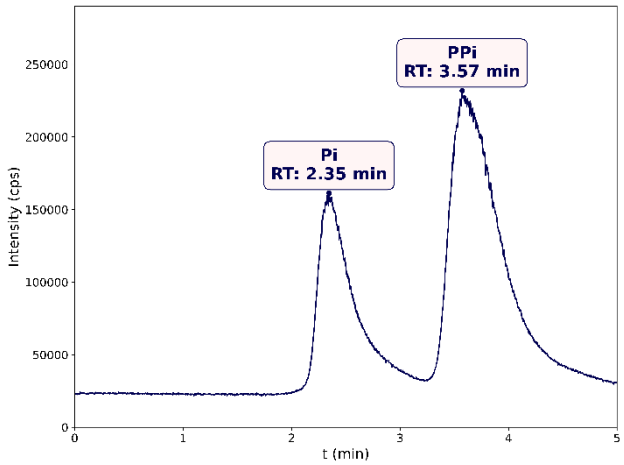


Fig. 1. Cromatograma obtenido mediante el programa en isocrático de citrato sódico para la separación de Pi y PPi con la columna Dionex IonPac AS7.

Tabla 1. Condiciones de medida ICP-MS.

Parámetro	Valor
Nebulizador	PFA-ST Microflow Nebulizer
Cámara de Spray	PC³ Peltier Cooler-Quartz cyclonic
Material de la interfaz triple cono	Níquel/Aluminio
Flujo de Nebulización	0,85 L/min
Flujo de gas auxiliar	1,2 L/min
Flujo de gas de plasma	16,0 L/min
Potencia RF ICP	1500 W
Modo de operación	KED 0,1 mL He/min
Isótopo (m/z)	^{31}P
Tiempo de lectura	250 ms
Tiempo de medida	295,25 s

3. Validación

El método desarrollado para la separación y cuantificación de fósforo como Pi y PPi demostró un amplio comportamiento lineal para ambos analitos con coeficientes de determinación R^2 superiores a 0,99 (Fig. 2). En cuanto a la repetibilidad de la medida, se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 5 % para las áreas cromatográficas y menores al 1% en el caso de los tiempos de retención. Estos valores confirman una buena reproducibilidad en las medidas al situarse los CV por debajo del 10%. El límite de detección (LOD) para el PPi se estableció en 50 µg/L y el límite de cuantificación (LOQ) en 167 µg/L.

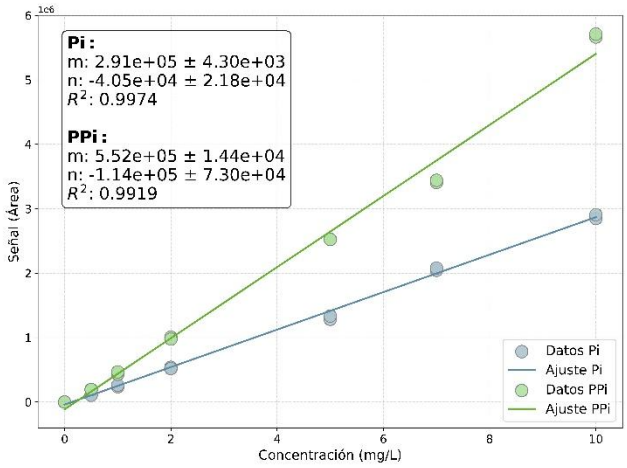


Fig. 2. Rectas de calibración externa del Pi y del PPi obtenidas mediante el análisis de estándares de concentración creciente desde 0,5 a 10 mg/L. Los puntos representan las señales experimentales (áreas) para cada concentración por duplicado. Se incluye la ecuación de la recta; la pendiente (m) y la ordenada en el origen (n).

4. Evaluación de la bio-accesibilidad y biodisponibilidad

Se planteó el uso de dos nanoportadores diferentes: liposomas (DPPC 70% y DMPG 30%) y nanopartículas de PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico). Para estudiar cómo se comportarían los nanotransportadores utilizados tras su administración oral se sometieron al proceso de digestión *in-vitro* desarrollado por el grupo de investigación GETEE basado en una etapa gástrica y una etapa intestinal.

Se evaluó la bioaccesibilidad del PPi encapsulado en los diferentes nanoportadores. En un estudio inicial, se descartó el uso de nanopartículas de PLGA, ya que todo el PPi encapsulado se degradó durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, obteniendo valores nulos de bioaccesibilidad. En cuanto al uso de liposomas,

se obtuvieron valores de porcentajes de bioaccesibilidad reproducibles de entre un 80% y un 90% (Fig. 3).

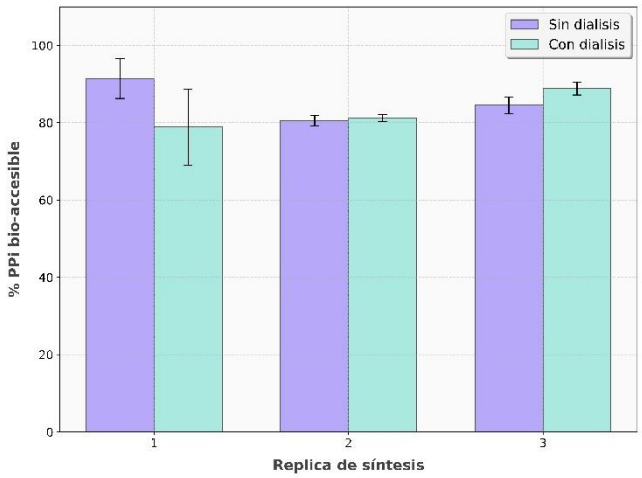


Fig. 3. Porcentaje medio de PPi bio-accesible en Liposomas DPPC y DMPG con 1,0 mg de PPi encapsulado (n=3).

Para simular la absorción intestinal del PPi, se utilizó el sistema microfluídico *gut-on-a-chip* Be Doubleflow de Beonchip. Este chip consta de dos canales independientes separados por una membrana porosa con un tamaño de poro de 1 µm (Fig. 4). En el canal superior se hace crecer una monocapa celular (líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal Caco-2 y HT-29 en una proporción 80:20) y por este mismo canal se introduce el bioaccesible resultante del proceso de digestión i*nvitro* acondicionado para ensayos celulares. En el canal inferior se recoge la fracción biodisponible, en la cual se determinará la cantidad de PPi que traspasó la monocapa intestinal.

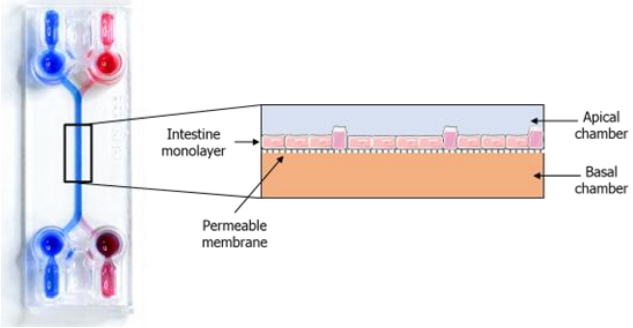


Fig. 4. Sistema Gut-on-a-chip Be Doubleflow de Beonchip y esquema del cultivo celular en los canales en el dispositivo [5].

Para generar el flujo en el interior de los canales se emplea el sistema de bombeo neumático para microfluídica de Ibidi. Este consta de una bomba de presión, dos unidades fluídicas y dos sets de perfusión. La bomba genera la presión que se indique en el interior de los reservorios del set de perfusión y la unidad fluídica se encarga de dirigir el flujo de una jeringa a otra manteniendo constante la dirección y el sentido del flujo dentro del chip (Fig. 5).



Fig. 5. Sistema gut-on-a-chip Be Doubleflow de Beonchip conectado al Sistema de bombeo Ibidi.

Tras realizar un primer estudio, donde se llevó a cabo una exposición de 4 h, se obtuvo un transporte a través de la monocapa celular de un 11,5 ± 0,4 % del PPi presente en el bioaccesible. Este resultado muestra cómo una pequeña parte del PPi bioaccesible es biodisponible, es decir, el PPi que llega al intestino sin degradarse se absorbe en parte por el intestino, lo que podría llegar a producir un aumento de la concentración de este en el plasma sanguíneo.

5. Conclusiones

Se ha desarrollado y validado un método analítico rápido mediante HPLC-ICP-MS empleando la columna de intercambio aniónico Dionex IonPac AS7. Las condiciones optimizadas permitieron la resolución y especiación completa del Pi y del PPi en un tiempo inferior a 5 minutos, mostrando un amplio rango lineal y alta reproducibilidad.

En lo que respecta a la evaluación de los vehículos nanométricos para el transporte y protección del PPi en su administración oral, el uso de nanopartículas de PLGA fue descartado debido a la degradación total del PPi durante el proceso de digestión *in-vitro.* Por el contrario, los liposomas compuestos de DPPC/DMPG demostraron proteger el PPi obteniendo porcentajes de bioaccesibilidad de entre el 80% y el 90%.

La integración del bioaccesible liposomal en una plataforma microfluídica *organ-on-a-chip* permitió

realizar un primer estudio donde se simula la absorción a través del epitelio digestivo humano en condiciones dinámicas, cuantificando un transporte del PPi a través de la monocapa celular de un 11,5 ± 0,4 %. Esta pequeña absorción intestinal podría llegar a suponer un aumento plasmático de la concentración de PPi lo que podría llegar a suponer una posible vía para la prevención de la calcificación vascular acelerada asociada al Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a la Xunta de Galicia (Grupo de Referencia Competitiva, reference ED431C 2022/029), a la Agencia Estatal de Investigación (MICIU/AEI/10.13039/501100011033) y a la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR (reference PID2022-142682OB-I00). María Álvarez-Barciela agradece al Ministerio de Educación, Formación Profesional y Deportes por la concesión de una Beca de Colaboración (25CO1/004121).

Referencias

[1] K. Harhouri, D. Frankel, C. Bartoli, P. Roll, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome, Nucleus 9 (2018) 265-276. https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1460045.

[2] R. Villa-Bellosta, J. Rivera-Torres, F.G. Osorio, R. Acín-Pérez, J.A. Enríquez, C. López-Otín, V. Andrés, Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson–Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment, Circulation 127 (2013) 2442-2451. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000571.

[3] D. Ralph, K. van de Wetering, J. Uitto, Q. Li, Inorganic pyrophosphate deficiency syndromes and potential treatments for pathologic tissue calcification, Am. J. Pathol. 192 (2022) 762-770. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.01.012.

[4] N.A. Rashdan, F. Rutsch, H. Kempf, A. Váradi, G. Leftheriotis, V.E. MacRae, New perspectives on rare connective tissue calcifying diseases, Curr. Opin. Pharmacol. 28 (2016) 14-23. https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.002.

[5] Beonchip, (2023), Gut-on-chip model with Be-Doubleflow device, part 2. https://beonchip.com/gut-on-chip-model-with-be-doubleflow-device-part-2 (Accessed June 2026)

Los autores conservan los derechos de autor de este trabajo. Este artículo se publica en acceso abierto bajo la licencia