

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Programa de Doctorado en Farmacia



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS COMO VEHÍCULOS CAPACES DE
ATRAVESAR LA BHE EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

TESIS DOCTORAL

Elena Ortega Martínez

Granada, 2023

Directoras
M^a Adolfinia Ruiz Martínez
M^a Encarnación Morales Hernández

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Elena Ortega Martínez
ISBN: 978-84-1195-121-0
URI: <https://hdl.handle.net/10481/88566>

-

“Tus sueños tomarán tiempo. Requerirán esfuerzo, dedicación y sacrificio. Pero al final valdrá la pena”

R. A Prakash

AGRADECIMIENTOS



Parece que jamás iba a llegar este día, y aquí me encuentro escribiendo las últimas palabras de este libro y de si algo me encuentro orgullosa es de mirar atrás y ver mi progreso tanto de aprendizaje como de madurez personal. Sería necia al pensar todo lo que he conseguido yo sola, y es que la realidad está formada por un gran equipo, que solo con esfuerzo, compañerismo y dedicación se llegan a obtener grandes cosas como esta.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, la Dra. M^a Adolfina Ruiz y la Dra. M^a Encarnación Morales. Simplemente GRACIAS. Yo no estaría hoy escribiendo esto si no fuese por ellas. Gracias por haber apostado por mí, gracias por hacerme participe de vuestros proyectos y gracias por querer que siga estando en vuestro equipo. Gracias Adolfina por ser la guía y referente a la que todas queremos llegar a ser en algún momento y tener una trayectoria parecida a la tuya. Gracias por tu sabiduría, tus ganas y tu disponibilidad en cualquier momento, ya que como tú dices “si te organizas, hay tiempo para todo”. Gracias Maen, mi otro referente. Dos cosas muy importantes he aprendido de ti en este tiempo. La primera, que no hay que darle tantas vueltas a la cabeza, “ni hay que buscarle tres pies al gato”. La segunda que es como se le pueden duplicar las horas al día para poder hacer todo el trabajo, y a tiempo, cuidar de la casa, y de tres hijos. Pero me siento afortunada de que, a pesar de la incontable carga laboral, siempre tienes tiempo para escuchar, dar un consejo y contar alguna anécdota. Gracias por tu sabiduría, tu paciencia, tu sonrisa y tu dedicación infinita. Gracias a las dos de todo corazón, sin vosotras esto no hubiese sido posible.

Gracias a todo el profesorado del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y al grupo de investigación CTS-205 por acogerme como una más desde el primer momento y por ayudarme en todo lo que he necesitado. Gracias a la Dra. Margarita López-Viota por alegrar el laboratorio y haber compartido tantos ratos de conversación. Gracias a compañeros que hemos compartido años en el laboratorio, a Sebas por acogerme como pupila y guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio; a Hermi, a Lola por hacerme partícipes de vuestra sabiduría, trabajo, esfuerzo y saber estar. No me puedo olvidar de Isa por la gran labor que ofrece al Dpto. para hacer que todo se encuentre en magníficas condiciones. Y por último a mis compañeros Simón y Ana, a los que les tengo un afecto especial y a los que sin duda echaré de menos.

Gracias al Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Jaén por permitirme formar parte de sus proyectos. Sus aportaciones constituyen un trabajo fundamental de este trabajo. Gracias a cada una de las personas que lo componen por esfuerzo y dedicación.

Gracias a los laboratorios 202 y 213 del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, dirigidos por Elena González Rey y Mario Delgado. Gracias por vuestra dedicación full-time a la investigación, por personas como vosotros se consiguen los grandes avances en ciencia. Gracias por dejar que me empape de vuestra sabiduría y forma de trabajar. Mencionar a Julia, Pablo, Nacho, Irene, Marta por la ayuda incondicional brindada en todo momento.

Gracias a mis padres, Gregorio y Sensi, y a mi hermana, Olga, por acompañarme a lo largo de toda mi vida y apoyar todas mis decisiones con convencimiento, amor y paciencia. Como dice nuestro lema “cuanto más fácil te sea elegir lo bueno, más libre serás”. Gracias por guiarme en la vida en este sentido construyendo un espíritu crítico, educado, responsable y respetuoso. Gracias por vuestros consejos y recomendaciones, que, aunque muchas veces saque mi carácter, siempre los tomo y aprendo mucho de ellos. Y ante las dificultades, gracias por sacarme a flote y seguir adelante con mis sueños. GRACIAS

Gracias Adri, por aguantarme en mis preocupaciones del día a día. Se que no es fácil soportar mis agobios, pero gracias por tu comprensión y tu apoyo.

Y, por último, gracias a mis amigos, la familia que uno elige. A mis amigos farmacéuticos, por haber hecho los años de carrera más amenos y por los inolvidables momentos compartidos. Y a mis amigos no farmacéuticos, por apoyarme siempre y compartir con vosotros una vida entera llena de vivencias y recuerdos.

De estos años aprendí,
que un tropezón no es una caída,
que todo vuelve en la vida,
que no hay mal que por bien no venga,
que, con voluntad y esfuerzo, todo resulta más fácil,
que lo más valioso en el mundo es, la familia y los amigos de verdad,

que no se llora a quien no te valora,
que, por más tropezón, caída u obstáculo, el objetivo es levantar la
cabeza y seguir adelante.

ABREVIATURAS



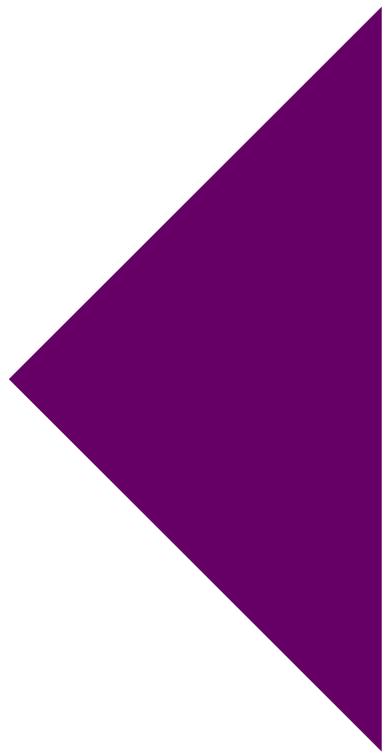
ABREVIATURAS

- τ : esfuerzo ejercido por el cilindro coaxial
- 3-MT: 3-metoxitiramina
- 3-OMD: 3-o-metildopa
- 6-OHDA: 6-hidroxidopamina
- AgNP: nanopartículas de plata
- AHV: ácido homovanílico
- ATP: trifosfato de adenosina
- AuNP: nanopartículas de oro
- A- β : beta-amiloide
- BHE: barrera hematoencefálica
- COMT: catecol-O-metiltransferasa
- COX-2: ciclooxigenasa 2
- Da: dopamina
- DJ-1: gen DJ-1
- DLS: en inglés, dispersión dinámica de la luz
- DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- EA: enfermedad de Alzheimer
- EB: Evans Blue
- EBA: Evans Blue albúmina
- ECP: Estímulo Cerebral Profundo
- EH: enfermedad de Huntington
- ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica
- EM: Esclerosis Múltiple
- EMA: Agencia Europea del Medicamento
- EP: enfermedad de Parkinson
- FDA: en inglés, Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU.
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- GRAS: en inglés, sustancias reconocidas como seguras
- HTT: gen de la huntingtina

- IL-1 β : interleucina 1 β
- INF- γ : interferón gamma
- iNOS: óxido nítrico sintasa
- JCR: Journal Citation Reports
- LBs: en inglés, cuerpos de Lewis
- L-DOPA: levodopa
- Liof-NPs-Gel: gel con nanopartículas liofilizadas
- LPS: lipopolisacárido
- LRRK2: quinasa 2 rica en leucina
- MAO- β : monoaminoxidasa β
- MPP: 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
- MPTP: 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
- MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
- NaF: sodium fluoresceína
- NAPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NE: nanoemulsión
- NFT: proteína tau hiperfosforilada
- NLC: en inglés, nanotransportadores lipídicos
- NO: óxido nítrico
- NP: nanopartícula
- NPs-Gel: gel con nanopartículas
- NTA: en inglés, análisis de seguimiento de nanopartículas
- PARK: gen PARK
- PCL: policaprolactona
- PdI: índice de polidispersión
- PEG: polietilenglicol
- PG: prostaglandina
- PINK: gen PINK
- PLA: ácido poliláctico
- PLGA: polímero de ácido láctico y glicólico
- QC: quimiocinas
- QD: quantum dots
- RLO: radicales libres de oxígeno

- Sac-Liof-NPs-Gel: gel con nanopartículas liofilizadas y sacarosa
- SAXS: en inglés, dispersión de rayos X de ángulo pequeño
- SEM: en inglés, microscopía electrónica de barrido
- SLNP: en inglés, nanopartículas lipídicas sólidas
- SLS: en inglés, dispersión estática de la luz
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNpc sustancia negra *pars compacta*
- SOD: superóxido dismutasa
- SRE: sistema reticuloendotelial
- TEM: en inglés, microscopía electrónica de transmisión
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
- $\dot{\gamma}$: velocidad de deformación del cilindro coaxial
- η : viscosidad

RESUMEN



RESUMEN

La nanotecnología es una ciencia que se encuentra en auge en la actualidad. Son muy diversos los campos en los que encuentra aplicación, entre los que destaca la medicina, donde podemos encontrar nanopartículas en productos sanitarios o en medicamentos. Ya es una realidad la comercialización de medicamentos basados en nanopartículas, y tanto la FDA como la EMA cuentan con un arsenal cada día mayor de este tipo de medicamentos.

Las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de nuevas terapias para aquellas enfermedades en las que todavía no existe una solución, pero también la mejora de las terapias para enfermedades que todavía no son eficaces en su totalidad. Este es el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas, en concreto, de la enfermedad de Parkinson. Las terapias disponibles solamente retrasan el avance de la enfermedad, pero no ofrecen una revocación completa de la enfermedad. En muchos de los casos es debido a que las terapias ofrecidas tienen la limitación de que no consiguen atravesar la barrera hematoencefálica y hacerse disponibles en el tejido nervioso. Se han propuesto distintas estructuras nanométricas potencialmente útiles para el tratamiento de esta enfermedad aplicando diversas estrategias, aunque con un objetivo común, servir de transporte de los fármacos al lugar afectado, mejorando así la biodisponibilidad en el lugar de acción. No obstante, ninguna ha llegado a tener éxito y comercializarse.

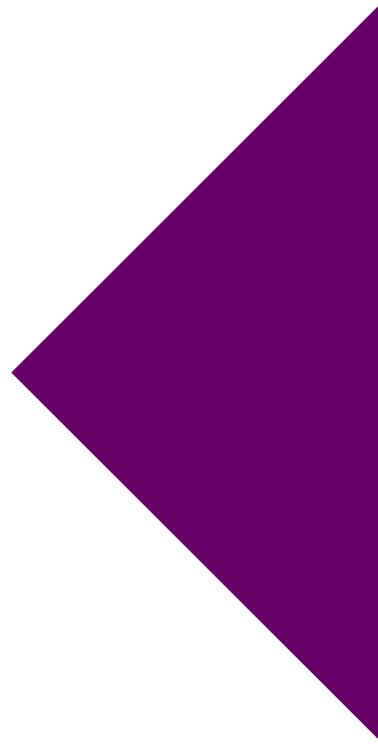
Debido a estas limitaciones, se ha recurrido a la búsqueda de nanopartículas como terapia efectiva para el depósito de sustancias

activas en el Sistema Nervioso Central. En concreto, las nanopartículas lipídicas sólidas, son las que presentan las mejores propiedades en cuanto a liposolubilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, etc. Para demostrar su potencial, se ha realizado una completa caracterización de las mismas, así como la optimización de su conservación al someterlas a procesos como la liofilización. Además, se ha demostrado su potencial como vehículos de fármacos al cerebro al ensayarlas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

A pesar de su demostrado acceso al Sistema Nervioso Central, se pretende optimizar aún más la administración de este tipo de estructuras. Para ello, la administración de fármacos por vía intranasal está adquiriendo una gran relevancia como terapia no invasiva para que los fármacos lleguen al cerebro. Es un tipo de vía que se caracteriza por ser de fácil acceso, ampliamente vascularizada y altamente permeable. Presenta una gran superficie que le confiere una elevada permeabilidad a la mucosa nasal, permitiendo una rápida absorción de las moléculas e inicio del efecto terapéutico.

Se considera que todo el trabajo motivo de esta Tesis Doctoral nos permite poder afirmar que se pueden conseguir nanopartículas con dopamina encapsulada que podrían ser eficaces en el tratamiento del Parkinson. Sin duda, será necesario realizar más estudios que corroboren todos estos datos para que, en un futuro, se pueda disponer de un medicamento elaborado con nanopartículas y dopamina que llegue de forma efectiva al cerebro.

ÍNDICE



ÍNDICE

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

CAPÍTULO I: NANOTECNOLOGÍA

1. Nanociencia
2. Nanomateriales
 - 2.1. Nanomateriales poliméricos
 - 2.2. Nanomateriales no poliméricos
 - 2.3. Nanomateriales basados en lípidos
3. Nanopartículas
 - 3.1. Tipos de nanopartículas
 - 3.1.1. Nanopartículas poliméricas
 - 3.1.2. Nanopartículas no poliméricas
 - 3.1.3. Nanopartículas basadas en lípidos
 - 3.2. Caracterización
 - 3.2.1. Tamaño
 - 3.2.2. Morfología
 - 3.2.3. Carga superficial
 - 3.3. Métodos de elaboración
 - 3.3.1. Emulsificación y evaporación del disolvente
 - 3.3.2. Emulsificación y difusión del disolvente
 - 3.3.3. Salting out
 - 3.3.4. Nanoprecipitación
 - 3.3.5. Emulsión-Polimerización
 - 3.3.6. Fusión-emulsificación
 - 3.3.7. Liposomas por hidratación de películas lipídicas

- 3.4. Aplicaciones
 - 3.4.1. Aplicaciones terapéuticas
 - 3.4.2. Aplicaciones en diagnóstico
 - 3.4.3. Aplicaciones teranósticas
- 4. Nanomedicinas comercializadas
- 5. Improvement of mesoporous silica nanoparticles: A new approach in the administration of NSAIDS

CAPÍTULO II: ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

- 1. Enfermedades neurodegenerativas
 - 1.1. Enfermedad de Alzheimer
 - 1.2. Enfermedad de Parkinson
 - 1.3. Esclerosis múltiple
 - 1.4. Esclerosis Lateral Amiotrófica
 - 1.5. Enfermedad de Huntington
- 2. Enfermedad de Parkinson
 - 2.1. Concepto y epidemiología
 - 2.2. Fisiopatología
 - 2.3. Tratamiento
- 3. Barrera hematoencefálica
 - 3.1. Localización y composición
 - 3.2. Función fisiológica
- 4. Mecanismos de transporte de moléculas al SNC
- 5. Estrategias de mejora en la administración de fármacos al SNC
- 6. Modelos de estudio de la BBB *in vitro*
- 7. Administración de nanopartículas *in vivo*

8. Modelos animales en la enfermedad de Parkinson
 - 8.1. Modelos genéticos
 - 8.2. Modelos basados en toxinas
9. Detección de las nanopartículas *in vivo* e *in vitro*
 - 9.1. Análisis por microscopía confocal
 - 9.2. Análisis por microscopía de fluorescencia
 - 9.3. Análisis citofluorimétrico
10. Lipid nanoparticles for the transport of drugs like dopamine through the blood-brain barrier

CAPÍTULO III: VÍA NASAL

1. Introducción
 - 1.1. Anatomía y fisiología nasal
 - 1.2. Mecanismo de transporte de fármacos por vía intranasal
 - 1.3. Administración intranasal de fármacos hacia el SNC
 - 1.3.1. Vías de transporte nose-to-brain
 - 1.3.2. Factores que afectan a la administración intranasal
 - 1.3.3. Optimización de nanopartículas para su administración en la cavidad nasal
2. Material y métodos
 - 2.1. Materiales
 - 2.2. Métodos
 - 2.2.1. Preparación del gel termosensible *in situ*
 - 2.2.2. Ensayo gelificación *in situ*
 - 2.2.3. Medición de las propiedades reológicas
 - 2.2.4. Biodistribución
3. Resultados y discusión

- 3.1. Preparación del gel termosensible *in situ*
- 3.2. Ensayo gelificación *in situ*
- 3.3. Medición de las propiedades reológicas
- 3.4. Biodistribución

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

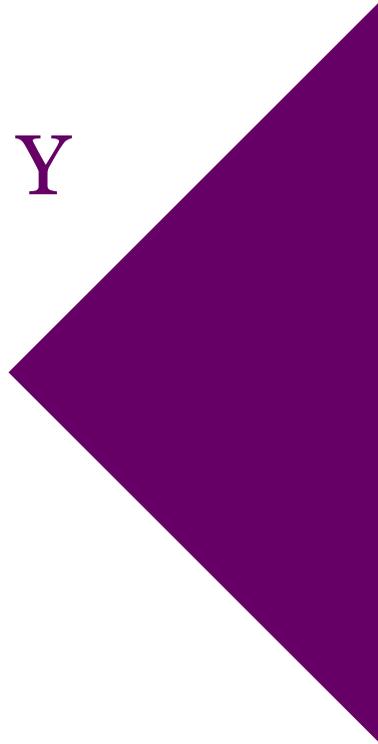
ANEXOS

Anexo 1: Design and development of a facial Serum with *Lactobacillus fermentum* CECT 5716

Anexo 2: Silica Nanoparticles: Preparation, Characterization and Applications in Biomedicine

Anexo 3: Bilayer melatonin tablet formulation: a novel approach to therapeutic efficacy

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



Antecedentes

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la población mundial después de la enfermedad del Alzheimer. Afecta sobre todo a personas mayores de 65 años y es más frecuente en hombres que mujeres. Se caracteriza por una pérdida neuronal de la sustancia negra lo que supone una denervación dopaminérgica del cuerpo estriado (Badanjak et al., 2021a). Esta degeneración se acompaña con la formación de cuerpos de Lewys. Estos cuerpos contienen varias proteínas entre las que se incluyen la α -sinucleína y la ubiquitina, que deterioran el funcionamiento óptimo de las neuronas. La dopamina es una catecolamina que funciona como neurotransmisor, fundamentalmente, a nivel del SNC. Actúa como simpaticomimético, estimulando al sistema nervioso simpático y produciendo entre otros efectos taquicardia, vasoconstricción e incremento de la presión arterial. Atendiendo a esto, la pérdida de dopamina va a producir un deterioro en el movimiento motor, asociándose con temblor, rigidez, bradiquinesia o inestabilidad postural (Jagaran & Singh, 2022).

La EP propiamente dicha es de etiología desconocida y tiene un carácter progresivo e irreversible. Aunque se piensa que factores genéticos y ambientales son los causantes, el envejecimiento neuronal o apoptosis, el estrés oxidativo y un marcado mecanismo de neuroinflamación se convierten en las causas principales que llevan a la aparición y progresión de la enfermedad.

Hipótesis y justificación

El tratamiento de la enfermedad de Parkinson está muy limitado ya que no todos los fármacos son capaces de atravesar la BHE, una barrera que actúa como primera línea de defensa para que no lleguen sustancias extrañas al cerebro, un órgano muy delicado y vulnerable. Por esta razón, muchos fármacos empleados en tratamientos de enfermedades cerebrales son ineficaces ya que no consiguen llegar a su lugar de acción o provocan síntomas extrapiramidales, como en el caso del Parkinson.

Gracias a la investigación en el campo de la nanotecnología, se ha observado que hay ciertos nanomateriales cuyas propiedades hacen que sí sean capaces de atravesarla, actuando como vehículos para los fármacos y mejorando así la eficacia terapéutica y la biodisponibilidad de la medicación (Kataria & Shende, 2022). En concreto, el diseño de sistemas de administración de fármacos capaces de actuar en la enfermedad de Parkinson ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Se han propuesto distintas estructuras nanométricas potencialmente útiles para el tratamiento de esta enfermedad aplicando diversas estrategias, aunque con un objetivo común, servir de transporte de los fármacos al lugar afectado, mejorando así la biodisponibilidad en el lugar de acción. No obstante, ninguna ha llegado a tener éxito y comercializarse.

Por otro lado, la administración de fármacos por vía intranasal está adquiriendo una gran relevancia como terapia no invasiva para que los fármacos lleguen al cerebro. Es un tipo de vía que se caracteriza por ser de fácil acceso, ampliamente vascularizada y altamente permeable (Costa, Barreiro, et al., 2021a). Presenta una gran superficie que le

confiere una elevada permeabilidad a la mucosa nasal, permitiendo una rápida absorción de las moléculas e inicio del efecto terapéutico. Se ha demostrado que la administración de moléculas de pequeño y mediano tamaño por esta vía son capaces de eludir la BHE accediendo a través de los nervios olfatorio y trigémino, al ser el neuroepitelio olfatorio la única región del SNC que no está protegido por la BHE.

Se justifica así el objetivo global de la presente Tesis Doctoral que va dirigida a la obtención de una nanoplataforma que pueda ser administrada por vía nasal; en la que se posibilite el acceso al SNC de un fármaco específico en el tratamiento del Parkinson, ofreciendo de esta manera alternativas en la terapia del Parkinson además de conseguir aumentar la efectividad, minimizar efectos adversos, facilitar el cumplimiento del paciente, y todo ello con la finalidad de conseguir una mejora del Sistema Nacional de Salud.

Objetivos

El objetivo principal que se persigue en esta Tesis Doctoral consiste en desarrollar nanosistemas transportadores de fármacos para que se consiga una vectorización de estos hasta el Sistema Nervioso Central.

Con la intención de conseguir este propósito se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Realizar una completa revisión bibliográfica sobre la nanotecnología con aplicación biomédica.

Objetivo 2: Realizar un estudio sobre los diferentes tipos de nanopartículas con el fin de seleccionar las más adecuadas a los fines propuestos.

Objetivo 3: Diseñar y elaborar nanopartículas reproducibles con su posterior caracterización en cuanto a tamaño, estructura, índice de polidispersión, propiedades eléctricas y termodinámicas y estabilidad coloidal durante su almacenamiento y conservación.

Objetivo 4: Seleccionar el fármaco de acuerdo con los fines propuestos valorando el activo, seleccionando un método robusto y preciso para su determinación.

Objetivo 5: Determinar la encapsulación del fármaco en las nanopartículas sintetizadas y analizar las posibles modificaciones que haya podido ejercer el activo. Se estudiará la cinética seguida por el fármaco al liberarse en condiciones fisiológicas plasmáticas y nasales.

Objetivo 6: Mejorar las condiciones de conservación de las nanopartículas sintetizadas mediante técnicas como la liofilización.

Objetivo 7: Evaluar la biocompatibilidad de las nanopartículas diseñadas en base a la determinación de la viabilidad celular *in vitro*.

Objetivo 8: Evaluar la capacidad de penetración de las nanopartículas sintetizadas en modelos de barrera hematoencefálica *in vitro*.

Objetivo 9: Estudiar la capacidad de penetración de las nanopartículas sintetizadas en ensayos *in vivo*.

Objetivo 10: Diseñar una formulación adecuada para su administración a través de la vía nasal.

Planificación

Los métodos de preparación de las nanopartículas son muy numerosos pudiendo agruparlos en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero ya formado. La elección del método de preparación depende, fundamentalmente, de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad del principio activo que se desea incorporar. Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas para el principio activo son sustanciales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica (Selmani et al., 2022a). De estas consideraciones es evidente que la formulación y método de preparación a utilizar requiera una definición inicial precisa de las necesidades y objetivos que se desean alcanzar.

Por tanto, esta Tesis Doctoral se ha realizado siguiendo los siguientes pasos:

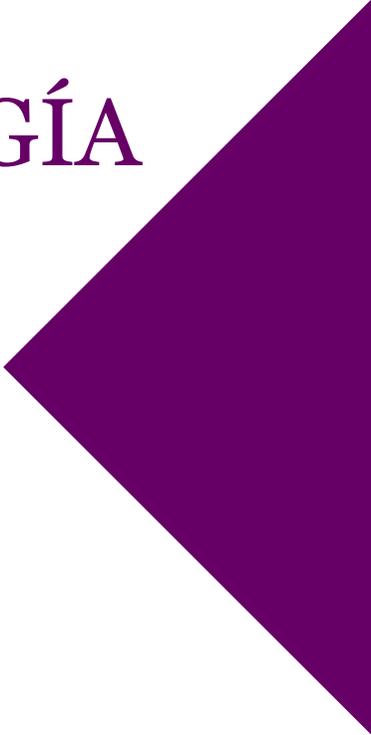
1. Revisión bibliográfica de la nanotecnología, desde los nanomateriales en general y su aplicación en el campo de la medicina, así como lo referente a las nanopartículas en cuanto a sus métodos de fabricación y caracterización.
2. Diseño, elaboración y optimización de nanopartículas, utilizando distintas técnicas y materiales.

3. Estudio tecnológico y caracterización de las nanopartículas resultantes de los diferentes métodos de síntesis propuestos.
 - 3.1. Determinación del tamaño e índice de polidispersión.
 - 3.2. Determinación de la carga superficial y evaluación de la influencia del pH y la fuerza iónica sobre el potencial zeta.
 - 3.3. Determinación de la superficie específica cuando sea posible.
 - 3.4. Estudio microscópico mediante TEM y SEM.
 - 3.5. Determinación de la estabilidad durante su conservación a diferentes condiciones de temperatura.
4. Valoración de los principios activos seleccionados.
 - 4.1. Determinación de un método preciso y robusto para su detección.
 - 4.2. Estudios de estabilidad de éstos en diferentes condiciones de temperatura y luminosidad.
5. Encapsulación de los principios activos seleccionados.
 - 5.1. Determinar su eficiencia de encapsulación y su eficiencia de carga en las nanopartículas.
 - 5.2. Caracterización de las nanopartículas con los fármacos encapsulados.
6. Liberación de los fármacos desde los nanotransportadores y estudio de las cinéticas de liberación.
7. Determinación de la toxicidad de las nanopartículas en cultivos celulares *in vitro* mediante la técnica de MTT.

8. Evaluación de la capacidad de paso de los nanotransportadores a través de un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* en monocultivo.
9. Valoración por microscopía confocal de la llegada de las nanopartículas al cerebro de ratas en ensayos *in vivo*.
10. Diseño de una formulación mucoadhesiva de gelificación *in situ* para la administración nasal.

Todo este trabajo se ha realizado fundamentalmente en el Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica gracias al grupo de investigación Farmacia Práctica (CTS-205) con la ayuda de una beca para la Formación del Personal Universitario (FPU18/00446) del Ministerio de Educación. Además, se ha contado con la colaboración indispensable del Servicio de instrumentación científica de la UGR; con el Dpto. de Biología molecular de la Universidad de Jaén a través del proyecto BFU2016 80316 R correspondiente al programa estatal de investigación, desarrollo e innovación orientada a los retos de la sociedad, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad, que nos han clarificado muchas cuestiones sobre el estudio *in vivo*; y con Elena González Rey del Centro de Parasitología y Biomedicina López Neyra- CSIC, que ha facilitado el trabajo realizado con el cultivo de células y los animales de laboratorio.

CAPÍTULO I: NANOTECNOLOGÍA



El prefijo 'nano' se refiere a un prefijo latino, “nanus”, que significa 'enano' o 'algo muy pequeño' y representa la mil millonésima parte de un metro (10^{-9}m).

A modo de comparación, cabe resaltar que un glóbulo rojo mide aproximadamente $9\ \mu\text{m}$ ($9000\ \text{nm}$) y un cabello humano mide $60\ \mu\text{m}$ ($60.000\ \text{nm}$); mientras que la doble hélice del ADN mide de radio $1\ \text{nm}$.

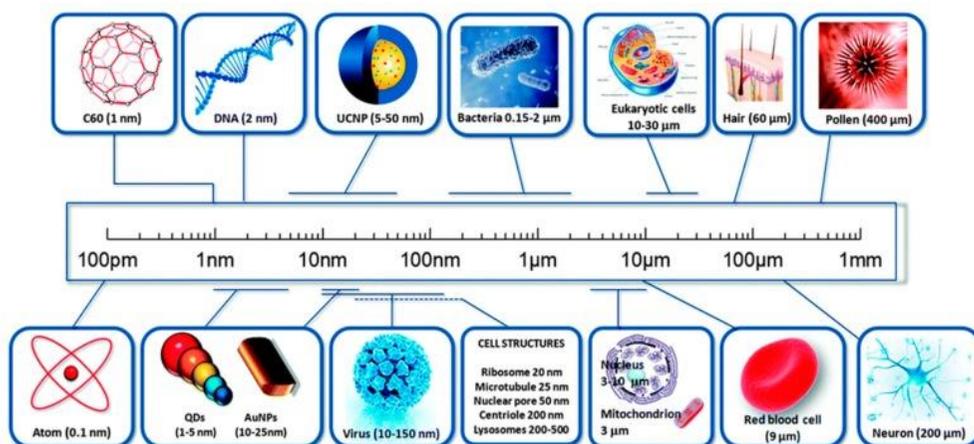


Figura 1: Representación de distintos nanomateriales (Bayda et al., 2019)

1. NANOCIENCIA

La nanociencia es la rama del saber que estudia los fenómenos, las propiedades y la manipulación de la materia a una escala nanométrica; en definitiva, todo lo relacionado al comportamiento y la manipulación de los átomos, de las moléculas y de las macromoléculas las cuales van a manifestar propiedades diferentes a la de los materiales de mayores dimensiones.

El desarrollo de la nanociencia se remonta a la época de los griegos y Demócrito en el siglo V a.C., cuando los científicos propusieron dos planteamientos. En primer lugar, se decía que la materia es continua, y por lo tanto infinitamente divisible a piezas más pequeñas; y en segundo lugar que la materia está compuesta de pequeñas partículas indivisibles e indestructibles, que los científicos llaman ahora átomos (Bayda et al., 2019).

Debemos distinguir entre nanociencia y nanotecnología. La nanociencia es una convergencia de la física, la ciencia de los materiales y la biología, que se ocupan de la manipulación de materiales a escalas moleculares; mientras que la nanotecnología es la capacidad de convertir la teoría de la nanociencia en aplicaciones útiles mediante la observación, medición, manipulación, ensamblaje, control y fabricación de la materia a escala nanométrica. La National Nanotechnology Initiative (NNI, Iniciativa Nanotecnológica Nacional) en los Estados Unidos define la nanotecnología como (*National Nanotechnology Initiative (NNI)*., n.d.):

"una ciencia, ingeniería, y tecnología realizada a nanoescala, donde fenómenos únicos permiten aplicaciones en una amplia gama de campos, desde la química, la física y la biología, a la medicina, la ingeniería y electrónica".

La nanotecnología implica dos condiciones fundamentales según esta definición. En primer lugar, se trata de una cuestión de escala, ya que se enfoca en el aprovechamiento de estructuras a nivel nanométrico al controlar su forma y tamaño. El segundo aspecto está relacionado con

la innovación: la nanotecnología debe abordar objetos pequeños de una manera que aproveche ciertas propiedades debido a la nanoescala.

2. NANOMATERIALES

Los nanomateriales han existido en la naturaleza desde tiempos mucho anteriores a que los científicos pudieran siquiera imaginarlos. Sin embargo, la historia científica detrás de la nanotecnología y los nanomateriales es relativamente breve.

Para poder manipular la materia a una escala tan diminuta, ha sido necesario fusionar conocimientos provenientes de diversos campos, como la física, la química, la biología y la ciencia de materiales.

Nuestro planeta es una fuente importante de nanomateriales naturales. Los volcanes, los incendios forestales, las tormentas de polvo y la espuma del mar son procesos naturales que crean nanomateriales. Las plantas, los insectos e, incluso, las personas, también contienen muchas nanoestructuras. Por ejemplo, las hojas de la flor de loto se limpian por sí solas y repelen el agua gracias a sus nanoestructuras. Nuestros huesos también están formados por minerales nanoestructurados. Incluso el elemento esencial de nuestras vidas, nuestro ADN, es un nanomaterial. Los nanomateriales también se encuentran en el universo, como en el polvo cósmico y el polvo lunar. Además, se han descubierto en meteoritos que han alcanzado la Tierra (Dai et al., 2002).

En 1959, el físico Richard Feynman sentó las bases de la revolución de los nanomateriales al sugerir la posibilidad de manipular la materia a nivel de átomos individuales. Presentó al mundo dos desafíos. El primero era construir un motor eléctrico diminuto, de solo 1/64 pulgadas cúbicas y que fuese funcional, y el segundo era replicar la página de un libro a una escala de 1/25000, suficiente para incluir toda la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler. Fueron necesarios 26 años para superar ambos desafíos, pero este experimento mental sirvió de inspiración para el desarrollo de un campo científico completamente nuevo. Desde entonces, se han producido varios adelantos científicos que han dado lugar a la publicación de incontables artículos científicos, la comercialización de numerosos productos y la concesión de tres Premios Nobel por el trabajo en nanociencia y nanotecnología, el último en 2016.

El desarrollo de una ciencia o tecnología nueva conlleva tanto promesas como riesgos para la sociedad. Es responsabilidad de la sociedad en su conjunto, incluyendo a los ciudadanos, científicos, administraciones y empresas, alcanzar un consenso sobre la mejor manera de desarrollar dichas tecnologías, asegurando al mismo tiempo la minimización de los riesgos tanto para las personas como para el medio ambiente.

Concretando, la **NANOMEDICINA** es un área emergente que utiliza tecnologías y técnicas de la nanotecnología para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades. Su enfoque radica en el diseño y desarrollo de materiales y dispositivos a escala nanométrica

capaces de interactuar con sistemas biológicos a nivel celular y molecular.

La nanomedicina ofrece la posibilidad de abordar enfermedades de manera más precisa y eficiente, ya que los nanomateriales pueden tener propiedades únicas que los hacen adecuados para su uso en medicina. Su objetivo es utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades y traumatismos, aliviar el dolor, preservar y mejorar la salud humana, utilizando herramientas y conocimientos moleculares del cuerpo humano (Kim et al., 2010). Estos materiales pueden ser diseñados para liberar fármacos de manera controlada, mejorar la administración de medicamentos, diagnosticar enfermedades de forma temprana y mejorar la visualización de estructuras biológicas.

Algunas aplicaciones de la nanomedicina incluyen:

1. Liberación controlada de fármacos: Los nanomateriales pueden encapsular fármacos y liberarlos de manera controlada, lo que permite una administración más precisa y efectiva de los medicamentos.
2. Terapia génica: La nanomedicina se utiliza para entregar material genético a células específicas, lo que permite la corrección de genes defectuosos y el tratamiento de enfermedades genéticas.
3. Diagnóstico: Los nanomateriales pueden actuar como agentes de contraste en técnicas de imagen, como resonancia magnética y

tomografía por emisión de positrones, mejorando la detección y visualización de estructuras biológicas.

4. Detección y diagnóstico temprano de enfermedades: Los nanosensores y nanomateriales pueden detectar biomarcadores específicos en muestras biológicas, lo que permite un diagnóstico temprano y preciso de enfermedades como el cáncer.

5. Ingeniería de tejidos: Los nanomateriales pueden ser utilizados para crear soportes tridimensionales a escala nanométrica que imitan la estructura y función de los tejidos biológicos, lo que facilita la regeneración de tejidos y la creación de órganos artificiales.

A pesar de que la nanomedicina posee un gran potencial, aún existen desafíos tanto técnicos como regulatorios que deben ser abordados para asegurar su seguridad y eficacia. No obstante, se anticipa que en el futuro la nanomedicina desempeñará un papel fundamental en el progreso de la medicina y el tratamiento de diversas enfermedades.

Esta rama de la nanotecnología se puede clasificar en dos categorías: nanodispositivos y nanomateriales. Los nanodispositivos son dispositivos en miniatura a nanoescala, incluyendo microarrays (biochips) y algunas máquinas inteligentes como respirocetes (nanomáquina capaz de comportarse como un glóbulo rojo en humanos). Por otra parte, los nanomateriales contienen partículas menores a 1000 nm (Banik et al., 2016). El crecimiento exponencial y el creciente interés de la nanotecnología se han mejorado gracias a la capacidad de obtener imágenes de nanomateriales utilizando técnicas

con capacidades de resolución atómica, como microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión, entre otras (Najahi-Missaoui et al., 2021).

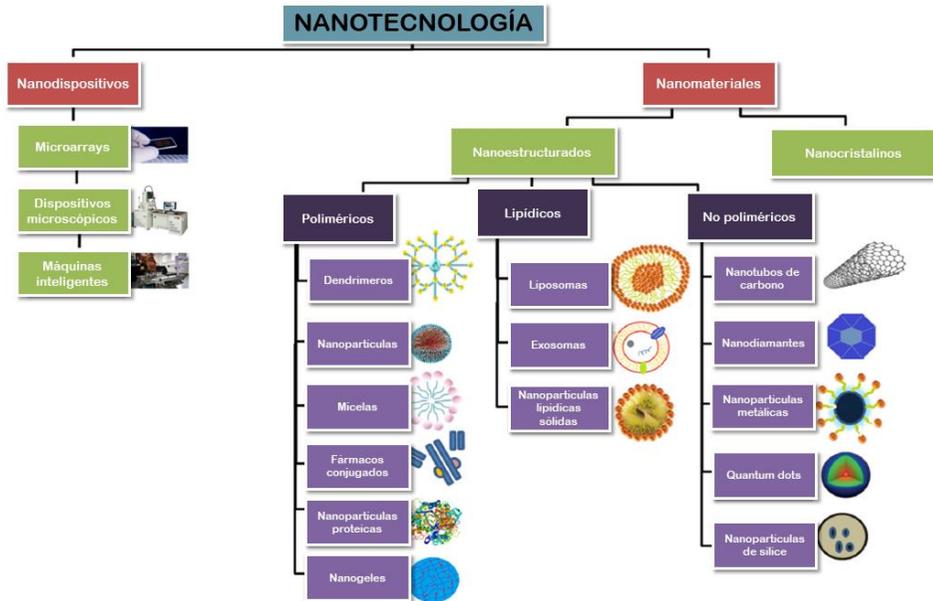


Figura 2: Clasificaciones de productos nanotecnológicos (Modificado de Yetisgin et al., 2020).

Como se observa en la figura 2, dentro de la categoría de nanomateriales, se encuentran los nanoestructurados, los cuales se dividen principalmente en tres grupos: los nanomateriales poliméricos, los no poliméricos o los formados por lípidos. Dentro de todos ellos, solamente vamos a comentar aquellos más relevantes debido a su aplicación ya sea en terapia o en diagnóstico.

Los nanomateriales presentan diversas propiedades que varían según su tamaño y funcionalidad superficial. Su reducido tamaño y amplia

superficie los convierten en herramientas ampliamente utilizadas en áreas como cosmética, electrónica, diagnóstico médico y aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, su aplicabilidad clínica depende de varios parámetros, tales como sus propiedades físicas y químicas, su eficiencia para cargar fármacos, su capacidad para liberarlos y, lo más importante, su baja o nula toxicidad como transportadores en sí mismos (Najahi-Missaoui et al., 2021). A continuación, veremos que propiedades aportan cada uno de estos nanomateriales. De esta clasificación se han excluido las nanopartículas ya que se ha dedicado un apartado más adelante exclusivo para ellas.

2.1. Nanomateriales poliméricos

a. Dendrimeros: son polímeros ampliamente empleados en aplicaciones clínicas debido a su alta ramificación, estructura compartimentada y uniformidad de tamaño. El control del número de ramas en estas nanopartículas poliméricas permite su fabricación en dimensiones muy pequeñas, en el rango de 1 a 5 nm. Estos dendrimeros pueden ser sintetizados mediante polimerización esférica, lo que resulta en la formación de cavidades dentro de su estructura molecular. Además, los dendrimeros presentan un extremo libre con grupos funcionales, los cuales pueden ser fácilmente modificados o utilizados para la conjugación de compuestos biocompatibles. Esto contribuye a mejorar la baja citotoxicidad y la alta biopermeabilidad de la molécula dendrimerica. Dichas modificaciones en la superficie también pueden ser aplicadas para mejorar la administración específica de agentes

terapéuticos. En la actualidad, se utilizan mono o copolímeros, como polietilenimina, poliamidoamina, poli(propilenimina), quitina, entre otros, para desarrollar dendrímeros con fines terapéuticos. Estos dendrímeros modificados ofrecen nuevas posibilidades en el campo de la medicina (Chauhan, 2018).

b. Micelas: Las micelas poliméricas se emplean principalmente en la administración sistémica de agentes terapéuticos que son insolubles en agua. Estas micelas tienen un tamaño inferior a 100 nm y se forman mediante autoensamblaje cuando se encuentran en un entorno acuoso, debido a su naturaleza anfifílica. En su estructura, se organizan formando esferas en las cuales los grupos hidrofílicos se sitúan en la superficie externa, mientras que las colas hidrofóbicas se encuentran en el interior, formando un núcleo lipofílico. La presencia de una superficie hidrófila en las micelas poliméricas contribuye a su protección contra la captación inespecífica por parte del sistema reticuloendotelial (SRE), lo que garantiza su alta estabilidad dentro del organismo (Reichmuth et al., 2016). Por otro lado, el núcleo hidrófobo de estas micelas permite la captura física de agentes terapéuticos hidrofóbicos insolubles en agua. En consecuencia, la estructura dinámica de las micelas poliméricas ofrece un sistema de administración destacado para los agentes terapéuticos, que permite una capacidad de carga versátil, la conjugación de ligandos dirigidos y una menor tasa de disolución (Li & Szoka, 2007).

c. Nanogeles: Los geles son estructuras coloidales o poliméricas no fluidas que experimentan hinchamiento al entrar en contacto con un

líquido. Los nanogeles son partículas de gel con propiedades similares, pero con un diámetro inferior a 100 nm, según la definición de la IUPAC (Alemán et al., 2007). Estos nanogeles se forman mediante la reticulación física o química de polímeros naturales o sintéticos, lo que les confiere la capacidad de hincharse y retener un alto contenido de agua. Los nanogeles presentan varias ventajas en comparación con otros sistemas de transporte a nivel nanométrico, incluyendo la reducción de la pérdida precoz de fármacos, la posibilidad de encapsular múltiples moléculas terapéuticas en una sola formulación y la facilidad de administración a través de vías parenterales o mucosas. Los nanogeles se emplean en una amplia gama de aplicaciones, que incluyen biosensores, separación bioquímica, cultivo celular, biocatálisis, administración de fármacos, terapia antitumoral, entre otras. Entre estas aplicaciones, la administración de terapias como ácidos nucleicos, vacunas, citoquinas y vacunas nasales ha sido ampliamente estudiada en el contexto de los nanogeles (Neamtu et al., 2017; Sharma et al., 2016).

2.2. Nanomateriales no poliméricos

a. Nanotubos de carbono: Los nanotubos de carbono son estructuras tubulares compuestas de carbono, con un diámetro de aproximadamente 1 nm y una longitud que varía de 1 a 100 nm. Estas estructuras se forman al enrollar una capa única de grafito, conocida como grafeno, en un cilindro sin costuras. Los nanotubos de carbono pueden clasificarse en nanotubos de pared única, nanotubos de pared

múltiple y fullerenos C₆₀, dependiendo de su configuración. Gracias a su tamaño y forma geométrica definida, los nanotubos de carbono son muy útiles como vehículos no poliméricos para agentes terapéuticos. Principalmente acceden al interior de la célula mediante endocitosis. Entre las principales ventajas de su aplicación en terapia, se destaca su capacidad para administrar fármacos como antibióticos, agentes antivirales y agentes anticancerígenos. Además, los nanotubos de carbono pueden proteger contra el daño mitocondrial al proporcionar radicales libres (Rode et al., 2018).

b. Quantum dots (QD): Los puntos cuánticos, también conocidos como nanocristales semiconductores, son nanopartículas con propiedades ópticas y electrónicas únicas, como una fluorescencia brillante e intensa. Estos QD han despertado un gran interés debido a que la mayoría de los colorantes de etiquetas orgánicas convencionales no son capaces de emitir en el infrarrojo cercano (>650 nm). Los QD, por otro lado, ofrecen propiedades ópticas ajustables, lo que los hace altamente atractivos. Los QD presentan características como una buena estabilidad química y fotoestabilidad, un alto rendimiento cuántico y una emisión de luz que se puede ajustar según su tamaño. Esto ha generado un creciente interés en el desarrollo de plataformas nanoteranósticas para la detección y terapia simultánea. Los QD muestran un gran potencial en estas aplicaciones, y ya se han publicado resultados prometedores en campos como sensores, administración de medicamentos e imágenes biomédicas (Matea et al., 2017).

2.3. Nanomateriales lipídicos

Los nanomateriales lipídicos son estructuras nanoescala compuestas principalmente por lípidos, que se utilizan en diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Estos materiales ofrecen ventajas importantes debido a su capacidad para encapsular y entregar de manera eficiente fármacos y moléculas bioactivas. Destacan algunas ventajas como su biocompatibilidad, capacidad de carga de fármacos, estabilidad y facilidad de modificación de sus propiedades superficiales. Estos materiales ofrecen oportunidades prometedoras para el desarrollo de terapias más eficientes y precisas en el campo de la medicina.

a. Liposomas: estas estructuras fueron descubiertas en los años 60 por el hematólogo británico Dr. Alec D. Bangham y colaboradores en el Instituto Babraham, Universidad de Cambridge, apareciendo la primera publicación en 1965 (Bangham et al., 1965). Los liposomas se definen como una estructura esférica coloidal formada por el autoensamblaje de moléculas de lípidos anfífilos en solución, como los fosfolípidos (Guimarães et al., 2021). Se pueden preparar con distinta estructura, composición, tamaño y flexibilidad con una variedad de moléculas lipídicas y una mayor modificación de la superficie. Estas características facilitan la acumulación de liposomas en sitios específicos de enfermedades, como los tumores. En estos, la capa endotelial es discontinua y la falta de un sistema linfático funcional permite que los liposomas se acumulen pasivamente debido a su efecto de permeabilidad. Además, tienen la capacidad de fusionarse con la membrana celular y liberar su contenido en el citoplasma. Dependiendo

del número de bicapas, se clasifican en tres tipos básicos: multilamelar, unilamelar pequeño y unilamelar grande. Las vesículas multilamelares consisten en varias bicapas lipídicas separadas entre sí por espacios acuosos. Estas propiedades estructurales les permiten transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Las moléculas hidrófilas pueden transportarse en el interior acuoso del liposoma, mientras que las moléculas hidrófobas pueden disolverse en la membrana lipídica. Además, se puede cargar más de un tipo de fármaco dentro de dos compartimentos (lipídico y acuoso) (M. Li et al., 2019). Esto también permite que las moléculas de fármacos diferentes se liberen progresivamente con la disociación de capas desde la capa más externa hasta el núcleo interno. Los liposomas son uno de los sistemas de administración de medicamentos más utilizados, con varias formulaciones actualmente aprobadas por la FDA en uso y muchas más en ensayos clínicos o preclínicos. Los liposomas se han utilizado para la administración de fármacos, nutracéuticos y fármacos biológicos y pueden exhibir una alta eficiencia de encapsulación y un tiempo de circulación prolongado (Kim et al., 2010).

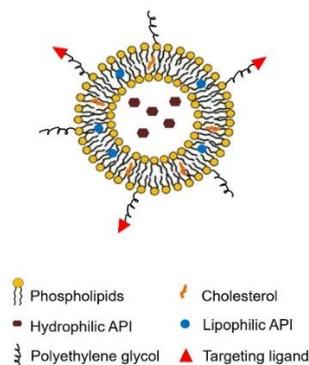


Figura 3: Estructura de los liposomas. Modificado de Fan et al., 2021.

b. Nanoemulsión (NE): se ha utilizado comúnmente en la administración de vacunas y agentes anticancerígenos. Las NEs son dispersiones coloidales que pueden usarse como portadores farmacológicos de moléculas poco solubles en agua. Generalmente se componen de nanogotas de aceite dispersas en agua o nanogotas de agua dispersas en aceite. Los surfactantes generalmente se incluyen para mejorar su estabilidad. Sin embargo, una limitación clave de estos portadores es que son termodinámicamente inestables si su tamaño supera los 500 nm, siendo las NEs en el rango de 20 a 200 nm las más estables termodinámicamente. Las NEs son adecuadas para diversas vías de administración, incluidas la parenteral, transdérmica y ocular, principalmente debido a su capacidad para proteger los fármacos encapsulados de la degradación enzimática y la hidrólisis. Las NEs, pueden modificarse conjugándolas a diferentes ligandos para unirse específicamente a células (Y. Singh et al., 2017).

3. NANOPARTÍCULAS

La definición clásica de nanopartículas (NPs) en Enciclopedia de la tecnología farmacéutica y en la enciclopedia de Nanociencia y Nanotecnología fue formulado hace 40 años (Kreuter, 2014):

“Las nanopartículas con fines farmacéuticos son partículas coloidales sólidas que varían en tamaño desde 1 a 1000 nm (1 μm) en los que el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) es disuelto, atrapado, o encapsulado, o a la que el principio activo se adsorbe o se absorbe”.

Esta definición se desvía de la definición de físicos y materiales científicos que limitan el tamaño superior de las nanopartículas a 100 nm. Sin embargo, hasta 1000 nm de tamaño parece no ser importante la influencia que tiene en relación con la captación en las células del sistema reticuloendotelial, macrófagos y las células endoteliales, y también la mayoría de las otras partes del cuerpo.

Para conocer el origen de las nanopartículas nos tenemos que remontar a los años 50 cuando Paul Ehrlich pensó que la entrega específica de los medicamentos podría mejorar en gran medida las terapias disponibles. El objetivo era dirigir al medicamento al órgano diana sin dañar los tejidos sanos (órganos no diana). Él llamó al sistema que sería utilizado en este tipo de terapia "Zauberkegeln", en español, "Balas Mágicas" (Barnabas, 2019; KREUTER, 2007). Con esto surge el concepto de nanopartículas y el direccionamiento de fármacos permitiendo disminuir el aclaramiento y mejorar la acumulación de medicamentos en el tejido diana, aumentando así la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios. Sin embargo, hoy en día sigue siendo un desafío para los científicos de diversos campos, incluyendo biología celular, ingeniería, química, farmacología, fisiología, medicina, etc.

Es importante señalar que las NPs muestran propiedades fisicoquímicas únicas y a menudo mejoradas en comparación con el material a de partida correspondiente. A diferencia de los materiales utilizados como reactivos, que generalmente mantienen propiedades físicas constantes independientemente de su tamaño, el tamaño de las nanopartículas influye en sus propiedades físicas y químicas. Las NPs han generado un

gran interés debido a su reducido tamaño y a su alta relación superficie-volumen, lo que les confiere una reactividad y unas propiedades químicas, electrónicas, ópticas, magnéticas y mecánicas extraordinarias. La nanotecnología se presenta como una plataforma que permite diseñar, manipular y ajustar las propiedades fisicoquímicas de las NPs, como su tamaño, forma, carga superficial e hidrofobicidad (Selmani et al., 2022b). Las propiedades fisicoquímicas de las NPs juegan un papel crucial en el organismo in vivo y determinan cual va a ser su camino. Según sus características se van a ver afectadas propiedades farmacocinéticas como la absorción o la eliminación, y otros parámetros como la internalización celular o la citotoxicidad.

Entre los objetivos de la aplicación de las nanopartículas al campo de la medicina está la de albergar al principio activo en su interior para, en definitiva, de una forma u otra mejorar su perfil farmacocinético.

Las NPs desempeñan un papel crucial al proteger el principio activo de la degradación y permitir la liberación controlada y sostenida de medicamentos. Además, las NPs presentan la capacidad para reducir el aclaramiento y mejorar la acumulación de medicamentos en tejidos diana, lo que resulta en una mayor eficacia terapéutica y una reducción de los efectos secundarios. El organismo humano cuenta con diversas barreras que deben superarse para que un medicamento alcance su destino previsto. Estas barreras incluyen el aclaramiento inmunológico, el aclaramiento renal, la degradación enzimática y mecánica, el endotelio vascular, la matriz extracelular, la membrana celular y los

lisosomas. De modo que, las propiedades de las nanopartículas se pueden optimizar para superar estos obstáculos (Wolfram et al., 2015).

3.1. Tipos de nanopartículas

Las nanopartículas las podemos clasificar en tres grandes grupos atendiendo a su naturaleza. De esta forma encontramos: nanopartículas poliméricas, nanopartículas no poliméricas y nanopartículas basadas en lípidos.

3.1.1. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas están formadas por la polimerización de un monómero que puede ser de origen natural o sintético. Las nanopartículas se pueden formar a partir del monómero o a partir del polímero preformado. Presentan características que los convierten en una opción prometedora para el transporte de fármacos. Estas características incluyen su falta de inmunogenicidad, su baja toxicidad y su capacidad de biodegradación (Wong et al., 2020).

La eficacia de administración de fármacos en nanopartículas poliméricas depende en gran medida de las propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad de los polímeros utilizados. Los polímeros biodegradables presentan ventajas significativas, ya que son completamente metabolizados y eliminados del cuerpo de manera natural. Por otro lado, aunque los polímeros naturales suelen ser biodegradables y compatibles entre sí, su uso ha estado limitado debido

a las variaciones se presentan en sus propiedades entre los distintos lotes y a su potencial ligeramente inmunogénico. Por otro lado, los polímeros sintéticos son ampliamente conocidos por su composición química controlada. Se han utilizado diversos polímeros sintéticos o naturales para la fabricación de sistemas de administración de fármacos poliméricos, como proteínas, azúcares y otras macromoléculas naturales, así como polímeros biodegradables y no biodegradables, siempre y cuando sean aceptables desde el punto de vista farmacéutico (Crucho & Barros, 2017).

En cuanto a las de tipo sintético, nos podemos encontrar NPs formadas por policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), las cuales pueden presentar fenómenos de toxicidad; es por ello por lo que se recurre a materiales de origen natural como el quitosán, la albúmina, el ácido hialurónico o el alginato con el fin de mejorar el perfil de toxicidad, así como mejorar la eficiencia de encapsulación.

Se pueden clasificar como nanocápsulas o nanoesferas en función de su composición. En nanocápsulas, una membrana de polímero encierra al fármaco en su interior, mientras que, en las nanoesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la matriz polimérica (Letchford et al., 2009). Existen numerosas técnicas de preparación de este tipo de NP lo que nos va a permitir controlar sus características, además de controlar la liberación de la sustancia activa, pero, de forma general, su estructura sólida le confiere una alta estabilidad, perfiles de liberación más sostenidos y prolongados en el tiempo y una distribución de tamaño más

uniforme (Athar & Das, 2014). Por último, la superficie de las nanopartículas poliméricas puede funcionalizarse con el objetivo de aumentar la especificidad en el tejido diana.

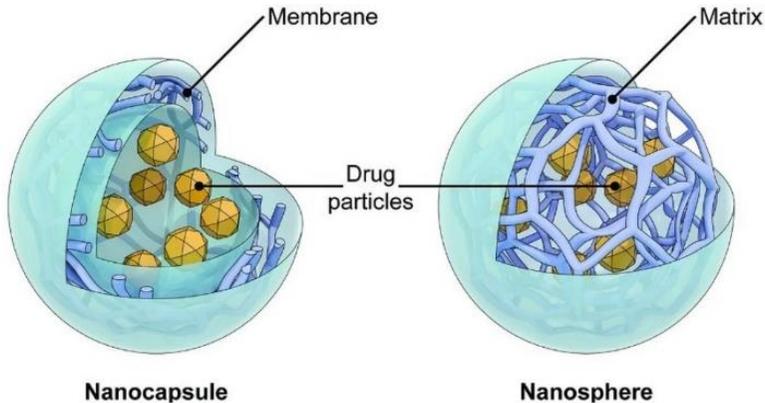


Figura 4: Esquema de nanocápsula y nanoesfera (Rambaran, 2020).

3.1.2. Nanopartículas no poliméricas

Los materiales inorgánicos, como oro, hierro y sílice, se han utilizado ampliamente para sintetizar materiales nanoestructurados en diversas aplicaciones como la administración de fármacos y el diagnóstico por imagen.

Estas nanopartículas inorgánicas se caracterizan por su precisión en la formulación y por su capacidad de ser diseñadas en una amplia variedad de tamaños, estructuras y formas.

En su mayoría, estas nanopartículas muestran una buena biocompatibilidad y estabilidad, y son útiles en aplicaciones específicas

que requieren propiedades que no pueden ser alcanzadas por los materiales orgánicos. Sin embargo, su aplicación clínica se ve limitada debido a su baja solubilidad y toxicidad, especialmente en formulaciones que involucran metales pesados.

a. Nanopartículas metálicas: Las NPs sólidas incluyen óxido de hierro, oro, plata y otras NPs a base de metales. Las NPs inorgánicas más utilizadas son las de Ag, Au (Pramanik et al., 2021), Cu, Cu₂O, Fe₃O₄, TiO₂... (Mallakpour et al., 2021).

Las NPs de óxido de hierro se producen conjugando un núcleo orgánico de magnetita (Fe₃O₄) o maghemita (Fe₂O₃) a un polímero biocompatible (García-García et al., 2020). Las NPs de óxido de hierro han tenido un gran interés en la última década, principalmente debido a sus propiedades superparamagnéticas, estas pueden dirigirse a una ubicación específica en el cuerpo mediante el uso de un campo magnético externo; además, son ampliamente utilizadas en clínica como agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética (Kyeong et al., 2021). Por último, se han utilizado en otras técnicas de diagnóstico e imagen debido a sus propiedades ópticas únicas que les permiten actuar como biosensores en células vivas.

Las nanopartículas de oro (AuNP) son nanopartículas metálicas ampliamente utilizadas. Según las condiciones de su síntesis, son capaces de presentar diversas formas: nanobarras, nanoesferas, nanoestrellas, nanocubos... (figura 5). Dependiendo de su tamaño, forma y propiedades superficiales tienen aplicación en el diagnóstico del

cáncer, la terapia y la radioterapia (J. Fan et al., 2020). Las NPs de oro incluso se pueden usar para desarrollar sistemas teranósticos donde el diagnóstico, la imagen y la terapéutica se pueden combinar para mejorar la terapia. Además, son ideales para el desarrollo de vacunas, porque estas nanopartículas se internalizan fácilmente a través de las células dendríticas y los macrófagos, lo que lleva a su activación (P. Singh et al., 2018).

Las NPs de plata (AgNP) son otra clase de NPs metálicas que han recibido cierta atención, como biosensores debido a sus propiedades ópticas y capacidad para absorber y dispersar la luz. Las NPs de plata se utilizan en gran medida en dispositivos electrónicos, textiles, apósitos para heridas, recubrimientos antimicrobianos y dispositivos biomédicos (Montes-García et al., 2021).

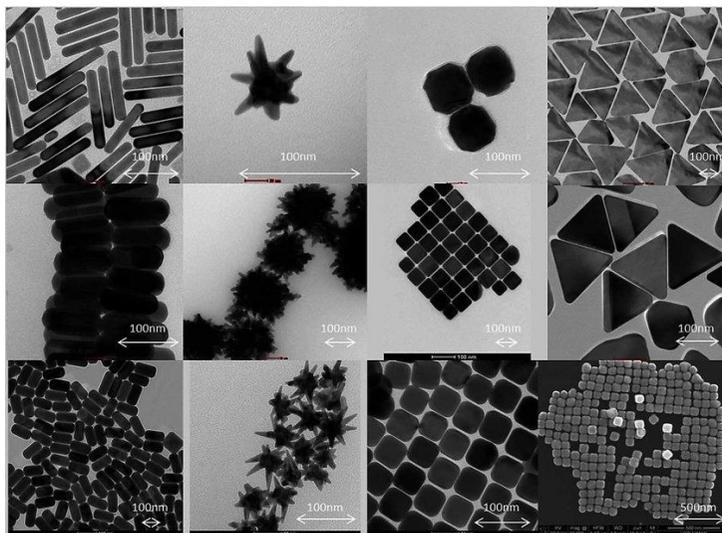


Figura 5: Imágenes al microscopio electrónico de transmisión de diferentes nanopartículas de oro (Bouloudenine & Bououdina, 2016).

b. Nanopartículas de sílice: Estas NP ofrecen ventajas considerables en nanotecnología debido a su aplicabilidad para el diseño de sistemas complejos y a su costo-efectividad. Entre ellas podemos destacar (Llinàs & Sánchez-garcía, 2014):

- Elevada área superficial ($> 1000\text{m}^2/\text{g}$) lo que permite albergar una gran cantidad de principio activo.
- Elevado volumen de poro ($> 1\text{ cm}^3/\text{g}$) con una gran porosidad y un orden elevado de poro.
- El tamaño de poro puede variar en un rango de 2-10 nm.
- Buena estabilidad química y térmica.
- Baja toxicidad y biocompatibles.
- Poseen dos superficies funcionalizables, interna y externa.
- Fácilmente modificables morfológicamente permitiendo control sobre el tamaño, la forma y los poros.
- Síntesis fácil.
- Estructura estable a altas temperaturas.

Sus características superficiales específicas, su porosidad y su capacidad de funcionalización las convierten en herramientas atractivas para la administración de fármacos. Las nanopartículas de sílice tienen una gran superficie cubierta con grupos silanol polares, que son favorables para la adsorción de agua y mejoran la estabilidad de los agentes terapéuticos. Además, las nanopartículas a base de sílice tienen la capacidad de interactuar con los ácidos nucleicos, lo que permite su uso como vehículos de entrega dirigidos. Su tamaño y densidad de los nanoporos se pueden adaptar para lograr una tasa de entrega

prolongada (Ortega et al., 2020). Los poros de las nanopartículas de sílice se pueden cubrir con varias moléculas sensibles a los estímulos para aumentar la tasa de liberación de fármacos en el tejido diana. Por ejemplo, se pueden rodear de un material que sea sensible a un cambio de pH, temperatura, la presencia de algún enzima... y solamente cuando este estímulo se lleve a cabo, se degradará el material que recubre la NP y será en ese momento cuando se empiece a liberar fármaco (Croissant et al., 2017; Jo et al., 2015; Moritz & Geszke-Moritz, 2015).

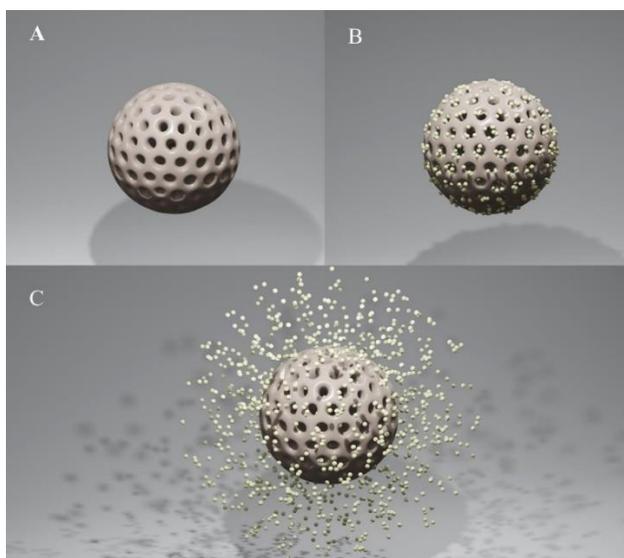


Figura 6: Representación de una nanopartícula mesoporosa de sílice cargada con la sustancia activa (Fang et al., 2023).

3.1.3. Nanopartículas basadas en lípidos

Las nanopartículas basadas en lípidos incluyen una gran variedad de estructuras, pero son más típicamente aquellos que forman

nanopartículas esféricas que comprenden al menos una bicapa lipídica que rodea un compartimento lipídico interno. Como sistema de entrega, las nanopartículas basadas en lípidos ofrecen muchas ventajas, incluida la simplicidad de la formulación, el autoensamblaje, la alta biodisponibilidad, capacidad de transportar grandes cargas útiles y una serie de propiedades fisicoquímicas que pueden ser controladas para modular sus características biológicas. Por estas razones, las NPs basadas en lípidos son la clase más común de nanomedicamentos aprobados por la FDA (Mitchell et al., 2021).

Los sistemas de administración de fármacos basados en lípidos han ganado atención en las últimas décadas debido a su biocompatibilidad en comparación con las nanopartículas poliméricas e inorgánicas, así como su capacidad para atravesar barreras fisiológicas problemáticas, como la BHE, debido a su lipofilia inherente, incluso sin modificaciones en la superficie. Además, la facilidad de preparación, el bajo costo y la posibilidad de producción a gran escala hacen que los sistemas de portadores de lípidos sean aún más atractivos.

Los nanotransportadores lipídicos se caracterizan por tener un núcleo lipídico rodeado de uno o dos emulgentes. En el caso de las nanopartículas lipídicas sólidas (Solid Lipid Nanoparticles, SLNP), este núcleo interno va a estar formado por lípidos de naturaleza sólida a temperatura ambiente y a temperatura corporal. Si ese núcleo en vez de ser sólido es líquido, en ese caso tenemos nanoemulsiones. Por último, si ese núcleo se compone de una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, tenemos los transportadores lipídicos nanoestructurados

(Nanostructured Lipid Carriers, NLC). Por tanto, van a diferir en la estructura, el estado físico y en la composición; por ende, tendrán diferentes propiedades (Aditya et al., 2014).

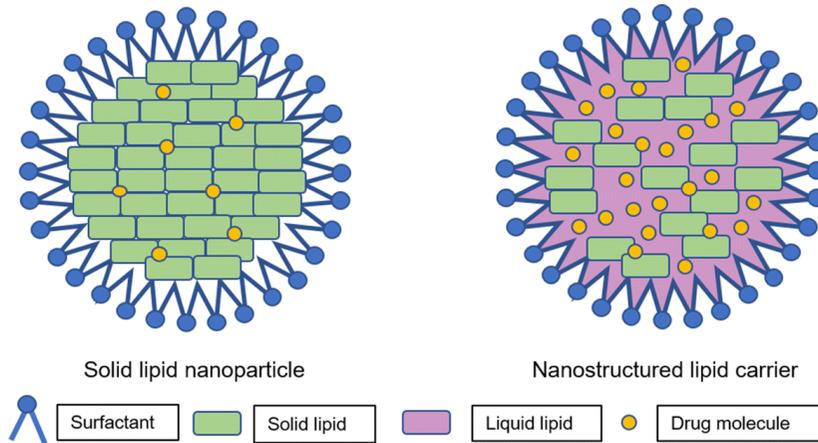


Figura 7: Esquema comparativo entre SLNP y NLC (Subramaniam et al., 2020).

a. **Portadores lípidos nanoestructurados (NLC):** Los NLC consisten en dispersiones acuosas de nanopartículas que poseen una matriz lipídica sólida compuesta por un lípido sólido y un lípido líquido, estabilizado por uno o dos emulgentes, lo que resulta en una matriz lipídica parcialmente cristalizada. La presencia de aceite en estado líquido causa una estructura interna más desordenada que conduce a menos transiciones polimórficas durante el almacenamiento, produciendo una mayor estabilidad (Costa, Barreiro, et al., 2021b). La formulación de los NLC se basó en el uso de lípidos y presentó una ventaja importante al evitar el uso de disolventes orgánicos durante el proceso de preparación, a diferencia de las nanopartículas orgánicas

existentes, como las nanopartículas PLGA. Además, los NLC demostraron una alta estabilidad in vivo al mantenerse en estado sólido a temperatura corporal. Esta característica los convirtió en una alternativa no solo a las nanopartículas orgánicas, sino también a las formulaciones de lípidos anteriores, como los liposomas (Beloqui et al., 2016).

Son sistemas coloidales utilizados como portadores específicos en la administración de medicamentos debido a sus múltiples ventajas. Estas incluyen la capacidad de liberación controlada y dirigida de fármacos, una alta carga útil de molécula activa, la capacidad de transportar tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos, su biocompatibilidad, biodegradabilidad, la mejora de la estabilidad del medicamento, un menor costo en comparación con portadores basados en polímeros, facilidad de escalamiento, esterilización, validación y obtención de aprobación regulatoria. Sin embargo, una limitación importante de la formulación original de los NLC fue su baja capacidad de carga de fármacos (Gabal et al., 2014; Khosa et al., 2018).

b. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNP): han surgido como nuevos sistemas de liberación modificada para varios fármacos, incluidas las moléculas de proteínas y péptidos. Las SLNP se componen de una matriz sólida basada en moléculas lipídicas químicamente muy diferentes (por ejemplo, ceras, mezclas de mono-, di-, y triacilglicerol, ácidos grasos) generalmente reconocidos como seguros para el organismo. Esto proporciona la ventaja de utilizar componentes fisiológicos y/o excipientes aceptados para la administración oral y

tópica, reduciendo el riesgo de toxicidad aguda y crónica. Para la producción de SLNP termodinámicamente estables, necesitan ser estabilizadas por una película de moléculas de surfactante que rodea la matriz lipídica en dispersión acuosa. Los surfactantes como polisorbatos, poloxámeros y fosfolípidos son muy comunes en las formulaciones de SLNP. Las SLNP combinan las ventajas de las nanopartículas poliméricas, las emulsiones de grasa y los liposomas; pueden controlar liberación de principios activos, cambiar la distribución en el organismo, incorporar más fármacos, aumentar la solubilidad y biodisponibilidad, y proteger contra la degradación química. Además, son bien toleradas, exhiben baja toxicidad, así como buena estabilidad física y biocompatibilidad (S. Li et al., 2011; Souto & Doktorovová, 2009).

3.2. Caracterización

El uso de nanopartículas en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas ha marcado el comienzo de una nueva era en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Es crucial, para lograr avances significativos en el campo de los nanomateriales, llevar a cabo una exhaustiva caracterización de los mismos, lo cual constituye un requisito fundamental en el desarrollo preclínico. Hasta el momento, no existen metodologías estandarizadas ni protocolos normativos para la caracterización de nanopartículas. Se sabe que las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas influyen en las interacciones fisiológicas afectando a la distribución y deposición de NPs en diferentes

órganos y estructuras y alterar sus interacciones moleculares con diversas proteínas y otras macromoléculas (Najahi-Missaoui et al., 2021).

Por lo tanto, es fundamental obtener una caracterización precisa de las NPs para comprender y predecir su papel en el organismo. La caracterización preclínica de los nanomedicamentos abarca aspectos como la caracterización fisicoquímica, la evaluación de la esterilidad y la pirogenicidad, la biodistribución y la toxicidad. Estos pasos son imprescindibles para garantizar la seguridad y eficacia de las NPs en aplicaciones médicas y biomédicas (Selmani et al., 2022b).

Dentro de las características a controlar con mayor incidencia en las propiedades finales de las NPs, nos encontramos con el tamaño, monodispersión, la morfología y la carga superficial.

3.2.1. Tamaño

El tamaño de las nanopartículas va a condicionar su ruta de entrada, absorción celular y toxicidad general. Interviene en su interacción celular y también determina su vida media en la circulación sistémica y su biodistribución.

El tamaño y la distribución de tamaño de las NPs y su variabilidad (también conocido como Índice de polidispersión, PdI) se estudian ampliamente mediante técnicas de dispersión, como la dispersión estática de luz (SLS) y la dispersión dinámica de luz (DLS), el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y la dispersión de rayos X de

ángulo pequeño (SAXS), así como técnicas basadas en la microscopía (Bhattacharjee, 2016).

La dispersión dinámica de la luz, basada en la difracción láser, se utiliza para detectar y cuantificar las nanopartículas durante el proceso de producción, proporcionando una distribución de tamaño de volumen que abarca partículas desde 0,05 hasta 2.000 μm (Agrawal & Patel, 2011).

A pesar de las numerosas técnicas experimentales disponibles para caracterizar las NPs, hasta donde sabemos, no existen técnicas combinadas que permitan evaluar simultáneamente todas las propiedades fisicoquímicas relevantes de las NPs.

El tamaño adecuado de las nanopartículas para la administración sistémica con fines terapéuticos debe ser inferior a 500 nm. Cuando se administran de este modo, como mediante la inyección intravenosa, las nanopartículas viajan a lo largo del torrente sanguíneo y entran en órganos con alta vascularización, aunque no sean los órganos diana. Por tanto, en el diseño de las nanopartículas se pretende alcanzar dos objetivos. En primer lugar, es importante diseñar nanopartículas que puedan escapar del proceso de eliminación en los pulmones, hígado, bazo y riñón, y, en segundo lugar, llegar efectivamente a los tejidos cerebrales atravesando la BHE para abordar enfermedades como tumores cerebrales, enfermedades neurodegenerativas (como Alzheimer, Huntington y Parkinson) y los accidentes cerebrovasculares (Jo et al., 2015), siendo el objetivo central de la presente Tesis Doctoral.

Para lograr una entrega eficaz de las nanopartículas a los tejidos diana, se deben considerar los siguientes aspectos (X. Li et al., 2022):

1) Mantener una circulación prolongada y una estabilidad coloidal en el torrente sanguíneo para evitar la filtración y la eliminación prematura. Es importante tener en cuenta que las nanopartículas demasiado pequeñas pueden ser excretadas rápidamente por los riñones y eliminadas de los tejidos diana.

2) Lograr una extravasación eficiente de las nanopartículas desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos o células diana, permitiendo su acumulación en el sitio objetivo.

3) Garantizar una penetración efectiva en los tejidos, especialmente en casos donde la vascularización es deficiente, como en tumores sólidos.

4) Favorecer la internalización celular eficiente a través de las vías intracelulares para que los fármacos sean liberados de una manera efectiva dentro de las células.

5) Facilitar un escape exitoso de los endosomas para liberar la sustancia activa en el citosol.

En consecuencia y considerando que el objetivo último de esta Tesis Doctoral es el tratamiento de enfermedades cerebrales, es necesario emplear enfoques diferentes dependiendo de la vía de administración. En el caso de la inyección intravenosa, se buscan nanopartículas que puedan evadir el sistema reticuloendotelial, tener perfiles farmacocinéticos sistémicos adecuados, penetrar la barrera

hematoencefálica y dirigirse a las células neuronales cerebrales. En el caso de la administración intranasal, se busca una captación celular rápida de las nanopartículas por la mucosa nasal y la utilización de mecanismos de transporte intracelular y endocitosis durante el transporte a través de los axones, con el objetivo de alcanzar las neuronas. Por lo tanto, es importante encontrar un equilibrio en el tamaño de las nanopartículas para lograr una adecuada distribución y retención en los tejidos diana sin ser rápidamente excretadas, sobre todo con la intención de que consigan llegar al SNC.

En cuanto al PDI, proporciona información sobre la estabilidad física de las nanodispersiones y se busca que sea lo más bajo posible para lograr estabilidad a largo plazo. Un valor de PDI de 0,1 a 0,25 indica una distribución de tamaño bastante estrecha, mientras que un valor de PDI superior a 0,5 indica una distribución muy amplia con mucha heterogeneidad en el tamaño (Agrawal & Patel, 2011).

En resumen, la caracterización del tamaño de partícula, su distribución y otras propiedades fisicoquímicas de las nanodispersiones son esenciales para comprender su estabilidad y actividad tanto en el ámbito de la producción como en su aplicación clínica.

3.2.2. Morfología

La morfología de las nanopartículas se refiere a su forma y estructura física, que puede variar desde partículas esféricas hasta formas más complejas, como nanobarras, nanotubos, nanocristales o nanocápsulas, entre otras. Es importante tener en cuenta que el diseño de las

nanopartículas, incluida su geometría, es un aspecto clave en el desarrollo de terapias basadas en nanopartículas y se continúa investigando para optimizar su rendimiento y aplicación en el campo de la medicina.

La forma de las nanopartículas puede ser controlada durante su síntesis o fabricación. Puede tener un impacto significativo en sus propiedades como su área superficial, propiedades ópticas, estabilidad química y reactividad; y en su rendimiento cuando se emplean como portadoras de agentes terapéuticos y como terapias por sí mismas, debido a los cambios en la orientación del ligando, la absorción celular, la circulación sanguínea, la penetración en los tejidos, la eficacia terapéutica y la degradación (Jo et al., 2015).

3.2.3. Carga superficial

Las propiedades de carga superficial de las nanodispersiones se estudian mediante la medición del potencial zeta. El valor del potencial zeta de las partículas indica la estabilidad de las nanodispersión a nivel macroscópico, da idea sobre la carga neta de nanopartículas, por lo tanto, indica la repulsión eléctrica o atracción entre las partículas según su carga en una suspensión líquida (Jain & Thareja, 2019).

La carga superficial de las nanopartículas puede ser positiva, negativa o neutra, y cada tipo de carga confiere atributos específicos a la nanoformulación. Las nanopartículas con carga positiva poseen una citotoxicidad inherente, pero son más eficientes como portadores en la entrega de fármacos, aunque tienden a ser eliminadas fácilmente de la

circulación sistémica. Por otro lado, los portadores neutros ofrecen una circulación sistémica prolongada y una captación reducida por parte del sistema retículo endotelial. En cuanto a los portadores aniónicos, son beneficiosos en la administración de fármacos por vía linfática y transdérmica, pero presentan una menor absorción celular en comparación con los portadores catiónicos. Cada tipo de carga superficial tiene sus ventajas y limitaciones en términos de aplicaciones terapéuticas específicas (Shah et al., 2021).

Está establecido en base a unas directrices que las NPs con valores absolutos de potencial zeta de 0-10 mV son altamente inestables, 10-20 mV son relativamente estables, 20-30 mV moderadamente estables y >30mV son altamente estables (Bhattacharjee, 2016). Para lograr una estabilización electrostática, se requiere un valor absoluto de potencial zeta mínimo de 30 mV, mientras que para la estabilización estérica se necesita un mínimo de 20 mV. Los valores del potencial zeta se calculan comúnmente determinando la electroforesis de las partículas y luego convirtiendo la movilidad electroforética en el potencial zeta (Agrawal & Patel, 2011). Determinar la carga superficial mediante técnicas como la dispersión dinámica de la luz (DLS) durante la incubación con fluidos biológicos, es una forma rápida y robusta de predecir el comportamiento y la estabilidad de las NPs.

La carga superficial de las NPs es un parámetro crucial para estimar su interacción con las células. Cuando entran en contacto con fluidos biológicos, las NPs interactúan con moléculas biológicas y pueden perder sus características originales afectando a su farmacocinética

(Crucho & Barros, 2017). A continuación, se muestra cómo afecta el potencial zeta a parámetros esenciales en el diseño y la aplicación de las nanopartículas:

- **Estabilidad:** La estabilidad es un desafío importante en la dispersión de nanopartículas. Debido a su tamaño reducido, alta superficie y energía superficial, estas dispersiones tienden a reducir su energía superficial. Esto puede resultar en la aglomeración y precipitación de las NPs. Sin embargo, este fenómeno puede ser mitigado cuando las partículas tienen una carga superficial significativa. La presencia de una carga superficial alta permite una repulsión electrostática entre las partículas, lo que contribuye a una mayor estabilidad de la formulación (Gommes, 2019).
- **Eficiencia de encapsulación:** El tipo de nanopartículas utilizados para encapsular fármacos y biomoléculas desempeña un papel fundamental en la capacidad de carga de la droga y en las características de eficiencia de encapsulación. La carga en el portador depende de la afinidad de la sustancia activa para integrarse en la fase portadora. Esta afinidad va a determinar una alta o baja capacidad de carga. Cuando el fármaco y el portador tienen cargas opuestas, se produce una interacción electrostática atractiva durante la preparación de las nanopartículas, lo que facilita la carga del medicamento en la matriz portadora. Las interacciones electrostáticas han sido ampliamente utilizadas para mejorar la capacidad de carga de diversos fármacos (Saeedi et al., 2020).
- **Liberación de fármaco:** La carga superficial tanto de la NPs como de la sustancia activa va a depender del pH del medio. La carga del

sistema transportador va a condicionar la afinidad del fármaco y, por tanto, la capacidad que tenga este para difundir al medio. De esta forma, el potencial zeta es uno de los parámetros más importantes que condicionan la cinética de liberación al controlar la erosión, la difusión y por tanto la transferencia de masa al medio.

Por ejemplo, una formulación con carga superficial positiva puede mostrar una liberación más rápida del fármaco en medios ácidos en comparación con una formulación con carga superficial negativa. Esto se debe a la interacción iónica entre los grupos catiónicos del polímero en las capas externas de la matriz y los protones en el medio ácido. Esto actúa como una fuerza que acelera la erosión superficial del portador, lo que resulta en una difusión más rápida del fármaco a través de la matriz hacia el medio. Cuando el medio es reemplazado por un tampón de fosfato pH 6,8, después del vaciamiento gástrico, la liberación del fármaco sigue una cinética de orden cero. Se observa un efecto de liberación sostenida, posiblemente debido a la similitud de las cargas superficiales entre las nanopartículas y el medio, lo que conduce a la agregación de las nanopartículas y ralentiza la liberación del fármaco (Sanna et al., 2012).

- Biodistribución: El potencial zeta está relacionado con la estabilidad coloidal y la interacción de las nanopartículas con las células y tejidos del cuerpo. Un alto potencial zeta, tanto positivo como negativo, indica una mayor estabilidad coloidal de las nanopartículas, lo que evita su aglomeración y favorece su dispersión en medios acuosos. Esto es especialmente importante para la administración intravenosa, donde las nanopartículas deben

mantenerse estables en el torrente sanguíneo. Un alto potencial zeta negativo puede evitar la agregación de las nanopartículas debido a la repulsión electrostática entre ellas, mientras que un alto potencial zeta positivo puede evitar la adsorción de proteínas plasmáticas.

Por ejemplo, las nanopartículas con un potencial zeta positivo pueden ser atraídas por las membranas celulares negativamente cargadas y tener una mayor internalización en las células. Esto puede ser ventajoso para la entrega de fármacos intracelulares dirigidos, pero también puede aumentar la captación por parte del sistema retículo endotelial, lo que puede limitar su distribución en otros tejidos (Baimanov et al., 2019).

En resumen, el potencial zeta de las nanopartículas está relacionado con su estabilidad coloidal y puede influir en su biodistribución. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la biodistribución de las nanopartículas es un proceso complejo y está influenciado por múltiples factores, por lo que se requiere un enfoque integral para comprender y optimizar su comportamiento en aplicaciones terapéuticas.

- **Mucoadhesion:** El revestimiento celular epitelial que recubre el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio está cubierto por una capa continua de mucosa secretada por las propias células. Esta mucosa cumple la función de lubricar el paso de diversas sustancias extrañas y actúa como una barrera al aumentar la viscosidad y ralentizar el proceso de difusión a través de la membrana. Sin embargo, esta característica puede ser aprovechada como ventaja por los nanotransportadores mucoadhesivos, ya que pueden adherirse firmemente a la capa mucosa, mejorando así la absorción

y biodisponibilidad de los fármacos. Dado que las células epiteliales secretoras de mucosa y la mucosa secretada son cargadas negativamente, las NPs con carga positiva puede unirse fuertemente a esta barrera y mejorar la mucoadhesión través de interacciones electrostáticas. Las NPs con carga negativa pueden presentar una adsorción débil en comparación con las NPs con carga superficial positiva. En consecuencia, las NPs, con carga positiva favorecen la absorción celular in vitro, mostrando una mejor distribución en epitelio y mejora significativa de la biodisponibilidad (Kaneko et al., 2020).

- **Direccionamiento cerebral:** La carga superficial también puede ser utilizada para facilitar eficientemente el paso de fármacos a través de la BHE. Los portadores catiónicos tienen la capacidad de atravesar la BHE mediante un mecanismo de transcitosis y adsorción, en comparación con los portadores aniónicos y neutros, debido a los efectos electrostáticos con la carga negativa de la membrana endotelial superficial. Como se mencionó anteriormente en la sección de mucoadhesión, se ha observado que las nanopartículas cargadas catiónicas tienen una mejor distribución cerebral debido a la interacción iónica entre los portadores catiónicos y la mucosa nasal con carga negativa, lo que resulta en una mayor retención y travesía de la BHE (Dante et al., 2017).

En resumen, el potencial zeta es una medida importante de la estabilidad de las nanodispersiones proporcionando información crucial sobre las propiedades de carga superficial de las partículas. Esto

ayuda a comprender y controlar la estabilidad de las nanodispersiones en aplicaciones científicas y tecnológicas.

3.3. Métodos de elaboración

Ya hemos visto la amplia variedad de nanopartículas existentes, así como las características tan diversas que pueden tener cada una de ellas. Todo ello dependerá de la estrategia empleada para su fabricación, así como de las materias primas empleadas. A menudo, y cada vez más frecuente, se utiliza la combinación de varias técnicas para lograr unas NPs con las características deseadas, de ahí la complejidad de hacer un resumen con los métodos de síntesis empleados. Por ello, se va a comentar cada técnica de forma general, sin profundizar en el tipo de NPs resultantes, como tampoco se va a hacer mención del uso combinado de las mismas.

De forma general, los métodos de elaboración de las NPs se dividen en dos: “top-down” (“de arriba hacia abajo”) o “bottom-up” (“de abajo hacia arriba”) (Selmani et al., 2022b).

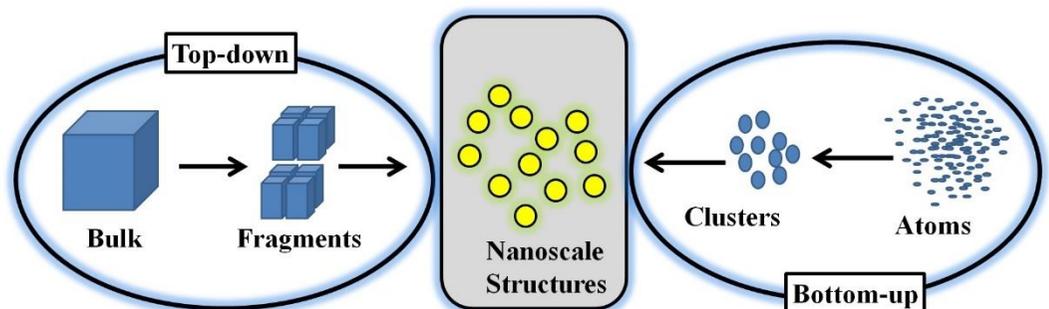


Figura 8: Representación métodos síntesis de las nanopartículas (Márquez et al., 2021).

Las estrategias “top-down” parten de un sistema muy superior a la escala nanométrica que, a partir de técnicas de procesamiento, como la trituración, la pulverización o la litografía, se consigue reducir a estructuras de tamaño nanométrico (Fu et al., 2018). Sin embargo, este enfoque puede tener limitaciones en términos de control preciso del tamaño, forma y superficie de las nanopartículas resultantes. Por otro lado, las estrategias “bottom-up”, implican la construcción de nanopartículas a partir de átomos o moléculas más pequeñas. Para lograrlo, se utilizan métodos químicos para sintetizar las nanopartículas.

El enfoque "top-down" requiere un control preciso de la presión, la temperatura y el entorno inerte en el que se lleva a cabo el proceso. Sin embargo, este enfoque puede resultar en nanomateriales con variaciones en tamaño, forma y superficie, lo que puede afectar su aplicación. Por otro lado, el enfoque "bottom-up" permite un mejor control del tamaño, la cristalinidad, la morfología y la reproducibilidad de las NPs, de ahí que sean los métodos más empleados.

TOP-DOWN	BOTTOM-UP
Fotolitografía	Emulsificación y evaporación del disolvente
Litografía de interferencias	Emulsificación y difusión del disolvente
Litografía electrónica	Salting out
Litografía de nanoimpresión	Nanoprecipitación
Litografía de nanoesferas	Emulsión-Polimerización
	Fusión-emulsificación
	Liposomas por hidratación de películas lipídicas

Tabla 1: Principales métodos de síntesis de nanopartículas.

3.3.1. Emulsificación y evaporación del disolvente

Este es el método más común para la síntesis de NPs y consta de dos pasos principales. En el primer paso, se emulsiona una solución polimérica disuelta en un líquido orgánico, en una fase acuosa. En el segundo paso, se lleva a cabo la evaporación del disolvente, lo que conduce a la precipitación del polímero y a la formación de las NPs. Normalmente, la solución de polímero y fármaco se disuelve en

disolventes orgánicos con bajo punto de ebullición como el cloroformo o el diclorometano (Jenjob et al., 2019). El fármaco se incorpora a la fase orgánica para que quede atrapado dentro de las NPs una vez que se formen.

Existen dos estrategias principales para la formación de las emulsiones. La primera estrategia implica la formación de emulsiones simples, como la emulsión aceite en agua (O/W). La segunda estrategia implica la formación de emulsiones dobles, como la emulsión agua-aceite-agua (W/O/W) o aceite-agua-aceite (O/W/O). En el caso de una emulsión doble, se prepara primero una emulsión primaria (W₁/O) dispersando la fase acuosa que contiene el polímero en un disolvente orgánico inmiscible. Posteriormente, esta emulsión primaria se homogeneiza en una fase acuosa externa que contiene un emulsionante mediante un homogeneizador de alta velocidad, lo que resulta en la formación de la fase orgánica emulsionada en la fase acuosa.

Durante el proceso de síntesis, el disolvente se evapora de forma continua, mientras que las nanopartículas se recuperan mediante centrifugación. Posteriormente, las NPs se lavan exhaustivamente con agua para eliminar los tensioactivos y restos de reactivos presentes. El diámetro de las nanopartículas puede controlarse mediante el ajuste de la velocidad de agitación, la viscosidad de las fases acuosa y orgánica, así como el tipo y la concentración del agente dispersante utilizado (Pulingam et al., 2022; Sabjan et al., 2019).

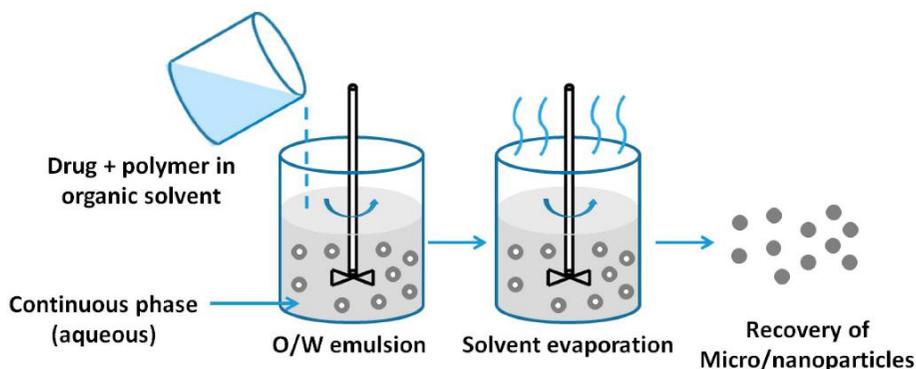


Figura 9: Método emulsificación y evaporación del disolvente (Y. Wang et al., 2016).

3.3.2. Emulsificación y difusión del disolvente

Este método implica la formación de una emulsión de aceite en agua (O/W) entre un disolvente que contiene polímero y fármaco, y una solución acuosa con un tensioactivo. La fase orgánica consiste en un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua, como alcohol bencílico o acetato de etilo, previamente saturado con agua para garantizar un equilibrio termodinámico inicial entre ambas fases a temperatura ambiente. Esta fase orgánica se emulsiona en la fase acuosa. Para precipitar el polímero, es necesario diluir el disolvente añadiendo agua adicional para facilitar su difusión. Entonces, diluyendo con una gran cantidad de agua se induce el paso del disolvente orgánico desde las gotas al medio, lo que resulta en la formación de partículas coloidales, las NPs.

Finalmente, dependiendo del punto de ebullición del disolvente orgánico, esta última etapa puede eliminarse mediante evaporación o filtración. Este método requiere una alta proporción de fase orgánica,

que debe eliminarse de la dispersión coloidal, y existe el riesgo de que las sustancias hidrofílicas se difundan hacia la fase acuosa (Zielińska et al., 2020).

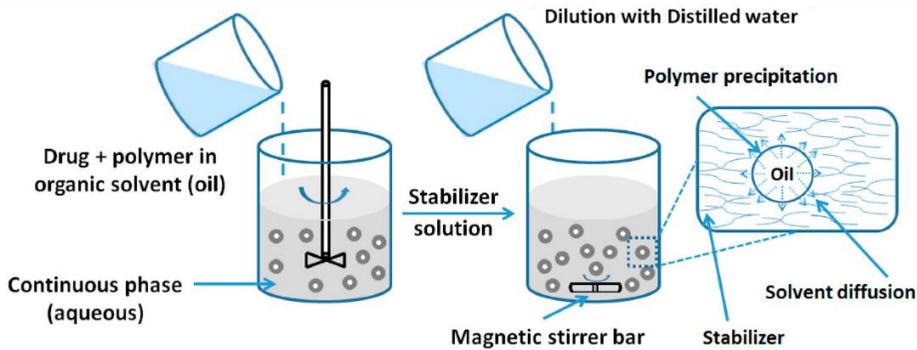


Figura 10: Método emulsificación y difusión del disolvente (Y. Wang et al., 2016).

3.3.3. Salting out

El método “salting out” es una variación del método de emulsificación y difusión del disolvente que aprovecha el efecto de precipitación por sales. El concepto y el mecanismo es el mismo. Se quiere separar la fase orgánica (parcialmente soluble en agua) del polímero, lo cual puede resultar en la formación de NPs. En este proceso, se emplea la adición de sales inorgánicas al medio acuoso para reducir la solubilidad del polímero en disolventes orgánicos, lo que conduce a la precipitación y formación de las nanopartículas.

La principal diferencia radica en la composición de la emulsión O/W, que se formula con un disolvente polimérico miscible en agua, como acetona o etanol, mientras que la fase acuosa está compuesta por agua, estabilizante y sales. Algunos ejemplos de sales incluyen electrolitos

como cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de calcio (CaCl_2) o acetato de magnesio [$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$], así como no electrolitos como la sacarosa (Zielińska et al., 2020).

En primer lugar, se adiciona la mezcla del polímero en el disolvente orgánico a la fase acuosa. La solución polimérica se emulsiona en una fase acuosa que contiene sales. Esta emulsión se forma mediante agitación vigorosa o mediante el uso de equipos homogenizado de alta velocidad. La adición de sales al medio acuoso provoca una disminución en la solubilidad del polímero en el disolvente orgánico. Esto resulta en la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas. El tamaño y la morfología de las nanopartículas pueden ajustarse controlando la concentración y tipo de sal utilizada. Las nanopartículas precipitadas se separan del medio acuoso mediante técnicas de centrifugación, filtración o lavado. Posteriormente, se pueden realizar procesos de purificación y secado para obtener las nanopartículas en forma seca y purificada.

El método de salting out es una técnica versátil y ampliamente utilizada en la producción de nanopartículas, ya que permite controlar el tamaño, la morfología y las propiedades de las partículas obtenidas. Además, es una alternativa a los disolventes orgánicos tóxicos y permite la obtención de nanopartículas en un medio acuoso más seguro. Sin embargo, el uso de sales en el proceso de preparación requiere procesos de purificación adicionales, lo cual es una desventaja de este método (Mendoza-Muñoz et al., 2012).

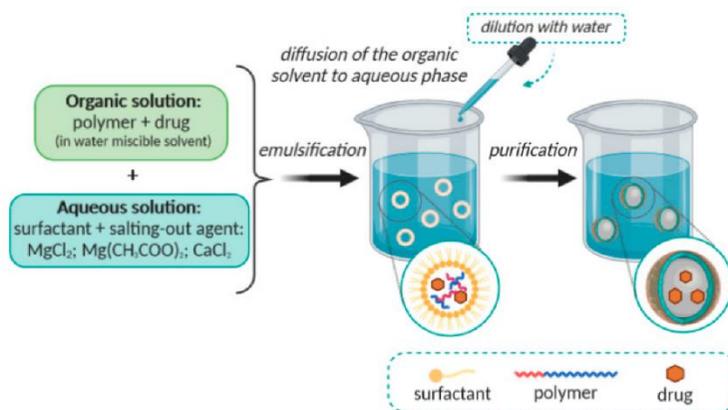


Figura 11: Método salting out (Zielińska et al., 2020).

3.3.4. Nanoprecipitación

Este método también se conoce como método de desplazamiento del disolvente. Es un método de un solo paso, simple, fácil, rápido y reproducible. El polímero se disuelve en un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua como acetona o el acetonitrilo, y esta solución se agrega gradualmente a una solución acuosa mientras se agita, gota a gota o de forma controlada. La rápida difusión del disolvente orgánico a la solución acuosa causa la precipitación del polímero, lo que lleva a la formación de nanopartículas. Por lo general, se añade la fase orgánica a la fase acuosa, pero también se puede invertir el protocolo sin afectar la formación de las nanopartículas. Estas nanopartículas pueden tener diferentes formas, como nanoesferas o nanocápsulas, dependiendo de la composición de la solución y las condiciones del proceso. Aunque no es necesario, en el proceso se suelen incluir tensioactivos para garantizar la estabilidad de la suspensión coloidal. Para recoger las NPs se utiliza la ultracentrifugación y

posteriormente se lavan con agua para eliminar los restos de tensioactivo.

La nanoprecipitación es un método popular debido a su simplicidad y a que no requiere el uso de disolventes tóxicos. Además, permite controlar el tamaño y la distribución de las nanopartículas ajustando los parámetros del proceso, como la velocidad de adición y la relación de los componentes (Pulingam et al., 2022; Rao & Geckeler, 2011).

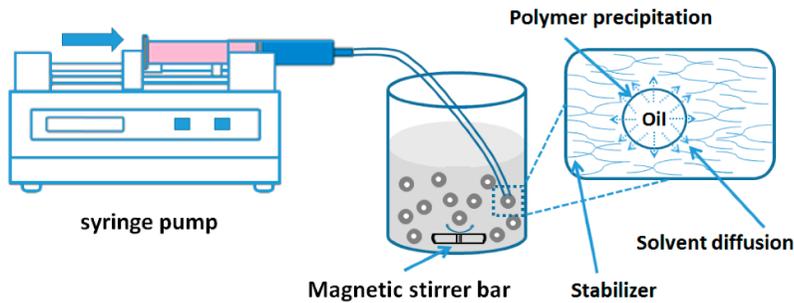


Figura 12: Método de nanoprecipitación (Y. Wang et al., 2016).

3.3.5. Emulsión-polimerización

La polimerización de nanopartículas es un proceso mediante el cual se sintetizan nanopartículas a partir de monómeros o precursores poliméricos. Este método implica la reacción química de los monómeros, que se encuentran dispersos en un medio acuoso u orgánico, para formar cadenas poliméricas que se agregan y se condensan, dando lugar a la formación de nanopartículas.

Los monómeros se dispersan en una fase acuosa mediante la utilización de tensioactivos y agitación. A continuación, se inicia la polimerización

en presencia de un catalizador apropiado. El proceso de polimerización puede ser iniciado por diferentes mecanismos. La iniciación ocurre cuando una molécula de monómero disuelta en la fase continua colisiona con una molécula iniciadora que podría ser un ion o un radical libre. Durante el proceso, los monómeros se polimerizan dentro de las gotas dispersas en la fase acuosa, generando nanopartículas poliméricas (Pinto Reis et al., 2006).

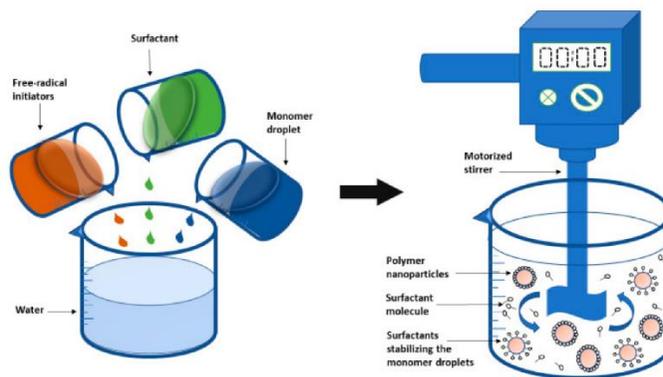


Figura 13: Método emulsión polimerización (Pulingam et al., 2022).

3.3.6. Fusión-emulsificación

En este método, la mezcla de lípidos se calienta inicialmente y se funde a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del lípido. Al mismo tiempo, se prepara una solución acuosa con tensioactivos caliente a la misma temperatura y se agrega a la mezcla de lípidos. El fármaco puede ir tanto en la fase orgánica como en la acuosa, dependiendo de su naturaleza. La mezcla se agita utilizando un agitador mecánico y luego se somete a sonicación. La solución resultante se enfría rápidamente para permitir la formación de nanopartículas al solidificar

el lípido. Una ventaja de este método es que no requiere el uso de disolventes. Se prefiere el uso de un sonicador de sonda en lugar de uno de baño debido a la mayor intensidad de agitación que se logra. Sin embargo, el uso de un sonicador de sonda puede causar contaminación metálica en la muestra, dependiendo de la duración, la edad de la sonda y el protocolo de mezcla. Además, la duración de la sonicación debe optimizarse para obtener el tamaño de partícula ideal sin sobrecalentar la muestra (Satapathy et al., 2021; Subramaniam et al., 2020).

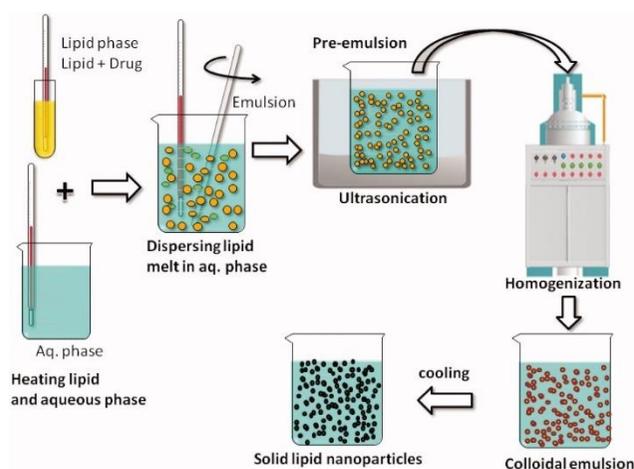


Figura 14: Método fusión emulsificación (Jain & Thareja, 2019).

3.3.7. Liposomas por hidratación de películas lipídicas

El método de hidratación de película fina, también conocido como método de Bangham, fue el primer proceso descrito utilizado en la tecnología de liposomas (Bangham et al., 1965). Este método consiste en la disolución de un lípido en un disolvente orgánico como cloroformo, éter o metanol; y se secan para formar una película muy fina en un matraz de fondo redondo tras la evaporación del disolvente orgánico. Posteriormente, la fina película lipídica se hidrata con un disolvente

adecuado, lo que da lugar a la formación de liposomas. Dependiendo de las condiciones de hidratación, este método permite obtener liposomas con diferentes organizaciones estructurales. Los principales desafíos asociados a este método incluyen la producción de liposomas de mayor tamaño y variabilidad, una capacidad de encapsulación reducida, así como la dificultad para eliminar por completo el disolvente orgánico y escalar el proceso (Guimarães et al., 2021).

Se han investigado nuevas técnicas para facilitar la producción a gran escala y ampliar su aplicabilidad en diferentes tipos de liposomas y fármacos. Estos métodos incluyen mejoras en los métodos convencionales, como el uso de inyección de flujo cruzado y tecnología de contracción de membranas, así como la optimización de la técnica de eliminación de detergentes mediante filtración de flujo cruzado. Además, se están explorando métodos basados en fluidos supercríticos, que ofrecen ventajas como la seguridad ambiental y el control del tamaño de partícula.

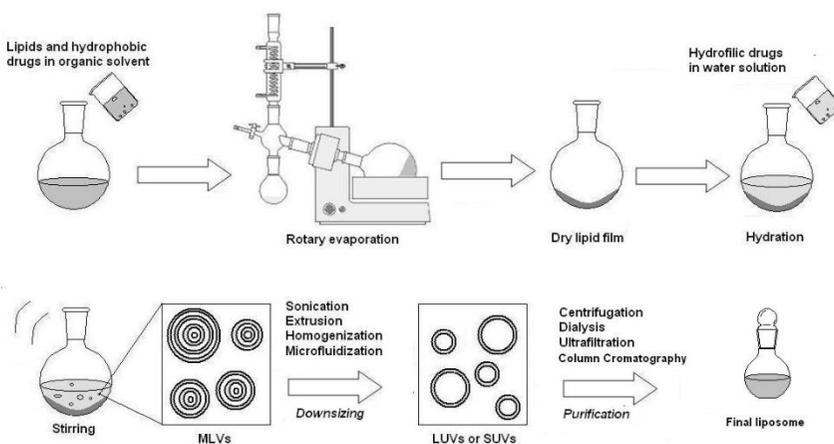


Figura 15: Método tradicional de síntesis de liposomas (Araujo Lopes et al., 2013).

3.4. Aplicaciones

Hasta aquí hemos visto la versatilidad de las nanopartículas usadas en biomedicina. Cada vez se conoce más acerca de las nanopartículas permitiendo una síntesis, caracterización y mejor interpretación de los procedimientos relacionados con las nanopartículas. Con estos avances se ha logrado una producción de nanopartículas muy versátiles y de gran calidad. Las nanopartículas presentan una serie de propiedades como su estructura, tamaño, propiedades antioxidantes y catalíticas, biocompatibilidad, permeabilidad y capacidad de retención prolongada en el lugar de administración. Gracias a estas características, las nanopartículas han encontrado aplicaciones muy diversas en campos científicos muy diferentes entre sí. Dada la magnitud de su estudio, a continuación, se detallarán aquellas de carácter biomédico.

Todas las aplicaciones que se van a comentar a continuación son posibles gracias a esas propiedades intrínsecas que poseen las NPs que llevamos comentando a lo largo de todo el capítulo. En primer lugar, lo fundamental de estas estructuras es su tamaño nanométrico las cuales le permiten atravesar barreras biológicas, que, hasta ahora, otro tipo de estructuras no eran capaces. Según la literatura, los capilares más pequeños tienen un tamaño de 5-6 μm , por tanto, a priori, cualquier NPs con un tamaño inferior a 1 μm debe de ser transportada fácilmente por la circulación sanguínea. Además, al ser de tamaño nanométrico, poseen una alta superficie de contacto lo que les permite una mayor interacción con el objetivo, así como una mayor internalización celular (El-Say & El-Sawy, 2017).

3.4.1. Aplicaciones terapéuticas

Una de las aplicaciones más importantes que están siendo estudiadas hoy en día, es la administración de las NPs que contienen una sustancia activa en su interior, ya sean fármacos, proteínas o material genético. Constituye la principal aplicación estudiada del uso de las nanopartículas en biomedicina. En definitiva, se apuesta por la nanoencapsulación de los principios activos para mejorar alguna propiedad de sus propiedades farmacocinéticas y biofarmacéuticas; ya sea aumentar la biodisponibilidad, proteger los fármacos de su rápido metabolismo en la circulación sistémica, así como de la eliminación que ocurre en el hígado, riñón y sistema reticuloendotelial, o administrar la sustancia activa de forma específica en una región del organismo. Esto contribuye a mejorar la estabilidad de los fármacos y aumentar la especificidad del objetivo terapéutico.

a. Terapia dirigida:

Las nanopartículas pueden ser diseñadas para entregar medicamentos de manera específica a células o tejidos específicos en el cuerpo. Son capaces de llevar medicamentos, agentes de contraste o materiales terapéuticos, y se utilizan con el objetivo de aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los tratamientos. Se basa en la idea de que estas partículas pueden interactuar selectivamente con células o tejidos diana, lo que permite una entrega más precisa de los medicamentos. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser modificadas

para reconocer y unirse a proteínas específicas en la superficie de las células cancerosas, lo que facilita la administración de medicamentos directamente a las células tumorales (Caldonazo et al., 2021). Otro ejemplo lo encontramos en aquellas NPs que están diseñadas para tener una afinidad a un tipo tejido en concreto, por ejemplo, el hueso, pues allá donde se encuentren este tipo de células, las NPs tendrán su preferencia como destino.

b. Liberación controlada de fármacos

Las nanopartículas se utilizan ampliamente en la liberación controlada de fármacos. Estas partículas pueden ser diseñadas para liberar los medicamentos de manera controlada y sostenida en el tiempo. Permite mantener concentraciones terapéuticas constantes en el sitio objetivo durante períodos prolongados, lo que mejora la eficacia y reduce la frecuencia de administración de los fármacos. También puede reducir los efectos secundarios al minimizar la exposición de tejidos sanos a altas concentraciones de fármacos.

Existen diferentes estrategias para lograr la liberación controlada de fármacos utilizando NPs. Algunos de los métodos más comunes incluyen:

- **Matrices poliméricas:** Las NPs pueden estar formadas por matrices poliméricas que contienen el fármaco. El fármaco se liberará de forma progresiva a medida que el polímero se degrada o se disuelve

con el tiempo. La velocidad de liberación puede controlarse modificando las propiedades del polímero.

- **Recubrimiento de nanopartículas:** Las nanopartículas, además de su estructura elemental, pueden recubrirse con una capa de otros materiales que les permitan controlar su liberación. La capa actúa como una barrera que regula la difusión o descomposición gradual del fármaco desde la superficie de las nanopartículas. El espesor y la composición de la capa de recubrimiento pueden ajustarse para modificar la velocidad y el perfil de liberación del fármaco.
- **Sistemas de liberación sensible a estímulos:** Las nanopartículas pueden diseñarse para liberar el fármaco en respuesta a un estímulo específico. Estos sistemas de liberación sensible a estímulos aprovechan las condiciones particulares en el sitio objetivo para desencadenar la liberación controlada del fármaco. De esta manera, la liberación de la biomolécula solo ocurrirá cuando la NPs sea expuesta a un estímulo específico que provoque la apertura del poro. Existen diferentes tipos de estímulos que se pueden utilizar, los cuales pueden ser internos, como cambios de pH, enzimas o procesos redox; o externos, como ultrasonidos, luz o variaciones de temperatura. Dependiendo de la naturaleza de la nanopartícula y del estímulo seleccionado, se puede controlar de manera precisa el momento y el lugar de liberación de la biomolécula, mejorando así la eficacia y la especificidad del tratamiento (Márquez et al., 2021).
- **Nanopartículas magnéticas:** Algunas nanopartículas pueden ser de naturaleza magnética y controlar mediante campos magnéticos externos. Esto permite una liberación controlada del fármaco al aplicar o retirar el campo magnético. Estos sistemas son

especialmente útiles para la liberación localizada de fármacos en regiones específicas del cuerpo (García-García et al., 2020).

c. Mejora de la solubilidad de fármacos

La administración oral es la forma preferida de administrar medicamentos debido a su comodidad para el paciente, bajo costo y cumplimiento del paciente. Para que un medicamento tenga un efecto farmacológico en el cuerpo, debe disolverse en el tracto gastrointestinal para poder ser absorbido y llegar a la circulación sanguínea.

Por lo tanto, se requieren tres procesos: la disgregación de la forma farmacéutica, la disolución del medicamentos en los fluidos y la permeabilidad adecuada por el tracto gastrointestinal. La solubilidad acuosa baja da lugar a la baja o nula absorción (Kumar et al., 2018).

La mayoría de los nuevos medicamentos presentados en el mercado global tienen problemas de baja solubilidad en agua, también conocidos como medicamentos poco solubles en agua. Como resultado, aunque son altamente potentes in vitro, estos medicamentos carecen de eficacia terapéutica in vivo, principalmente porque no logran alcanzar una concentración lo suficientemente alta en el lugar de absorción, es decir, en la luz gastrointestinal (Maleki et al., 2017).

Existen diversas técnicas tradicionales para mejorar la solubilidad y/o la velocidad de disolución de los medicamentos mediante modificaciones físicas, químicas u otras en las moléculas de fármaco. La

modificaciones implican manipular el tamaño de partícula, utilizar diferentes polimorfos de un medicamento, variar el pH, o formar sales, entre otros. Las NPs se presentan como una alternativa que mejora esta propiedad problemática que condiciona sus propiedades farmacocinéticas. Estos principios activos poco solubles se pueden encapsular en el interior de nanopartículas de naturaleza hidrofílica y que, por tanto, si serán solubles en agua. Ya una vez en el torrente sanguíneo se liberará la molécula activa para llegar a su lugar de acción.

3.4.2. Aplicaciones en diagnóstico

La nanotecnología también ha tenido un impacto importante en el desarrollo de técnicas de diagnóstico, en la detección temprana de enfermedades y en el pronóstico de algunas enfermedades al mejorar las técnicas existentes. Todo esto es posible gracias a las propiedades únicas que presentan las NPs que permiten mejorar el contraste en la imagen biomédica. Como ya hemos visto en este capítulo, pequeñas variaciones en su composición o elaboración pueden dar lugar a NPs con propiedades muy diferentes. Esta versatilidad se aprovecha para manipular las NPs y dirigir las hacia un tejido u órgano ofreciéndonos una imagen específica de esa zona; todo debido a sus propiedades ópticas, magnéticas o eléctricas únicas a escala nanométrica.

Las nanopartículas desempeñan un papel clave en el diagnóstico, ya que ofrecen una amplia superficie que se puede funcionalizar con diversos marcadores y ligandos para facilitar la localización específica y la

respuesta a estímulos en el sitio objetivo. Además, a diferencia de los agentes de imagen utilizados en el pasado, que eran principalmente compuestos orgánicos u organometálicos y presentaban limitaciones inherentes como el fotoblanqueo o la generación deficiente de contraste, se han desarrollado diversas clases de nanopartículas principalmente, inorgánicas para su aplicación clínica con el fin de superar estas limitaciones (Pallares et al., 2022; A. Singh & Amiji, 2021).

3.4.3. Aplicaciones teranósticas

En los últimos años, el uso de las NPs como agentes teranósticos ha adquirido una mayor importancia. Esto surge como respuesta a la creciente búsqueda de una medicina cada vez más personalizada, que busca optimizar las terapias. La medicina personalizada se basa en el consenso de que muchas enfermedades, como el cáncer, son inherentemente heterogéneas, por lo que los tratamientos clínicos deben adaptarse a las características individuales de cada paciente y a las diferentes etapas de progresión de la enfermedad. De ahí surge el concepto de "teranóstico": terapia + diagnóstico.

Tanto en el diagnóstico como en la terapia, la entrega eficiente de agentes de imagen y medicamentos al sitio objetivo es un requisito esencial. El objetivo es aumentar la concentración de la sustancia activa en el lugar de acción, al mismo tiempo que se minimiza la distribución en otros tejidos u órganos, reduciendo así los efectos adversos. Por lo tanto, un enfoque clave para superar este obstáculo crucial es el

desarrollo de sistemas de entrega optimizados y dirigidos para agentes de imagen o medicamentos.

Con este propósito, se han desarrollado diversas nanopartículas utilizando materiales orgánicos o inorgánicos, y se utilizan ampliamente tanto en el diagnóstico como en la terapia. Estas nanopartículas combinan propiedades de bioimagen y administración de medicamentos en un solo sistema, lo que les permite realizar diagnósticos precisos y proporcionar terapias específicas en el sitio objetivo. Para lograr esto, la superficie de las nanopartículas puede ser funcionalizada con elementos específicos para cada enfermedad. Una estrategia común es encapsular el principio activo en el interior de las NPs y recubrir su superficie con proteínas adecuadas para unirse a ligandos específicos. Sin embargo, la entrega dirigida *in vivo* sigue siendo el factor limitante clave para muchas nanopartículas que han demostrado ser útiles en sistemas de cultivo celular (Koo et al., 2011; Lucignani, 2009).

4. NANOMEDICINAS COMERCIALIZADAS

El campo de la nanomedicina se encuentra en pleno auge, experimentando un enorme crecimiento con avances significativos en los últimos 20 años. Se debe a que los nanomateriales se presentan en medicina como una alternativa capaz de ofrecer terapias más eficientes, menos tóxicas y más inteligentes que pueden dirigirse específicamente al sitio de la enfermedad. Durante este tiempo, se han desarrollado con

éxito muchos nanomedicamentos que han sido aprobados para su uso clínico.

Sin embargo, a pesar de estos logros, el campo de la nanomedicina aún se encuentra en sus etapas iniciales y se enfrenta a diversos desafíos en el desarrollo de nanomedicamentos farmacéuticos. A pesar de estos desafíos, este campo continúa avanzando y ofreciendo nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias innovadoras y personalizadas.

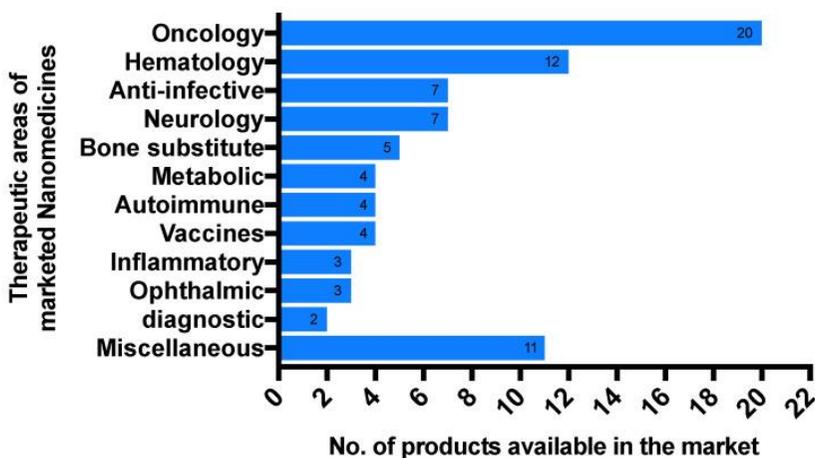


Figura 16: Nanomedicamentos comercializados agrupados en diferentes categorías (Halwani, 2022).

Desde 1995, año en el que se comercializó el primer nanomedicamento, alrededor de 78 formulaciones han sido aprobadas para su comercialización tanto por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, USA), como por la Agencia de Medicamentos (EMA, EU). De estos, 66 han sido aprobados por la FDA y 31 han sido aprobados por la EMA. Ambas agencias han compartido la aprobación

de 20 nanomedicamentos, mientras que los otros solamente cuentan con la aprobación de una de las dos entidades: FDA: 46 nanomedicamentos; EMA: 11 nanomedicamentos.

Desde la aprobación del primer nanomedicamento, se ha visto que conforme pasan los años, el crecimiento de nanomedicamentos aprobados es exponencial, siendo a partir de 2010 cuando se ha observado un aumento significativo. Esto demuestra el rápido crecimiento de la investigación y desarrollo (I+D) en este campo. Cada año, nuevos nanomedicamentos aprobados ingresan a ensayos clínicos para evaluar su eficacia mejorada en comparación con las formulaciones convencionales. En la tabla 2 se recogen algunos nanomedicamentos ya comercializados.

Tabla 2: Nanomedicamentos comercializados y su indicación. Modificado de (Halwani, 2022).

Capítulo I: Nanotecnología

Tipo NPs	Nombre comercial	Fecha de aprobación	Sustancia activa	Indicación
Nanocristales	Emend®	FDA (2003)	Aprepitant	Antiemético
	Ivemend®	FDA, EMA (2008)	Fosaprepitant dimeglumina (profármaco de aprepitant)	Antiemético
	Ostim®	FDA (2004)	Hidroxiapatita de calcio	Sustituto óseo
	Rapamune®	EMA (2001), FDA(2010)	Sirolimus	Linfangioleiomiomatosis
	Vitoss®	FDA(2003)	β -Tricalcio fosfato	Regeneración ósea
	Ritalin LX®	FDA (2002)	Metilfenidato	TDAH en niños
	Avinza®	FDA (2002)	Sulfato de morfina	Psicoestimulante
	Focalin XR®	FDA (2008)	Hidrocloruro de dexametilfenidato	TDAH en niños
	Invega®	FDA (2009)	Paliperidona	Esquizofrenia
	Invega Sustenna®	FDA (2009)	Palmitato de paliperidona	Esquizofrenia
	Megace ES®	FDA (2005)	Acetato de megestrol	Antianorexico
	NanOss®	FDA (2005)	Hidroxiapatita	Sustituto óseo
	EquivaBone®	FDA (2009)	Hidroxiapatita	Sustituto óseo
	OsSatura®	FDA (2003)	Hidroxiapatita	Sustituto óseo
	Epaxal®	EMA (1993)	Vacuna inactivada contra el virus de la hepatitis A	Prevención de la infección por virus de la hepatitis A
	Zanaflex®	FDA (2002)	Hidrocloruro de tizanidina	Relajante muscular
	Ryanodex®	FDA (2014)	Dantroleno sódico	Hipertermia maligna
	TriCor®	FDA (2004)	Fenofibrato	Antihiperlipidemia

Nanomedicinas comercializadas

Tipo NPs	Nombre comercial	Fecha de aprobación	Sustancia activa	Indicación
Nanopartículas lipídicas	Doxil®	FDA (1995), EMA (1996)	Doxorrubicina	Cáncer de ovario metastásico, sarcoma de Kaposi asociado al VIH
	Lipodox®	FDA (2013)	Hidrocloruro de doxorrubicina	Cáncer de ovario metastásico, sarcoma de Kaposi asociado al VIH
	DaunoXome®	FDA y EMA (1996)	Daunorrubicina	Cáncer y sarcoma de Kaposi asociado al VIH
	Onivyde®	FDA (2015)	Irinotecan	Cáncer de páncreas metastásico
	DepoCyt®	FDA (2002), EMA (2007)	Citarabina	Meningitis linfomatosa
	Myocet®	EMA (2000)	Hidrocloruro de doxorrubicina	Cáncer de ovario
	Caelyx®	EMA (1996)	Doxorrubicina	Cáncer de ovario metastásico, sarcoma de Kaposi asociado al VIH
	Mepact®	EMA (2009)	Mifarmutida	Sarcoma osteogénico
	Marqibo®	FDA (2012)	Vincristina	Leucemia
	Onpattro®	FDA y EMA (2018)	Patisirán	Amiloidosis hereditaria por transtiretina
	Lipusu®	FDA (2016)	Paclitaxel	Cáncer de mama, cáncer pulmón
	AmBisome®	FDA (1997), EMA (1990)	Amfotericina B	Antifúngico
	Vyxeos®	FDA (2017), EMA (2018)	Daunorrubicina y citarabina	Leucemia
	Abelcet®	FDA (1995)	Amfotericina B	Antifúngico
	DepoDur®	FDA (2004), EMA (2006)	Sulfato de morfina liposomal	Analgesia postoperatoria
	Curosurf®	FDA (1999)	Poractant alfa	Síndrome de insuficiencia respiratoria
	Zevalin®	FDA (2002), EMA (2004)	Ibritumomab tiuxetan	Linfoma
	Inflexal®	EMA (1997)	Vacuna contra el virus de la gripe	Prevención gripe
	Vacuna Pfizer-BioNTech	FDA (2020)	Vacuna mRNA	Prevención infección por COVID-19
	Vacuna Moderna COVID-19	FDA (2020)	Vacuna mRNA	Prevención infección por COVID-19

Capítulo I: Nanotecnología

Tipo NPs	Nombre comercial	Fecha de aprobación	Sustancia activa	Indicación
Nanopartículas poliméricas	Cimzia®	FDA (2008), EMA (2009)	IgG Fab que reconoce y se une específicamente a TNF- α	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica
	Apealea®	EMA (2018)	Paclitaxel	Cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompa de Falopio
	Adagen®	FDA (1990)	Adenosina desaminasa	Trastorno de inmunodeficiencia combinada grave de adenosina deaminasa
	Neulasta®	FDA(2002)	Filgrastim	Neutropenia febril
	Oncaspar®	FDA(1994), EMA (2016)	L-asparaginasa	Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica
	Genexol-PM®	FDA (2007)	Paclitaxel	Cáncer de mama
	Pegasys®	FDA, EMA (2002)	Interferón humano recombinante alfa-2a	Hepatitis B y C
	Dipirivan®	FDA (1989), EMA (2001)	Propofol	Sedante
	Somavert®	FDA (2003), EMA (2002)	Análogo de la hormona de crecimiento humana	Acromegalia
	Macugen®	FDA (2004)	Pegatinib sódico	Neovascularización coroidea causada por degeneración macular húmeda
	Mircera®	FDA (2018), EMA (2007)	Epoetina β	Anemia
	PegIntron®	FDA (2001), EMA (2000)	Interferón alfa	Hepatitis C
	Krystexxa®	FDA (2010)	Pegloticasa	Gota crónica
	Plegridy®	FDA (2014)	INF- β recombinante	Esclerosis múltiple remitente
	Adynovate®	EMA (2015)	Factor VIII coagulación	Hemofilia A
	Copaxone®	FDA (1996), EMA (2016)	Acetato de glatiramer	Esclerosis múltiple
	Eligard®	FDA (2002)	Acetato de leuprolida	Cáncer de próstata
	RenageI®	FDA (2000)	Carbonato de sevelamer	Hiperfosfatemia causada por enfermedad renal crónica
	RenageI®/ Renvela®	EMA (2007)	Hidrocloruro de sevelamer	Hiperfosfatemia causada por enfermedad renal crónica
	Restasis®	FDA (2003)	Ciclosporina	Ojo seco crónico
Rebinyn®	FDA (2017)	Factor IX de coagulación obtenido por ADN recombinante	Hemofilia B	
Estrasorb®	FDA (2003)	Hemihidrato de estradiol (17-estradiol)	Síntomas vasomotores debido a menopausia	
Zilretta®	FDA (2017)	Acetonido de triamcinolona	Osteoartritis de rodilla	

Nanomedicinas comercializadas

Tipo NPs	Nombre comercial	Fecha de aprobación	Sustancia activa	Indicación
Nanopartículas basadas en dendrímeros	VivaGel®BV	FDA (2015)	Astrodímero sódico	Antiinfeccioso para la prevención de la vaginosis bacteriana recurrente (BV)
	Abraxane®	FDA (2005,2012,2013), EMA (2008)	Paclitaxel	Aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (2005), cáncer de pulmón (2012), y adenocarcinoma pancreático metastásico (2013)
Nanopartículas basadas en proteínas	Ontak®	FDA (1999)	Toxina de la difteria	Leucemia, Linfoma de células T
	Feraheme®	FDA(2009)	Fereumoxitol	Anemia
Nanopartículas inorgánicas	Venoferr®	FDA(2000)	Hierro sacarosa	Déficit hierro en enfermedad renal crónica
	Dexferrum®	FDA (1996)	Hierro dextrano	Déficit hierro en enfermedad renal crónica
	Ferinject®	FDA, EMA (2013)	Hierro carboximaltosa	Anemia
	Ferlecit®	FDA (1999), EMA(2013)	Gluconato férrico de sodio	Déficit hierro en enfermedad renal crónica
	Hensify®	EMA (2019)	Nanopartículas de óxido de hafnio	Carcinoma de células escamosas localmente avanzado
	Infed®	FDA (1992)	Hierro dextrano	Déficit hierro en enfermedad renal crónica
	Feridex®/ Endorem®	FDA (2008)	SPION-dex	Agente de imagen
	GastroMARK®	FDA (2012)	SPION-silicona	Agente de imagen

5. Improvement of mesoporous silica nanoparticles: A new approach in the administration of NSAIDS

Mejora de las nanopartículas de sílice mesoporosas: Un nuevo enfoque en la administración de AINEs

Elena Ortega, M. Adolfin Ruiz, Sebastián Peralta, Gabriella Russo, M.
Encarnación Morales. *Journal of Drug Delivery Science and
Technology*, 58 (2020) 101833. Factor de impacto (JCR)- Percentil
(JCR): 3.981 – 59.60



Los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que exhiben actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Sin embargo, se ha estudiado ampliamente el daño gastrointestinal causado por los AINEs. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue el desarrollo de nanopartículas de sílice mesoporosa con el fin de aumentar la capacidad de transporte de medicamentos, haciendo hincapié en aquellos con baja solubilidad como los AINEs. Las características de morfología y estructura de las nanopartículas sintetizadas se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); además, se determinó su tamaño de partícula, carga superficial, área específica y viabilidad celular. También se evaluó la aplicación analítica de las nanopartículas de sílice mesoporosa como transportadoras de ibuprofeno mediante la medición

de sus características de carga de medicamento y comportamiento de liberación. Los resultados mostraron que las nanopartículas sintetizadas tenían características fisicoquímicas eficientes, un alto porcentaje de encapsulación, baja toxicidad y liberación controlada de ibuprofeno.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



Research paper

Improvement of mesoporous silica nanoparticles: A new approach in the administration of NSAIDs



Elena Ortega, M. Adolfin Ruiz*, Sebastián Peralta, Gabriella Russo, M. Encarnación Morales

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Nanoparticles
Mesoporous silica
Delivery systems
Ibuprofen delivery
NSAIDs

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute a heterogeneous group of compounds that exhibit analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activity. However, the GI damage produced by NSAIDs has been widely studied. Thus, the aim of the present study was the development of mesoporous silica nanoparticles in order to increase the capacity of drug transport, emphasizing those with low solubility such as NSAIDs. The morphology and structure characteristics of the synthesized nanoparticles were studied by transmission electron microscopy (TEM), besides, its particle size, surface charge, specific area and cell viability will be determined. The analytical application of mesoporous silica nanoparticles as ibuprofen carrier was also evaluated by measuring their drug loading characteristics and release behavior. The results showed that the synthesized NPs had efficient physicochemical characteristics, high EE%, low toxicity, and controlled ibuprofen release.

1. Introduction

Musculoskeletal pain is one of the most frequent reasons for medical consultation. Taking into account the increase in life expectancy, the treatment of these symptoms has an important impact on health systems [1]. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute a heterogeneous group of compounds that exhibit analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activity [2]. They are used in multiple clinical situations, both acute and chronic, so they constitute one of the most used therapeutic groups worldwide [3]. In addition, it should be considered that after oral administration, three processes are mainly governing the pharmacological action. They are timely disintegration of tablet in the gastrointestinal (GI)-tract, appropriated drug dissolution in GI fluids (high amount of drug has to be dissolved) and sufficient drug permeation through the GI wall to access systemic circulation [4].

Unfortunately, most of the commonly used NSAIDs are poorly soluble in water. Poor aqueous solubility results in erratic absorption, fed-fasted variability and hence poor patient compliance [5].

Moreover, the GI damage produced by NSAIDs could be divided into two: upper and lower. The lower damage refers to distal small intestine and colon and is caused by enterohepatic circulation metabolites [6]. The upper damage (gastric and duodenal mucosa) caused by NSAIDs has been widely studied. This damage is due to the drug's contact with the gastrointestinal mucosa. This consists of an irritation

produced by the active substance in contact with the mucosa. NSAIDs are in a non-ionized form in acid medium, but they collect hydrogen ions from mucous causing [7]. In consequence, a rebound effect will be set off in which the stomach secretes more acid that damages the mucosa causing erythema, mucosal hemorrhage, erosions and intestinal ulceration [8]. That effect aggravates the situation because GI mucous is liable to suffer damage.

So, the GI side effects which are produced by the contact of the drug molecule with the GI mucosa could be avoided with the drug nanoencapsulation [6]. Since the discovery of mesoporous materials (MSN), whose potential has been noted in distinct areas of application, most of the studies involving the same have focused on optimizing their synthesis in order to control the characteristics of the nanoparticles formed [9]. In general, the controlled parameters of the greatest interest are: stable dissolution, pore size and volume, uniform size of the nanoparticles, as well as their shape [10]. The knowledge and reproducibility of the pore size permits the knowledge of which molecule types can be loaded in their interior, as well as the quantity of the same [11]. It is also possible to determine the type of interactions taking place in their contact with the cell, since the greater the pore volume, the better the biodegradation [12]. In addition, this size determination also provides information on the sites to which they shall have access within the organism. The control of all of these parameters is achieved through the modification of the reaction conditions: pH, surfactant,

* Corresponding author. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, 18071, Granada, Spain.

E-mail addresses: adolfin@ugr.es, elenaom@ugr.es (M.A. Ruiz).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101833>

Received 2 April 2020; Received in revised form 25 May 2020; Accepted 1 June 2020

Available online 06 June 2020

1773-2247/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

temperature, silica source [13].

Therefore mesoporous nanoparticles are of biomedical interest and tend to be used specifically for therapeutic purposes, since they improve the solubility of poorly-soluble drugs [4,14,15], permitting the controlled or sustained release or release with stimuli of the loaded drug [16], having the capacity to adhere to distinct biological systems, protecting the drug from organism degradation [6]. Furthermore, its application extends to its use as diagnostic agents and even catalysts [17,18]. Roughly, they are quite promising for substance release [19].

In this context, the aim of the present study was the development of mesoporous silica nanoparticles according to the guidelines established by Grun et al. [13]. Based on this method, several modifications have been made with the intention of decreasing particle size and increasing porosity in order to increase the capacity of drug transport, emphasizing those with low solubility such as NSAIDs. The morphology and structure characteristics of the synthesized nanoparticles were studied by transmission electron microscopy (TEM), besides, its particle size, surface charge, specific area and cell viability will be determined. The analytical application of mesoporous silica nanoparticles as ibuprofen carrier was also evaluated by measuring their drug loading characteristics and release behavior. The appropriate mathematical models were also investigated to determine the kinetics of drug release.

2. Materials and methods

2.1. Materials

For nanoparticle synthesis, the following reagents were used: tetraethyl orthosilicate (TEOS) and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) both supplied by Sigma-Aldrich. The sodium hydroxide used to obtain the basic medium was supplied by Panreac Química S.A. The ibuprofen was supplied by Fagron Iberica S.A.U. The remainder of the products used came from each analytic method.

2.2. Methods

2.2.1. MCM-41 synthesis

The synthesis was carried out via soft templating strategies, based on the method described by Stöber and subsequently modified by diverse authors, consisting of a series of reactions that result in MCM-41-type mesoporous nanoparticles [20].

The first step consisted of the addition of CTAB to a warm (30 °C) aqueous medium that acts as a cradle for the reaction where the surfactant forms the micelles and mix at 200 rpm until completely homogenized. Add the NaOH and increase the temperature; when reaching 80 °C, increase the mixing speed to 500 rpm and add the TEOS at 1 mL/min. These conditions are maintained for 2 h and then carry out various wash cycles with distilled water. The temperature controlled throughout the process, as it has great influence on the final size of the nanoparticles [21]. In the last step, the surfactant is removed by applying three methods: a) reflow in alcohol acidified with hydrochloric acid, b) treatment with ammonium nitrate and c) calcination [22].

2.2.2. Physicochemical characterization

2.2.2.1. MCM-41 morphology. The shape of the nanoparticles was observed via microphotographs obtained with: Transmission electron microscopy (TEM) LIBRA 120 PLUS by Carl Zeiss SMT; and Variable Pressure Scanning Electron Microscopes, of high resolution (FESEM) Zeiss SUPRA40VP; the nanoparticles were previously dispersed in water 8 [23].

2.2.2.2. Particle size and zeta potential. The size and PDI of the nanoparticles were determined by means of dynamic light scattering with Non-invasive Backscattering Optics (NIBS). For this, the mean particle size was determined by Malvern Zetasizer Nano ZS®; Malvern

Instruments Ltd, Malvern, UK), at 25.0 °C ± 0.5 °C. The average size is expressed in nanometers (nm).

The measurement of ζ-potentials has been carried out in the same device (Malvern Zetasizer Nano ZS®; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) using electrophoretic light scattering and a molecular weight analyzer with static light scattering. The colloidal dispersion is introduced partially diluted. ζ-potential is expressed in millivolts (mV).

In both cases, the measurements have been made to pH (2–11), and the ionic strength, using sodium chloride dilutions in a range of concentrations between 0.1 and 0.0001 mg/mL.

2.2.2.3. N₂ adsorption isotherms. For the determination of the specific surface area and pore size, the physical nitrogen adsorption isotherms method was used [24]. This method measures the quantity of gas absorbed by the material based on the pressure exercised, at a constant temperature. The results vary depending on the material, thereby providing information on the morphology of the same. The analysis was carried out in the TriStar 3000 V6.08 A device at a temperature of 196 °C. For this, 100 mg of sample were taken, previously vacuum degassed for a correct measure of the adsorbed quantity [25].

2.2.3. Encapsulation efficiency and drug loading

500 mg of MCM-41 were added to 10 mL of an ibuprofen solution of concentration 20, 40 and 60% (W/W) respect to weigh of MCM-41. Afterward, the suspensions were brought to equilibrium under magnetic stirring for 24 h. Subsequently, the suspensions were centrifuged twice (using a centrifuge, Eppendorf AG 5804 – Hamburg, at 5 g for 20 min), taking supernatants to measure the amount of ibuprofen. The second centrifugation removes the ibuprofen adsorbed on the surface. The measure was taken using a UV-VIS spectrophotometer (UV-Vis PerkinElmer Lambda 25) at 220 nm. The final product obtained is a dry powder after complete evaporation of hexane.

The amount of ibuprofen loaded can be determined by difference between the initial ibuprofen and the ibuprofen on the supernatants. Therefore, LD% (% Drug Loading) and EE% (% Encapsulation Efficiency) can be determined.

$$\%EE = \frac{\text{Weight of Ibuprofen Loaded}}{\text{Weight of Total Ibuprofen}}$$

$$\%LD = \frac{\text{Weight of Ibuprofen loaded}}{\text{Weight of MCM} - 41}$$

2.2.4. In vitro drug release

In vitro drug release study was performed using a dialysis membrane (2 kDa molecular weight cutoff Spectra/Por® 6) containing 100 mL of pH 7.4 phosphate buffer. 5 mL of SLNPs dispersion were placed in the dialysis membrane and both the ends were sealed with magnetic weighted closures (Spectra/Por Closures®). Then, the dialysis bag was kept in the receptor compartment containing dissolution medium (pH 7.4 phosphate buffer) at 37 °C ± 0.5 °C, which was stirred at 100 rpm for 48 h.

At regular time intervals of 0.3, 0.6, 1, 1.5, 2, 4, 6, 24 and 48 h, 1 mL samples were withdrawn and replaced with freshly prepared pH 7.4 phosphate buffer. The drug contents in the samples were analyzed spectrophotometrically at 200 nm by using a UV-VIS spectrophotometer (UV-Vis PerkinElmer Lambda 25) against the blank.

Different mathematical models were tested to choose one, which most reliably explains the release kinetics. One of the most widely used methods for the determination of the model that best explains the diffusion process [26]; therefore, AIC allows to find the function that more accurately fits to the drug release process. The criterion identifies the model that best fits the data as the one with the minimum value of AIC, and was calculated applying the following equation:

$$AIC = n * \ln SSQ + 2p$$

n: number of pairs of experimental values
 ln: Neperian logarithm
 SSQ: sum of residual squares
 p: number of parameters of the adjustment function
 The model that best fit the data was that with the lowest AIC.

2.2.5. Cytotoxicity

Toxicity was determined via the 'in vitro' testing in Human Embryo Kidney cells (reference no.: ECACC no.: 85120602 (batch cb2737) supplied by the stem cell bank of the CIC of the University of Granada) having an adherent epithelial morphology, karyotype 2n 46, hypotriploid, modal no. 64, and incubated at 37 °C. The viability of the cells was determined by colorimetry with the MTS reagent, with measurements at 4, 24 and 48 h. This reagent is a tetrazolium derivative, which by activity of the succinate dehydrogenase enzyme forms a dark purple colored compound that is quantified and thereby directly related with the cellular viability [27]. The Infiniteaquanona system was used for quantification.

In a plate of 96 wells, 3 nanoparticle concentrations were tested. Sample no. 1 had a concentration of 12 mg/mL [28] and samples no. 2 and 3 were prepared based on sample no. 1, applying a 1/5 and 1/10 dilution respectively. At the same time, from each sample, three (3) aliquots were prepared from each concentration, with their corresponding controls. In addition, an extra control was made with the suspension of nanoparticles and the medium without cells. First, it should be noted that the nanoparticles are colorless and therefore have no absorbance at the studied wavelength, and any interference by the same may also be ruled out.

3. Results and DISCUSSION

3.1. Synthesis of MCM-41

Silica Nanoparticles were firstly proposed by Ref. [29]; which their size could be controlled by working conditions. Particle synthesis was performed using the sol-gel method, which continues to be the most frequently used method for the preparation of silica nanoparticles (SINP) [30]. The method is based on a series of hydrolysis and condensation reactions of the tetraethyl orthosilicate (TEOS) precursor, which requires a supersaturated ammonium medium as a catalyst in a basic medium for the hydrolysis [31]. However, it is necessary to increase the specific surface of these nanoparticles (NPs); therefore, they are treated with surfactants in order to obtain porous NPs [32]. Using self-assembly synthesis [14], surfactant-assisted templating pathway or soft templating strategy, nanoporous materials are obtained [20] following the procedure show in Fig. 1. These compounds are classified into 3 types, based on their pore size: microporous (< 2 nm), mesoporous (2–50 nm) and macroporous (> 50 nm) [33].

To achieve the formulation with appropriate characteristics, several modifications were made. The first modification was the different solvent used, through an aqueous medium and a hydroalcoholic medium, to verify how the final size of the NPs affects. Another variant affected the alkalinity of the medium, using 1 or 2 M NaOH, but always with a basic medium so that the silica radicals were negatively charged and could bind to the cationic surfactant to carry out the reaction. Finally, the mechanism for the removal of the surfactant was analyzed: calcination, reflux in alcohol acidulated with hydrochloric acid and treatment with ammonium nitrate.

The change in solvent influenced the NPs size obtaining larger sizes due to the hydroalcoholic solvent, because as evidenced by other authors [20], the increase can be up to 5 or 6 times higher as shown in Table 1.

Regarding the pH, samples 1, 2 and 3 show more alkaline values. The pH has a decisive influence on the size of the NPs. The results find a decrease in size when the medium is more alkaline. Despite this, this is not always the case, as other authors show [33], which is probably due

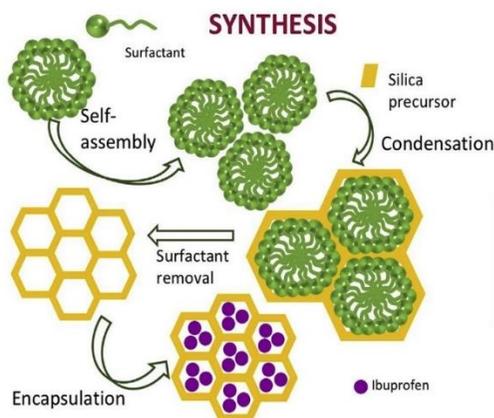


Fig. 1. Synthesis of MCM-41.

to the fact that other factors also influence pH.

The variants of the elimination method of the surfactant does not influence the morphology or the characteristics of the final NPs. These treatments break the electrostatic interaction that exists between the cationic surfactant and the anionic silicates, such that the release of the surfactant is facilitated, dragging and eliminating it, allowing the formation of porous nanoparticles. In the muffle furnace, Nps were obtained and stored. In addition, when the wet surfactant is removed, the Nps must be subjected to purification with the fil of removing possible remnants of the surfactant or other organic solvents. Studies conducted by Ref. [34]; obtained aggregated NPs using the calcination method. In this case, it was chosen to use calcination extraction despite its inconveniences.

3.2. Morphology study

In order to determine the surface morphology of the prepared NPs SEM and TEM images were taken. It is observed how most have a spherical shape. In the TEM images of Fig. 2 it can see the channels of mesoporous (Fig. 2e). Samples 1 and 2 showed the smallest size values, in contrast to samples 5, 6 and 7. Samples 3 and 4 have intermediate size values.

It was decided to select these last two samples (3 and 4) due to their size, to be photographed in FESEM (Fig. 3). Although its silhouette was spherical, it presented some typical irregularities showing an appearance fluffy due to the nanopores. High porosity was associated with a fast and easy diffusion of water and other fluids in and out from the matrix which can appreciate in release graph.

Fig. 4 represents the size distribution by intensity. A maximum peak of 160 nm can be seen and no other peaks were observed, according to the microscopy measurements showing a unimodal size distribution. Moreover, the curve has a narrow base, which suggests that the largest number of NPs are in this average and only a few NPs are over or under the size.

3.3. Physicochemical characterization

The zeta potential offers information on the surface charge of nanoparticles, permitting the assessment of the aggregation and the stability of the same. The results show a negative charge (Table 2) with values ranged between -12.3 mV (sample 2) and -29.0 mV (sample 6). In all cases, the nanoparticles obtained have a negative surface charge varying from one to others. All values are below the (-30 mV), what can be associated with dispersion stability [35].

Table 1
Outline of the synthesis of the samples 1–7.

SAMPLE Nº:		1	2	3	4	5	6	7
CTAB		0,2%	0,2%	0,2%	0,53%	0,5%	0,5%	0,5%
H ₂ O		97,3%	97,3%	97,3%	64,5%	59,3%	59,3%	59,3%
EtOH		–	–	–	34%	39,5%	39,5%	39,5%
NaOH		1,5% (2 M)	1,5% (2 M)	1,5% (2 M)	0,65% (1 M)	0,6% (1 M)	0,6% (1 M)	0,6% (1 M)
TEOS		0,97%	0,97%	0,97%	0,16%	0,15%	0,15%	0,15%
W	EtOH	–	–	–	3x	2x	2x	2x
A								
S								
H								
I								
N								
G								
HCl (37%)	H ₂ O	5x	5x	5x	2x	3x	3x	3x
Muffle		–	–	–	–	4 mL	–	–
		6 h,	–	24 h, 773 K	5 h,	–	5 h,	–
		773 K	–	–	773 K	–	773 K	–
Ammonium nitrate		–	10 mg/mL	–	–	–	–	10 mg/mL
Final Washing Procedure		–	2 x H ₂ O	–	–	2 x EtOH	–	3x EtOH

The variation of the zeta potential has been studied in function of the pH (from 2 to 11). Fig. 5, represents how the surface charge of the NPs evolves. In the first place it is positive, but it will grow until it reaches negative values. At a pH of 3.5 we find the isoelectric point. This is due to the presence of –OH groups found in the NPs [36]. The information in this technique allows us to predict the behavior of NPs in different biological fluids and precede the type of interactions with tissues and molecules of the organism.

Finally, using different NaCl concentrations at the pH of the different aqueous solutions, electrophoretic mobility was determined as a function of the ionic charge. Fig. 6 presents the variations produced in zeta potential in the studied NaCl concentration intervals (0.1–0.0005 mg/mL). At a low concentration (0.0005 mg/mL) the zeta potential is observed is the highest, remains negative. When the concentration of NaCl is 0.005 mg/L, the zeta potential falls dramatically, reaching values of –20 mV. From here, the increase in ClNa's agreement is minimal, with the values remaining between –20 and –15mV.

3.4. N₂ adsorption isotherms

According to the results of N₂ adsorption isotherms analysis on the classification of the IUPAC, the NPs corresponds to a type IV isotherm [37]. These are characteristics of mesoporous materials with strong interactions, indicating a permanent porosity [38]. The results analysis was carried out using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) model [39] which allows for the determination of the pore size and the specific surface area, obtaining a specific surface area of 1064.34 m²/g. Fig. 7, the change produced at a pressure of 0.1–0.3, highlighted with a circle, corresponding to mesopores and therefore, typical of this type of materials. The slope increases in function of pore size, obtaining a mean value of 2.42 nm and similar to the values obtained in other reviews using the same surfactants (CTAB) [4]. Pore size was obtained with the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) analytical model since it adjusts better to mesoporous materials [40]. The data shows that the flat part is reached approximately 25 mmol/g, indicating that the material does not collapse upon eliminating the solvent molecules and therefore, it is a very

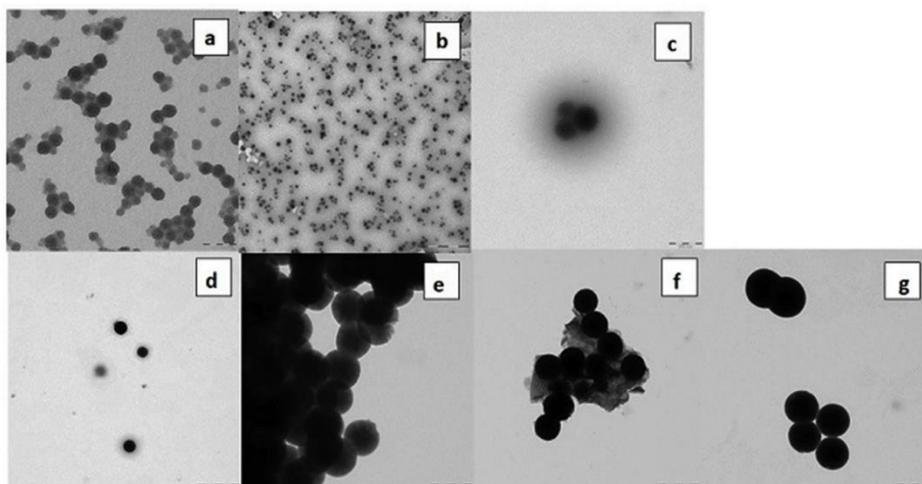


Fig. 2. Microphotographs obtained with TEM: a) Sample 1; b) sample 2; c) Sample 3; d) Sample 4; e) sample 5; f) sample 6; g) shows 7. Scale bar: a) 100 nm; b) 500 nm; c) 200 nm; d) 500 nm e) 500 nm; f) 1 μm; g) 500 nm.

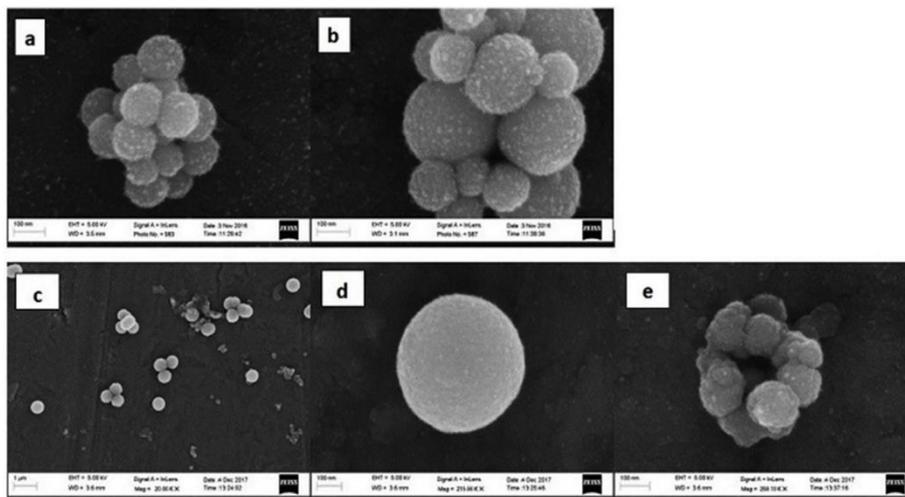


Fig. 3. Microphotographs obtained with SEM: a and b) sample 4; c, d and e) sample 3. Scale bar: all the bars correspond to a length of 100 nm, except that of the image c which is 1 µm.

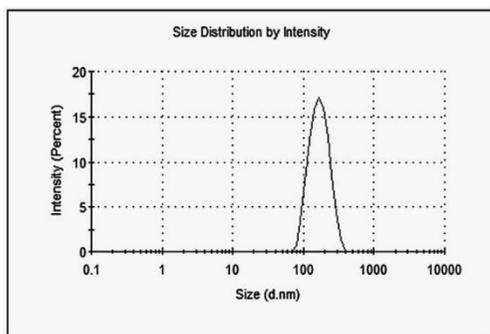


Fig. 4. Size distribution study for sample 3.

structurally stable.

Fig. 8 represents the changes in the curve when the nanoparticles are loaded with the drug and in which greater adsorption occurs in the nanoparticles without drugs. These results are associated with the fact that the pores are occupied by ibuprofen, reducing the specific area to 736.4616 ± 15.2942 m²/g. Finally, the presence of ibuprofen is highlighted in a circle, in this case of less quantity.

3.5. Effect of drug concentration on %EE

The main objective of the NPs is to act as Drug Delivery System. To do this, ibuprofen was selected because it is a conventional drug whose

pharmacological form could be improved in its administration. The encapsulation method is determined by the characteristics of the active substance itself. Ibuprofen is water soluble at a rate of 21 mg/mL, considered practically insoluble. So organic solvents such as hexane will be used to carry out the test. The results obtained from %EE of the 3 concentrations tested were as follows: for the concentration of 20%, an average of $77.31\% \pm 1.90$ was obtained; for the concentration of 40%, $63.63\% \pm 1.33$; and for the concentration of 60%, $59.94\% \pm 2.75$. Finally, the results of %LD were: for the 20%, $15.4\% \pm 1.38$; for the 40%, $25.50\% \pm 0.57$; and for the 60%, $35.96\% \pm 1.05$.

Fig. 9 shows the results. Comparing the results of % EE and % LD of the 3 concentrations studied, it can be established that as the concentration of ibuprofen increases % LD increases too, because the more ibuprofen, the more it is encapsulated. However, with more concentration of ibuprofen, the value of %EE decrease. Therefore, the concentration of 40% was chosen as the most appropriate due to it has a good value of % LD, so it is the efficient formulation even though its encapsulation efficiency value is lower.

3.6. In vitro drug release

The 40% sample was taken to perform the essay, so we found a concentration of 0.6 mg/mL ibuprofen inside the membrane. The release profile is shown in Fig. 10 with an exponential form, releasing the largest amount of drug in the first hours and reaching 57% at 6 h from the start. After 6 h, the release becomes more sustained over time and increases by 4% at 48 h. The first section corresponds to the release of ibuprofen contained in the pores and closer to the surface, while in the second stage the release is longer, releasing the ibuprofen from the

Table 2
Results of zeta potential and of sizes obtained with microscopy.

SAMPLE N°:	1	2	3	4	5	6	7
Z Potential (mV)	-24 ± 1,88	-12,3 ± 1,47	-21 mV ± 1,87	-27,3 ± 2,15	-18,1 ± 1,68	-29,0 ± 2,09	-26,4 ± 2,19
TEM	50-70 nm	20-40 nm	120-170 nm	100-130 nm	500-600 nm	500-600 nm	500 nm
SEM	-	-	150-200 nm	120-150 nm	-	-	-

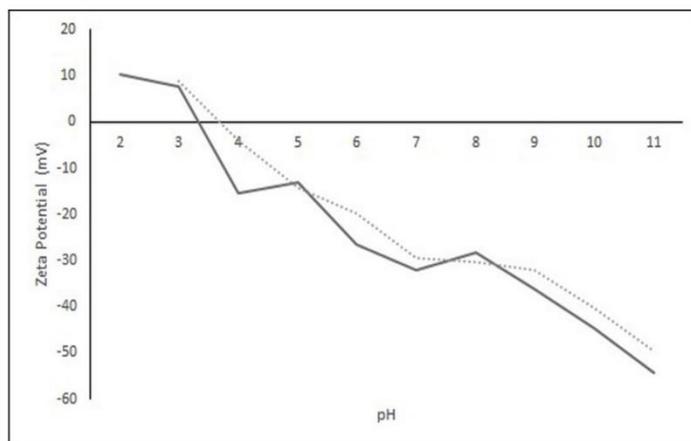


Fig. 5. Variation of Zeta potential depending on pH.

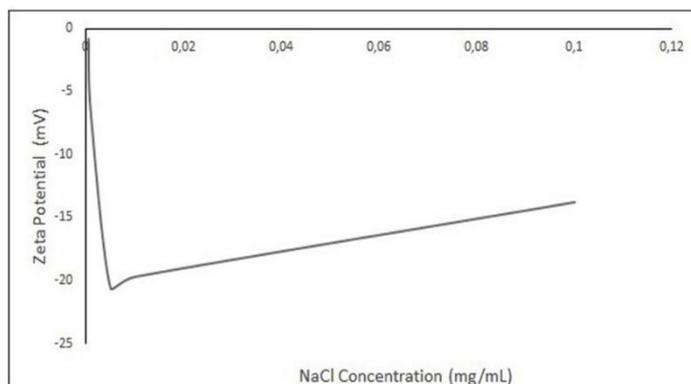


Fig. 6. Variation of the zeta potential depending on the ionic force of the medium.

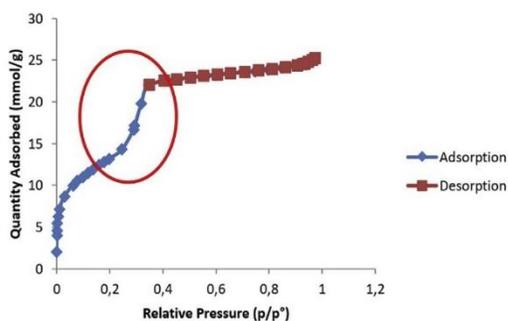


Fig. 7. Nitrogen absorption-desorption isotherms MCM-41.

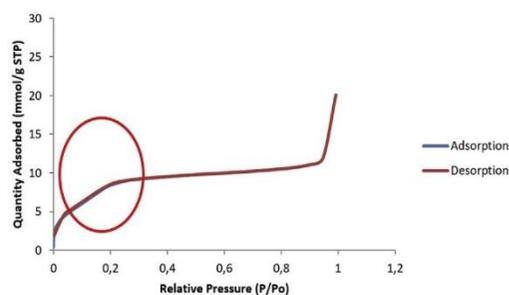


Fig. 8. Nitrogen absorption-desorption isotherms MCM-41 with ibuprofen.

inside [41].

The results were adjusted to mathematical models. Using the Akaike selection criteria, the kinetics that best explains the release model is that of square root or Higuchi. This kinetics is common in nanomaterials, while in the case of kinetics of order 0 or order 1 they usually conform more to conventional pharmaceutical forms. In this case, the percentage of drug released is proportional to the square root of time,

the surrounding fluid dissolving in the first section and spreading from the silica capillary channels in the second section [42].

3.7. Cytotoxicity

The ultimate goal of the NPs is therapeutic use. For this it is necessary to carry out a study of cellular toxicity. Fig. 11 represents the results obtained in the cell cytotoxicity study. It can be seen how the

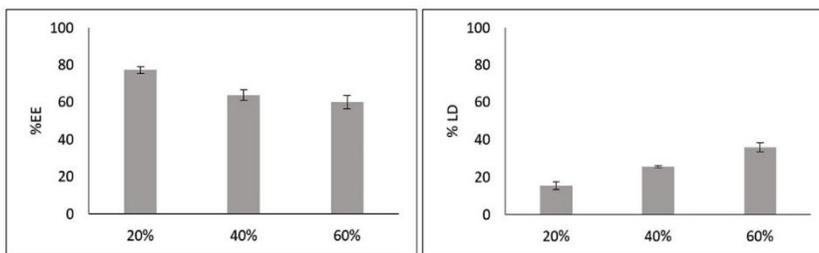


Fig. 9. Results from %EE and %LD

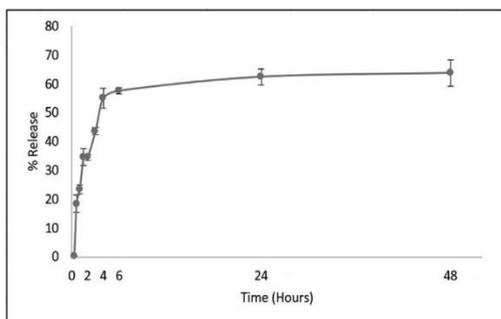


Fig. 10. 'In vitro' drug release.

most concentrated sample obtains low values of viability and thus maintaining it over time decreasing up to 60% at 24 h. Although, at 48 h, it increases to 70%, it remains a low value of % cellular viability. Acceptable feasibility values are shown in samples number 2 and 3, showing values above 100%, so concentrations under 2,4 mg/mL show good biocompatibility.

After the toxicity study, the microscopic observation of the cells was carried out. In the case of sample 1, the cells were plasmolized. However, in sample 2 and 3, the appearance was turgid, with no changes.

The results show a low cytotoxicity and a good biocompatibility, which is also supported by other works such as [39] or [43]; who studied different concentrations and found no negative effects on cells.

4. Conclusion

Mesoporous silica nanoparticles have been successfully synthesized by utilizing soft templating method, Nanoparticles with 150 nm of average size and a pore size around 2.4 nm were obtained which meet ideal conditions for use in biomedicine. These characteristics are presented in sample n° 3 with working conditions of a more alkaline medium, without EtOH in synthesis and using muffle to remove the surfactant. The ability of drug transport has been revealed with the encapsulation and release of ibuprofen achieving a drug encapsulation of almost 80% and a sustained drug release for 48 h. Consequently, we managed to improve poor aqueous solubility, low bioavailability, poor stability, bitter taste and unpleasant odor, translating into improving patient compliance. In addition, with sustained release, we get fewer doses necessary and reduce the adverse effects by improving the therapeutic effect.

Funding

This work was supported by Ministry of Universities (FPU18/00446) - Government of Spain.

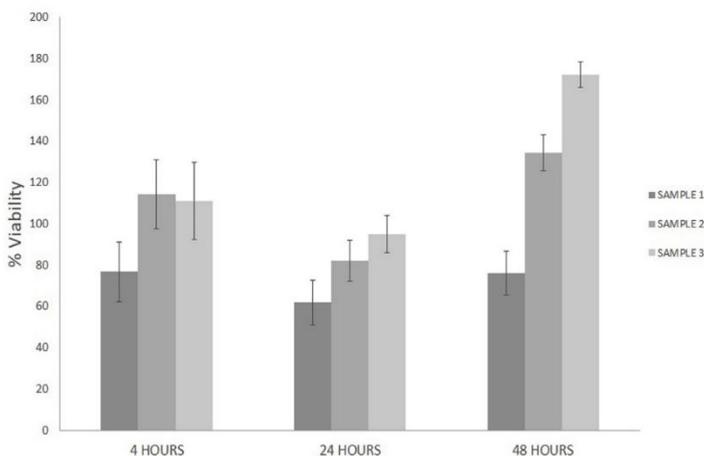


Fig. 11. % Viability of cells in contact with nanoparticles.

Author statement

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before.

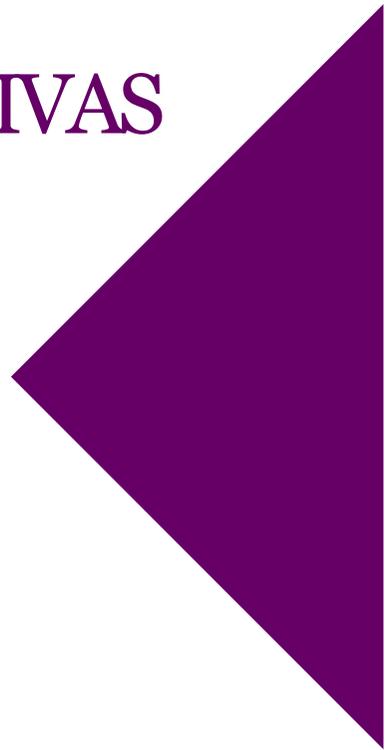
Declaration of competing interest

There are no conflicts of interest.

References

- [1] D.J. Angiolillo, S.M. Weisman, Clinical pharmacology and cardiovascular safety of Naproxen, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 17 (2) (2016) 97–107, <https://doi.org/10.1007/s40256-016-0200-5>.
- [2] S. Hariforoosh, W. Asghar, F. Jamali, Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications, *J. Pharmaceut. Sci.* 16 (5) (2013) 821–847, <https://doi.org/10.18433/J3VW2F>.
- [3] K. Brune, P. Patrignani, New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J. Pain Res.* 8 (2015) 105–118, <https://doi.org/10.2147/JPR.S75160>.
- [4] A. Maleki, H. Kettiger, A. Schoubben, J.M. Rosenholm, V. Ambrogi, M. Hamidi, Mesoporous silica materials: from physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs, *J. Contr. Release* 262 (2017) 329–347, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.047>.
- [5] S. Kumar, M.M. Malik, R. Purohit, Synthesis methods of mesoporous silica materials, *Mater. Today Proc.* 4 (2017) 350–357, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.032>.
- [6] B. Galija, Microsized and Nanosized Carriers or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. Formulation Challenges and Potential Benefits, Elsevier. Academic Press, Belgrade, Serbia, 2017.
- [7] C. Sostres, C.J. Gargallo, M.T. Arroyo, A. Lanás, Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24 (2010) 121–132, <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>.
- [8] C. Sostres, C.J. Gargallo, A. Lanás, AINEs y efectos adversos, *Web del dolor Oxford* 15 (2013) 1–8.
- [9] X. Lv, L. Zhang, F. Xing, H. Lin, Controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles: particle size tuning and formation mechanism investigation, *Microporous Mesoporous Mater.* 225 (2016) 238–244, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.12.024>.
- [10] D.H. Jo, Jin Hyoung Kim, T.G. Lee, Jeong Hun Kim, Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 11 (2015) 1603–1611, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>.
- [11] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: principles and applications, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 49 (2015) 114–151, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.079>.
- [12] J.G. Croissant, Y. Fatieiev, N.M. Khashab, Degradability and clearance of silicon, organosilica, silsesquioxane, silica mixed oxide, and mesoporous silica nanoparticles, *Adv. Mater.* 29 (2017), <https://doi.org/10.1002/adma.201604634>.
- [13] S.H. Wu, H.P. Lin, Synthesis of mesoporous silica nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3862–3875, <https://doi.org/10.1039/c3cs35405a>.
- [14] L. Latifi, S. Sohrabzad, M. Hadavi, Mesoporous silica as a support for poorly soluble drug: influence of pH and amino group on the drug release, *Microporous Mesoporous Mater.* 250 (2017) 148–157, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.05.026>.
- [15] J. Riikonen, W. Xu, V.P. Lehto, Mesoporous systems for poorly soluble drugs – recent trends, *Int. J. Pharm.* 536 (2018) 178–186, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.054>.
- [16] Song Y. Yihong, Q. Xu, Z. Liu, Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 87–110, <https://doi.org/10.2147/IJN.S117495>.
- [17] S. Molaei, T. Tamoradi, M. Ghadermazi, A. Ghorbani-Choghamarani, Synthesis and characterization of MCM-41@AMPD@Zn as a novel and recoverable meso-structured catalyst for oxidation of sulfur containing compounds and synthesis of 5-substituted tetrazoles, *Microporous Mesoporous Mater.* 272 (2018) 241–250, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.06.048>.
- [18] N. Mizoshita, H. Tanaka, Interface-assisted synthesis of mesoporous silica nanoparticles using neat tetraalkoxysilanes, *Microporous Mesoporous Mater.* 239 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.09.025>.
- [19] Y. Bao, C. Shi, T. Wang, X. Li, J. Ma, Recent progress in hollow silica: template synthesis, morphologies and applications, *Microporous Mesoporous Mater.* 227 (2016) 121–136, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.02.040>.
- [20] N. Pal, A. Bhaumik, Soft templating strategies for the synthesis of mesoporous materials: inorganic, organic-inorganic hybrid and purely organic solids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 189–190 (2013) 21–41, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.12.002>.
- [21] M. Brigante, M. Avena, Biotemplated synthesis of mesoporous silica for doxycycline removal. Effect of pH, temperature, ionic strength and Ca²⁺ concentration on the adsorption behaviour, *Microporous Mesoporous Mater.* 225 (2016) 534–542, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.01.035>.
- [22] M. Martínez-Carmona, A. Baeza, M.A. Rodríguez-Milla, J. García-Castro, M. Vallet-Regí, Mesoporous silica nanoparticles grafted with a light-responsive protein shell for highly cytotoxic antitumor therapy, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 5746–5752, <https://doi.org/10.1039/c5tb00304k>.
- [23] N. Lai, C. Lin, P. Ku, L. Chang, K. Liao, W. Lin, C. Yang, Hollow mesoporous Ia3d silica nanospheres with singleunit-cell-thick shell: spontaneous formation and drug delivery application, *Nano Res* 7 (2014) 1439–1448, <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0503-2>.
- [24] G. Mani, H. Pushparaj, M.M. Peng, P. Muthiahpillai, U. Udhumansa, H.T. Jang, Synthesis and characterization of pharmaceutical surfactant templated mesoporous silica: its application to controlled delivery of duloxetine, *Mater. Res. Bull.* 51 (2014) 228–235, <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.12.037>.
- [25] Y. Yang, G. Lv, W. Guo, L. Zhang, Synthesis of mesoporous silica-included heteropolyacid materials and the utilization for the alkylation of phenol with cyclohexene, *Microporous Mesoporous Mater.* 261 (2018) 214–219, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.11.018>.
- [26] J. Doménech, J. Martínez, J.M. Plá, *Biofarmacia Y Farmacocinética II, Síntesis*, Madrid, Spain, 1998.
- [27] E. De Luna-Bertos, J. Ramos-Torrecillas, F.J. Manzano-Moreno, O. García-Martínez, C. Ruiz, Effects on growth of human osteoblast-like cells of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs: metamizole, dexketoprofen, and ketorolac, *Biol. Res. Nurs.* 17 (2015) 62–67, <https://doi.org/10.1177/1099800414527155>.
- [28] T. Heikkilä, H.A. Santos, N. Kumar, D.Y. Murzin, J. Salonen, T. Laaksonen, L. Peltonen, J. Hirvonen, V.P. Lehto, Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 483–494, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.12.006>.
- [29] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- [30] R. Diab, N. Camilho, L.A. Pavel, F.B. Haffner, M. Girardon, A. Pasc, Silica-based systems for oral delivery of drugs, macromolecules and cells, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 346–362, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.005>.
- [31] K. Zheng, A.R. Boccacini, Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: a review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 363–373, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [32] H. Mekar, J. Lu, F. Tamanoi, Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 95 (2015) 40–49, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.009>.
- [33] G. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C.-M. Han, C. Mahapatra, H.-W. Kim, J.C. Knowles, Sol-gel based materials for biomedical applications, *Prog. Mater. Sci.* 77 (2016) 1–79, <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001>.
- [34] V. Cauda, C. Argyo, D.G. Piercey, T. Bein, “Liquid-Phase calcination” of colloidal mesoporous silica nanoparticles in high-boiling solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6484–6486, <https://doi.org/10.1021/ja1067492>.
- [35] M. Hans, A. Lowman, A dual-responsive mesoporous silica nanoparticle for tumor-triggered targeting drug deliveries for drug delivery and targeting, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6 (2002) 319–327, [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1).
- [36] J.L. Arias, M.A. Ruiz, V. Gallardo, Á.V. Delgado, Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles, *J. Contr. Release* 125 (2008) 50–58, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.008>.
- [37] H. He, H. Xiao, H. Kuang, Z. Xie, X. Chen, X. Jing, Y. Huang, Synthesis of mesoporous silica nanoparticle-oxalipatin conjugates for improved anticancer drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117 (2014) 5–81, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.014>.
- [38] M. Manzano, V. Aina, C.O. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regí, Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization, *Chem. Eng. J.* 137 (2008) 30–37, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.078>.
- [39] X. Zhang, Y. Zhao, S. Xie, L. Sun, Fabrication of functionalized porous silica nanoparticles and their controlled release behavior, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 37 (2017) 38–45, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.11.005>.
- [40] J. Villarreal-Rocha, D. Barrera, K. Sapag, Introducing a self-consistent test and the corresponding modification in the Barrett, Joyner and Halenda method for pore-size determination, *Microporous Mesoporous Mater.* 200 (2014) 68–78, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.08.017>.
- [41] V.A. Tran, S.W. Lee, A prominent anchoring effect on the kinetic control of drug release from mesoporous silica nanoparticles (MSNs), *J. Colloid Interface Sci.* 510 (2018) 345–356, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.072>.
- [42] A. Farooq, A. Shukur, C. Astley, L. Tosheva, P. Kelly, D. Whitehead, M. Azzawi, Titania coating of mesoporous silica nanoparticles for improved biocompatibility and drug release within blood vessels, *Acta Biomater.* 76 (2018) 208–216, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.024>.
- [43] É. Pérez-Esteve, M. Ruiz-Rico, C. De La Torre, E. Llorca, F. Sancción, M.D. Marcos, P. Amorós, C. Guillel, R. Martínez-Máñez, J.M. Barat, Stability of different mesoporous silica particles during an *in vitro* digestion, *Microporous Mesoporous Mater.* 230 (2016) 196–207, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.05.004>.

**CAPÍTULO II:
ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**



1. Enfermedades neurodegenerativas

Actualmente vivimos en una sociedad liderada por los avances científicos y técnicos, acompañados de una mejora en la alimentación, en las condiciones higiénicas y el control de las enfermedades infecciosas, es decir, en una sociedad avanzada. Este sistema de bienestar nos ha permitido que, en apenas 50 años, se haya duplicado prácticamente la esperanza de vida al nacer, siendo esta para los habitantes de la Unión Europea 78,4 y 83,8 años para hombres y mujeres respectivamente; a su vez, siendo inferior a la esperanza media de los españoles que es 80,9 y 86,2 para hombres y mujeres respectivamente.

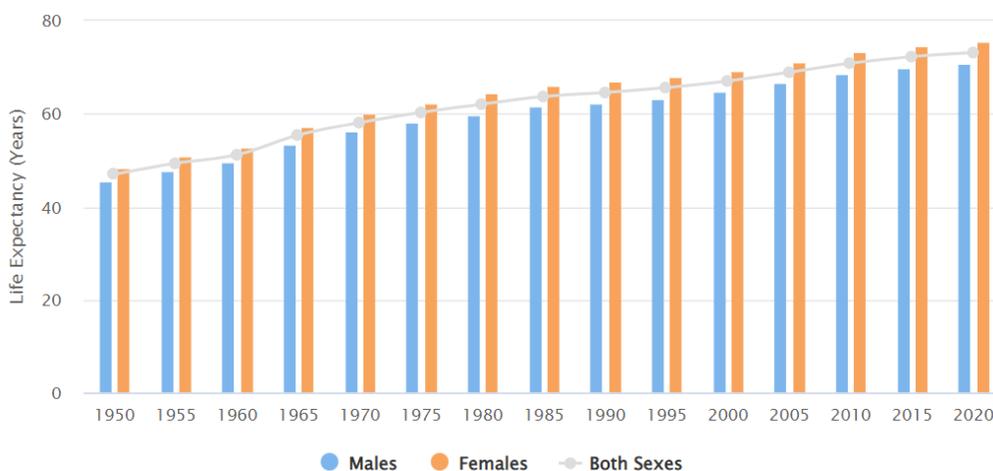


Figura 17: Esperanza de vida desde 1950 hasta la actualidad (Worldometer., 2023).

Este hecho se traduce en que nuestro organismo se ha visto sometido de forma apresurada a una serie de avances científico-técnicos, socioeconómicos y ambientales para los cuales no ha tenido tiempo de adaptarse mostrando así, ineludiblemente, limitaciones a la

hora de dar soporte a un cuerpo que no está programado para durar tanto.

Una manifestación directa de ese aumento en la esperanza de vida la encontramos cuando abordamos el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Y es que, tras años de investigación, todavía hay mucho desconocimiento acerca de los mecanismos biológicos y ambientales que causan estas enfermedades. De ahí que se esté convirtiendo en una de las primeras causas de muerte, sobre todo en ancianos. Por ello, dado que no hay actualmente un tratamiento eficaz, el objetivo sigue siendo buscar, prevenir o retrasar la aparición, y una vez establecida la enfermedad, alargar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes (Garcés, 2016).

La neurodegeneración se refiere al proceso progresivo de pérdida estructural y funcional del sistema nervioso. Incluye hechos como la muerte celular, la baja o nula regeneración axonal, la desmielinización, en definitiva, déficits neuronales en general. Todos estos eventos, parcial o totalmente, solitarios o combinados, genéticos o adquiridos, conocidos o desconocidos en su origen, se manifiestan en trastornos neurológicos específicos, conocidos colectivamente como enfermedades neurodegenerativas. Estas enfermedades ponen en peligro el funcionamiento normal del cerebro y conducen a la progresiva disminución o incluso la pérdida completa de la función sensorial, motora y cognitiva. Como resultado, se producen deficiencias sinápticas, muerte celular masiva, inflamación, pérdida temporal o permanente de varias acciones corporales como el movimiento coordinado (ataxias), así como diferentes habilidades cognitivas, como

la memoria (demencia), la toma de decisiones, el habla, la respiración y la función cardíaca, entre otras (Hussain et al., 2018).

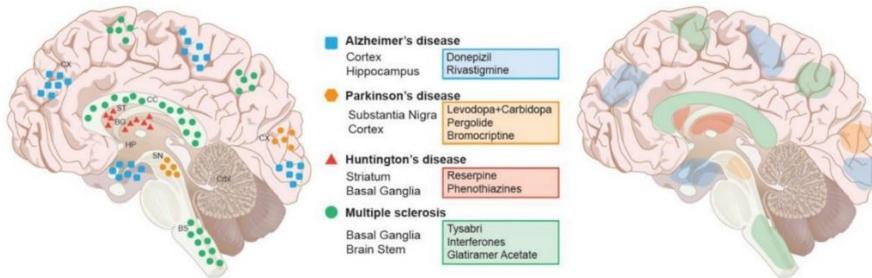


Figura 18: Principales enfermedades neurodegenerativas, sus regiones asociadas e intervenciones terapéuticas actuales. Cerebro izquierdo: los trastornos cerebrales se muestran en colores y en áreas representativas del cerebro. Cerebro derecho: tratamientos farmacológicos actuales y sus áreas de actividad dentro del cerebro.

Abreviaturas: Ganglios basales (BG), Tronco cerebral (BS), Cerebelo (Crbl), Cuerpo caloso (CC), Corteza (CX), Hipocampo (Hp), Estriado (St), Substantia Nigra (SN) (Hussain et al., 2018).

1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más frecuente de enfermedad neurodegenerativa, llegando a un 60-80% de los casos totales. Desde que se descubrió en 1907, todavía no tenemos las causas exactas por las que se produce la enfermedad ni el tratamiento eficaz; solamente sabemos que tiene varias etiologías, una de origen genético (que solamente representa el 1% de los casos) o de origen desconocido (Tatulian, 2022).

Esta patología se caracteriza por el deterioro progresivo del SNC en el que se aprecian daños bioquímicos, neurofisiológicos, neuroanatómicos y cognitivos al encontrarse una agregación anormal de proteínas. Van a destacar dos: en primer lugar, placas de la proteína beta-amiloide ($A\beta$); y, en segundo lugar, ovillos neurofibrilares de la proteína tau

hiperfosforilada (NFT). Estas acumulaciones causan disfunciones localizadas en las dendritas, en los procesos axonales y en las sinapsis. Durante varias décadas se han investigado numerosas estrategias terapéuticas en ensayos clínicos, pero los tratamientos disponibles en la actualidad se centran en aliviar los síntomas, en lugar de ofrecer terapias curativas reales. Como resultado, se ha puesto mayor atención en la prevención y reducción del riesgo de la EA. La investigación ha demostrado que más del 30% de los casos de EA a nivel mundial podrían estar relacionados con factores de riesgo modificables, lo que proporciona objetivos interesantes y prometedores para estrategias de prevención que reduzcan el riesgo de deterioro cognitivo asociado y posiblemente con enfermedades neurodegenerativas en general (Passeri et al., 2022). Recientemente, la FDA aprobó el uso del anticuerpo Aducanumab, que se dirige a las placas de A β . Las cualidades que deben presentar los medicamentos aprobados para la EA son una penetración efectiva de la barrera hematoencefálica y una biodisponibilidad suficiente para ejercer su efecto (Shivananjegowda et al., 2023).

1.2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno crónico neurodegenerativo que afecta al Sistema Nervioso de manera crónica y progresiva. Es la segunda enfermedad más prevalente en la actualidad después del Alzheimer y pertenece a los llamados trastornos del movimiento.

Se conoce comúnmente como enfermedad de Parkinson en referencia a James Parkinson, el doctor que la describió por primera vez en 1817 en

su monografía “Un ensayo sobre la parálisis agitante” (“An essay on the shaking palsy”) (Jost & Reichmann, 2017).

1.3. Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno crónico autoinmune multifocal caracterizado por lesiones desmielinizantes inflamatorias que afectan a la materia blanca y gris de todo el sistema nervioso. La acumulación constante de daños a lo largo del tiempo conduce a una discapacidad irreversible que caracteriza las etapas avanzadas de la enfermedad, por ello, la inflamación y la neurodegeneración van a presentarse de forma diferente según el estadio de la enfermedad, cambiando entre distintos pacientes, pero también en un mismo paciente con el tiempo. Afecta aproximadamente a 2,5 millones de personas en todo el mundo, con un impacto económico social significativo (McGinley et al., 2021; Travers et al., 2022).

La causa de EM no está definida tampoco, se sabe que al igual que otras enfermedades neurodegenerativas se ve afectada por factores genéticos y ambientales, tales como los bajos niveles de vitamina D, la radiación UV ambiental, infección por el virus Epstein-Barr, y fumar tabaco, entre otros (Dobson & Giovannoni, 2019).

Las presentaciones clásicas de la EM incluyen neuritis óptica unilateral (visión borrosa con dolor asociado), mielitis parcial (alteración de la sensibilidad, debilidad y/o ataxia en extremidades y tronco), trastorno sensorial focal (parestias en las extremidades, opresión abdominal o torácica) o síndromes del tronco cerebral (oftalmoplejía, vértigo, pérdida de audición, alteración sensorial facial).

Las terapias de la enfermedad se han ampliado enormemente en las últimas décadas, mejorando el pronóstico para los pacientes con EM. El tratamiento actual para la EM consiste en un enfoque multidisciplinario que incluye terapias que retrasen el avance de la enfermedad, tratamiento sintomático, modificaciones de estilo de vida, apoyo psicológico e intervenciones de rehabilitación (McGinley et al., 2021).

1.4. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa multisistémica con heterogeneidad de la enfermedad a nivel clínico, genético y neuropatológico, que provoca el deterioro progresivo y la pérdida de la función de las neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal, lo que lleva a la parálisis.

Hay un alto grado de variabilidad en la edad de inicio, el sitio de inicio y la progresión de la enfermedad. Se caracteriza por la debilidad muscular progresiva, acompañada de atrofia muscular, fasciculaciones, calambres musculares y lentitud de los movimientos con rigidez muscular. El fallo de las neuronas motoras a nivel cerebral da como resultado aumento del tono muscular, lentitud de movimientos e hiperreflexia. La interrupción de las neuronas motoras de la médula espinal y el tronco encefálico se manifiesta primero por espasmos musculares espontáneos o fasciculaciones, y luego se atrofia progresivamente cuando se pierden las sinapsis que conectan los músculos. Esto tiende a comenzar en las extremidades y progresa al ojo y las neuronas del músculo del esfínter en las últimas etapas. Desafortunadamente, los pacientes con ELA son conscientes de que su capacidad para funcionar disminuye

gradualmente, pero, por lo general, conservan funciones mentales superiores, como la resolución de problemas, el razonamiento, la comprensión y la memoria

Similar a otras condiciones neurodegenerativas, ELA se cree que es causada por una combinación de factores genéticos, factores ambientales y disfunción relacionada con el envejecimiento. A nivel genético, más de 20 genes han estado relacionados con la enfermedad hasta la fecha, y se prevé que se descubrirán más factores genéticos (Feldman et al., 2022; Hulisz, 2018; Masrori & Van Damme, 2020).

1.5. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo mutante autosómico dominante y progresivo que se presenta con manifestaciones como corea (movimientos involuntarios repetitivos, breves, irregulares) y distonía, falta de coordinación, deterioro cognitivo y dificultades conductuales. Por lo general, los síntomas aparecen en la mediana edad, pero el trastorno puede manifestarse en cualquier momento de la vida de la persona.

La proteína mutante en la enfermedad de Huntington, llamada huntingtina, es el resultado de una repetición CAG en el gen de la huntingtina (HTT) en el cromosoma 4, que produce una cadena de poliglutamina de longitud variable en el extremo N-terminal. Las evidencias sugieren que esta cola confiere una función tóxica. A pesar de ello, los mecanismos fisiopatológicos no se comprenden del todo, pero las investigaciones actuales están centradas en las causas y en los posibles tratamientos. El HTT da como resultado disfunción y muerte

neuronal a través de varios mecanismos. Los cambios neuropatológicos son selectivos, con una notable pérdida celular y atrofia en el cuerpo estriado y el putamen. En las etapas sintomáticas tempranas de EH, el cerebro puede estar libre de neurodegeneración. Sin embargo, hay abundante evidencia de disfunción neuronal, incluso en individuos asintomáticos. La naturaleza de la enfermedad hace posible que el diagnóstico se pueda hacer antes del inicio de los síntomas. El diagnóstico temprano es una ventaja crucial, ya que la terapia puede comenzar antes de que ocurra una pérdida neuronal importante, momento en el cual puede ser más difícil frenar la progresión e imposible corregir los déficits existentes. Actualmente no hay un medicamento terapéutico para la enfermedad, las estrategias se centran en tratar la sintomatología asociada y así mejorar la calidad de vida del paciente (Andhale & Shrivastava, 2022; Jimenez-Sanchez et al., 2017; Mccolgan & Tabrizi, 2018; Walker, 2007).

Seguidamente vamos a describir con más detalle la enfermedad de Parkinson, motivo principal de esta Tesis Doctoral.

2. Enfermedad de Parkinson

2.1. Concepto y epidemiología

La enfermedad de Parkinson es un trastorno crónico neurodegenerativo común caracterizado principalmente por el fallo progresivo e irreversible de las actividades motoras debido a una pérdida neuronal de la sustancia negra lo que supone una denervación dopaminérgica del

cuerpo estriado, con la insuficiente liberación de dopamina (Badanjak et al., 2021b). El principal factor de riesgo es la edad afectando sobre todo a personas mayores de 65 años, aumentando la prevalencia, incluso, hasta 10 veces a partir de los 80 años y sigue siendo más frecuente en hombres que mujeres (Simon et al., 2020). Cómo podemos ver en la imagen 19, en los últimos años se han triplicado los casos de esta enfermedad en nuestro país.

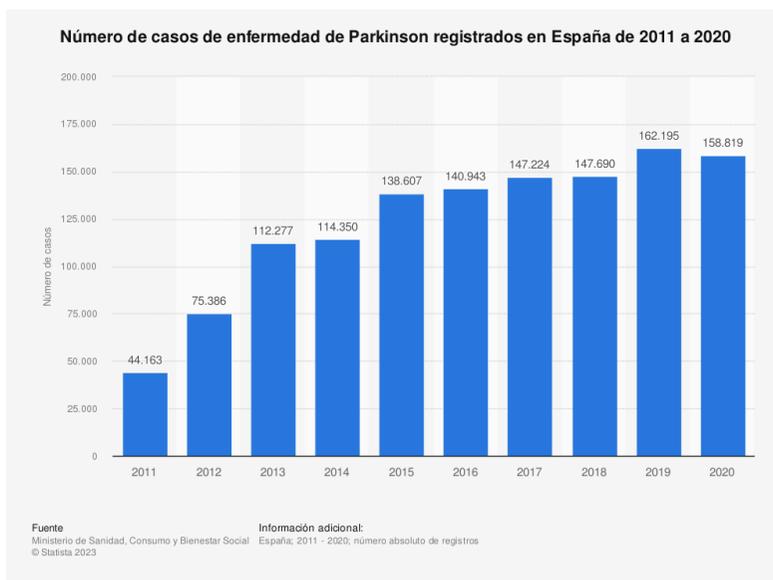
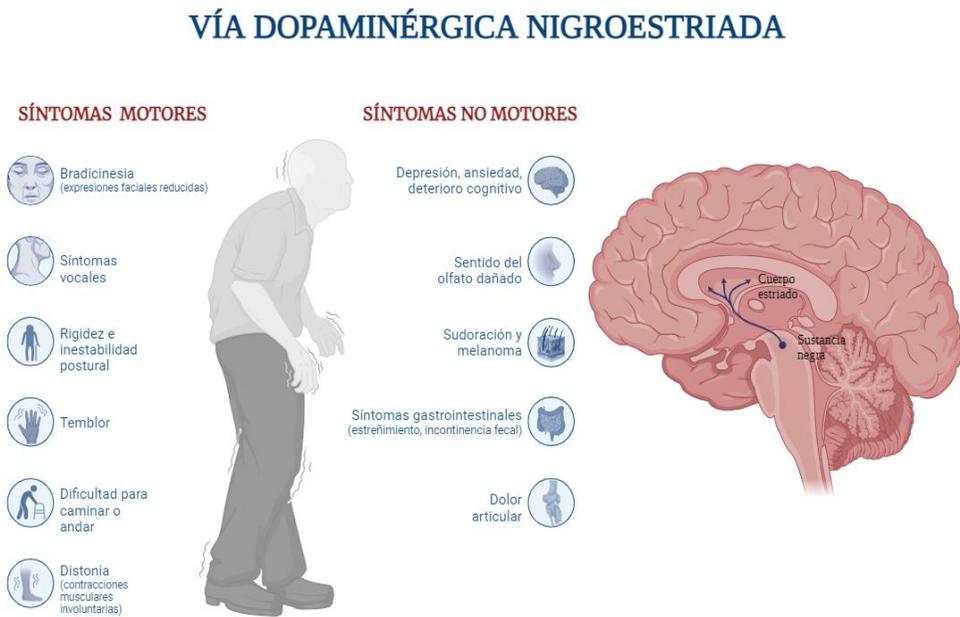


Figura 19: Casos de enfermedad de Parkinson en los últimos años (Ministerio de Sanidad, 2022).

La degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas que se extienden desde la sustancia negra pars compacta hasta el cuerpo estriado (caudado y putamen) es responsable de la pérdida de la neurotransmisión de dopamina, lo cual desencadena los síntomas motores primarios de la enfermedad de Parkinson, tales como temblor en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural. Aunque inicialmente se consideraba que la enfermedad de Parkinson era un

trastorno exclusivamente motor sin demencia, ahora se reconoce que su progresión también afecta a otros sistemas dopaminérgicos, colinérgicos y serotoninérgicos fuera de la sustancia negra, lo que resulta en síntomas no motores como anosmia, trastornos del sueño y estreñimiento, además de síntomas cognitivos y psiquiátricos como demencia y depresión (Pajares et al., 2020; Simon et al., 2020).

Figura 20: Representación de la vía dopaminérgica nigroestriada y los principales



síntomas de la denervación de esta. Creado con BioRender.

2.2. Etiología

La causa exacta por la que se desarrolla la EP se desconoce en gran medida. Recientes investigaciones apuntan una enfermedad de tipo multifactorial en la que intervienen causas genéticas, ambientales y el envejecimiento (Chia et al., 2020). Ya se han identificado varios genes y factores de riesgo que alteran la función del sistema inmune en EP, y cada vez hay más evidencias de la asociación con la exposición ante

ciertos patógenos como virus o bacterias. La evidencia genética se encuentra presente en el 5-10% de los casos (mutaciones en los genes PARK que codifican alfa-sinucleína, DJ-1, PINK, LRRK2, etc.), siendo responsable del inicio temprano de la EP. Sin embargo, estas mutaciones están ausentes en la mayoría de los casos, siendo estos de carácter idiopático y están asociados con el envejecimiento junto con otros factores de riesgo como toxinas ambientales, pesticidas, metales pesados, lesiones traumáticas e infecciones bacterianas o virales, todos los cuales están estrechamente relacionados con la inflamación (Pajares et al., 2020). Curiosamente, los pacientes que presentan la misma mutación genética no tienen manifestaciones clínicas similares, lo que sugiere que la etiología de la enfermedad está compuesta por una interacción compleja entre distintos factores ambientales, la edad y factores genéticos. Esto ha llevado a la hipótesis de que las interacciones complejas entre genes y entornos se combinan con un sistema inmune “envejecido” para crear el ambiente perfecto para el desarrollo de EP (Tansey et al., 2022).

2.3. Fisiopatología

La causa exacta de la muerte de las neuronas en la enfermedad de Parkinson sigue siendo desconocida en la mayoría de los casos. Sin embargo, se ha observado que la aparición de biomarcadores y el inicio de la enfermedad ocurren décadas antes de que aparezcan los primeros síntomas. La EP se considera un trastorno multisistémico caracterizado por neuroinflamación y disfunción del sistema inmune (Tansey et al., 2022).

Aunque la muerte acelerada de las neuronas dopaminérgicas es una característica principal de la enfermedad de Parkinson, los mecanismos neurofisiopatológicos involucran una compleja red de circuitos motores y no motores. Se estima que, al momento del diagnóstico, ya se ha perdido hasta el 60% de las neuronas dopaminérgicas. La pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia negra provoca una disminución de dopamina en el estriado, lo que resulta en un desequilibrio entre las vías directas (activadoras) e indirectas (inhibitorias) a través de los ganglios basales, lo que se traduce en bradicinesia. Además, la pérdida de neuronas se acompaña de despigmentación de la sustancia negra pars compacta (SNpc) y la presencia de cuerpos de Lewy (Lewy bodies, LBs). Los LBs son inclusiones intraneuronales redondas y eosinofílicas, compuestas principalmente por α -sinucleína y ubiquitina, entre otras proteínas (Bloem et al., 2021).

La α -sinucleína se encuentra normalmente en las sinapsis, donde se cree que desempeña una función en la regulación de las vesículas sinápticas. También se encuentra en células no neuronales, como el hígado, los músculos, los linfocitos y los glóbulos rojos, aunque su función precisa no está completamente establecida (Simon et al., 2020).

La agregación anormal de α -sinucleína resulta tóxica para las neuronas dopaminérgicas, lo que conduce a la neurodegeneración asociada con la EP. El estrés oxidativo, las mutaciones genéticas y la sobreexpresión de α -sinucleína pueden influir en los cambios conformacionales y la agregación de la proteína (Jankovic & Tan, 2020). La α -sinucleína tiene la tendencia a plegarse incorrectamente, volverse insoluble y formar agregados amiloides ricos en láminas β , los cuales se acumulan y forman

inclusiones intraneuronales tóxicas. Estos agregados provocan disfunciones en la vía dopaminérgica, afectando la función de las mitocondrias, los lisosomas y el transporte de vesículas, causando daño en las membranas biológicas y el citoesqueleto, alteraciones en el transporte sináptico y neuroinflamación (Bloem et al., 2021; Vijiaratnam et al., 2021). Algunos estudios sugieren que la agregación de α -sinucleína puede comenzar en los plexos autónomos del intestino y propagarse hacia el cerebro, y que esto podría estar influenciado por el microbioma intestinal (Balestrino & Schapira, 2020). De hecho, se han reportado agregados de α -sinucleína en el intestino de personas sin problemas neurológicos aparentes. Además, alrededor del 10% de las personas que fallecen sin haber sido diagnosticadas con Parkinson muestran agregados de α -sinucleína en el cerebro y presentan una leve pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Estas observaciones sugieren que estas personas tenían un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson si hubieran vivido más tiempo (Simon et al., 2020).

Existen evidencias de una conexión entre el intestino y el cerebro que parece ser un factor contribuyente en el desarrollo de la EP. Los nervios vagos desempeñan un papel importante al actuar como una vía de transmisión para la acumulación de la proteína α -sinucleína desde el tracto gastrointestinal hacia el tronco encefálico inferior (H.-X. Fan et al., 2022). Aunque este descubrimiento es prometedor, se necesitan más investigaciones para comprender mejor el papel de la microbiota gastrointestinal, la disbiosis, las infecciones y la inflamación en el inicio de la acumulación de α -sinucleína y su propagación al sistema nervioso

central como un mecanismo patogénico en la enfermedad de Parkinson (Jankovic & Tan, 2020).

Además, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de neuroinflamación asociado al estrés oxidativo en la EP. Aunque se ha visto que no es específica de esta enfermedad y que está implicada en otros trastornos cerebrales, tiene un papel muy importante en la degeneración dopaminérgica y entender su mecanismo puede ser útil para el desarrollo de nuevas terapias (Kaur et al., 2017). Este mecanismo de neuroinflamación incluye la activación de la microglía y astrocitos en la sustancia negra afectando a la denervación dopaminérgica, agregación de la α -sinucleína y en el proceso neurodegenerativo. Además de la microgliosis y la astrogliosis, la inflamación periférica y los genes asociados al riesgo de EP contribuyen a la respuesta inflamatoria crónica de esta enfermedad (Pajares et al., 2020). Los procesos inflamatorios se consideran un "arma de doble filo": por un lado, ayudan a eliminar toxinas y patógenos indeseados, mientras que, por otro lado, promueven la citotoxicidad y la neurodegeneración. Varios estudios han sugerido mecanismos de respuesta inmunitaria y cómo pueden influir en la muerte celular neuronal en la enfermedad de Parkinson (Badanjak et al., 2021b).

Existe una fuerte correlación entre el Parkinson, el desequilibrio redox y la inflamación crónica. Se han encontrado niveles elevados de mediadores inflamatorios y biomoléculas oxidadas en el líquido cefalorraquídeo y en muestras *postmortem* de pacientes con Parkinson (P.-F. Zhang & Gao, 2022).

Las neuronas dopaminérgicas están expuestas a niveles altos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que se generan a partir de diferentes fuentes, incluyendo la degradación de la dopamina y la pérdida de proteostasis (siendo incapaz de eliminar las proteínas defectuosas y contribuyendo al neuroenvejecimiento), lo cual favorecerá la agregación y modificación oxidativa de varias proteínas, incluyendo la α -sinucleína. Los radicales libres de oxígeno (RLO) desempeñan un papel en las células fagocíticas como moléculas señalizadoras, pero también pueden causar daño molecular en el ADN, proteínas y lípidos ya que la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) está disminuida y no puede eliminarlos. Por otra parte, en el cerebro de los pacientes con Parkinson, la actividad de la NAPH oxidasa microglial también está sobreactivada y puede causar daño directo a las neuronas y activar señales de citoquinas inflamatorias, lo que resulta en un círculo vicioso de daño neuronal (Pajares et al., 2020).

El mecanismo comienza con la activación de la microglía de forma fisiológica, que constituye un mecanismo de defensa para la eliminación de las neuronas muertas. Con la activación de estas células se producen moléculas proinflamatorias para que se inicie la respuesta inflamatoria y se eliminen las células dañadas por fagocitosis. Las sustancias producidas son: prostaglandinas, quimiocinas, citocinas, proteínas del complemento, RLO y especies reactivas de nitrógeno, incluyendo óxido nítrico (NO). Además de encontrarse elevadas en el sistema nervioso central, las citocinas también se encuentran en la circulación periférica de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Las citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , inducen la producción de

especies reactivas tóxicas a través de enzimas como la sintasa de óxido nítrico (iNOS) o la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Este estrés oxidativo contribuye a la disfunción mitocondrial, la toxicidad del NO y a la inflamación. El problema se presenta cuando, se produce una sobreactivación de la microglía, y los mecanismos de control empiezan a fallar provocándose un daño incontrolado que va a dar lugar a la fagocitosis de neuronas dopaminérgicas sanas, además de las dañadas, cerrándose por tanto ese círculo vicioso que lleva a la muerte celular progresiva(Cebrián & Sulzer, 2017; T.-W. Liu et al., 2022) .

En resumen, la neuroinflamación sistémica en pacientes con enfermedad de Parkinson agrava los eventos patogénicos, los síntomas motores y la disfunción neuronal. La activación de la microglía y la liberación de citocinas proinflamatorias juegan un papel importante en este proceso. Aunque se han investigado terapias antiinflamatorias, su éxito ha sido limitado hasta la fecha.



Figura 21: Teoría del estrés oxidativo. DA: dopamina, MAO-B: monoaminoxidasa-B, AHV: ácido homovanílico, RLO: radicales libres de oxígeno, SOD: superóxido dismutasa, PG: prostaglandinas, QC: quimiocinas, NO: óxido nítrico.

2.4. Tratamiento

Después de más de 200 años desde que James Parkinson descubrió la enfermedad, seguimos sin tener una terapia neuroprotectora efectiva para la EP. Es cierto que, en los últimos años, ha habido un gran progreso en la comprensión de la base molecular de la neurodegeneración, pero actualmente las terapias que se encuentran disponibles solamente consiguen mejorar la sintomatología derivados de la pérdida y muerte neuronal (Simon et al., 2020).

Al inicio de la enfermedad predominan los síntomas motores que responden a fármacos dopaminérgicos. Cuando la enfermedad se encuentra más avanzada, los problemas a resolver son las fluctuaciones motoras y no motoras derivadas de la neurodegeneración y de la propia medicación dopaminérgica, así como síntomas motores y no motores que no responden a la levodopa (Chia et al., 2020).

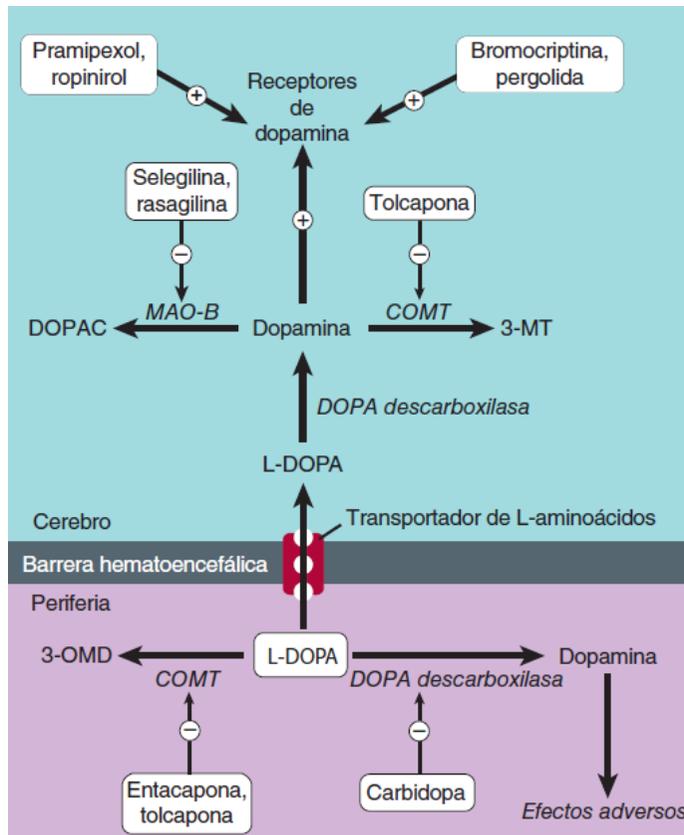


Figura 22: Principales fármacos utilizados en EP y su lugar de acción. Modificado de (Ahmed & Jabeen, 2020).

Así la mayoría de los fármacos antiparkinsonianos están diseñados para restituir, simular o mejorar temporalmente los niveles de dopamina consiguiendo mejorar los síntomas. La mayoría de los fármacos pretenden aliviar la rigidez muscular, mejorar la velocidad y coordinación del movimiento, así como reducir los temblores.

En la siguiente tabla se recoge el arsenal terapéutico disponible en España para paliar la EP.

Grupo farmacológico	Presentación
Precusores de la dopamina (Levodopa, carbidopa)	Sinemet® Duodopa®
Agonistas dopaminérgicos (Bromocriptina, pramipexol, ropirinol, rotigotina, apomorfinina, amantadina)	Parlodel® Oprymeia® Mirapexin® Requip® Neupro® Apo-go® Amantadina Level®
Inhibidores de la monoaminoxidasa-B (IMAO-B) (Rasagilina, selegilina)	Plurimen® Anaxira® Azilect®
Inhibidores de la catecol-O-metil transferasa (COMT) (Entacaponina, tolcapona, opicapona)	Comtan® Ongentys® Tasmar®
Anticolinérgicos (Trihexifenidilo, biperideno, prociclidina)	Akineton® Kemadren® Artane®

Tabla 3: Tratamientos aprobados en España para la EP.

A continuación, se describen los principales grupos farmacológicos empleados en el tratamiento de la EP (Armstrong & Okun, 2020; Balestrino & Schapira, 2020; Jankovic & Tan, 2020; Mao et al., 2020; Tan et al., 2022):

2.4.1. Precursores de la dopamina

La levodopa (L-dopa) es el fármaco estrella en el tratamiento de elección para el Parkinson debido a que es el principio activo más eficaz para los síntomas motores. Se trata de un precursor de la dopamina debido a la incapacidad que presenta ésta para atravesar la BHE. Una vez alcanzado el cerebro, se descarboxila en la SNpc dando lugar a dopamina. Por ello, es capaz de controlar síntomas como la lentitud en el movimiento, la rigidez muscular, el temblor o los problemas de postura. Los efectos de la levodopa incluyen náuseas y vómitos, hipotensión ortostática, sedación, confusión, trastornos del sueño, alucinaciones y discinesias. El problema que plantea este medicamento es que antes de que acceda al SNC sufre descarboxilación periférica originando altos niveles de dopamina a nivel periférico dando lugar a una serie de síntomas conocidos como síntomas extrapiramidales que se manifiestan con síntomas similares a los de la propia enfermedad como temblores, rigidez, además de náuseas o hipotensión. Para evitar esto, se administra junto con un inhibidor de la enzima descarboxilasa como la carbidopa o la benserazida permitiendo que llegue suficiente cantidad de L-dopa al SNC.

2.4.2. Agonistas dopaminérgicos

Los agonistas de la dopamina estimulan directamente los receptores postsinápticos de dopamina en el cuerpo estriado. Los agonistas de la dopamina no son tan efectivos como la levodopa para revertir los

síntomas motores, pero se asocian con un menor riesgo de discinesia. Se pueden utilizar como monoterapia en las etapas iniciales de la enfermedad, sobre todo, en personas jóvenes, o en combinación con levodopa. El objetivo de estos fármacos es conseguir una estimulación dopaminérgica continua, lo que permite en pacientes de inicio temprano una estimulación más fisiológica y menos pulsátil y, en pacientes más avanzados, permite controlar de forma más eficaz las fluctuaciones motoras.

Los efectos secundarios de los agonistas dopaminérgicos son similares a los de la levodopa, pero más frecuentes. Los derivados de la estimulación periférica (no cerebral) de los receptores dopaminérgicos son náuseas, vómitos, hipotensión ortostática, mareo y, los derivados de la estimulación cerebral son alucinaciones, psicosis y somnolencia excesiva. Es de destacar que, en determinados pacientes, estos fármacos pueden producir trastorno en el control de impulsos (hiperfagia, hipersexualidad, ludopatía y compras compulsivas).

2.4.3. Inhibidores de la monoaminoxidasa-B

Los inhibidores de la MAO-B son fármacos que bloquean la enzima monoaminoxidasa-B, encargada de metabolizar la dopamina, lo que resulta en una mayor permanencia de la dopamina en el organismo. Estos fármacos se utilizan desde los primeros estadios de la enfermedad de Parkinson. En el Parkinson temprano o leve, se emplean debido a que ofrecen una mejoría sintomática leve con menos complicaciones en comparación con la levodopa. En cambio, en el Parkinson avanzado, se

utilizan en combinación con otros medicamentos para reducir las fluctuaciones motoras y la cantidad necesaria de levodopa. Los efectos beneficiosos de estos fármacos son moderados en comparación con la levodopa o los agonistas dopaminérgicos. En general, son bien tolerados y tienen efectos secundarios mínimos, aunque pueden potenciar los efectos secundarios de la levodopa cuando se administran juntos. Los estudios clínicos han sugerido que el tratamiento temprano con un inhibidor de la MAO-B puede retrasar el deterioro motor y la necesidad de terapia dopaminérgica adicional. Se ha planteado la hipótesis de diferentes mecanismos de neuroprotección, aunque aún no se ha demostrado que estos fármacos modifiquen el curso de la enfermedad.

2.4.4. Inhibidores de la catecol-O-metil transferasa

Este grupo terapéutico se encarga de bloquear la encima COMT que es el enzima responsable de la metabolización de la dopamina y de la levodopa cuando está presente un inhibidor de la descarboxilasa. Se utiliza para aumentar los niveles de dopamina disponibles y, por tanto, mejoran las fluctuaciones motoras. Por tanto, no van a tener efecto si se administran solos, siendo necesarios su administración junto con la levodopa. Mejora los síntomas parkinsonianos, lo que permite reducir notablemente la dosis diaria de levodopa. Los efectos secundarios de levodopa pueden aumentar al asociarla a estos fármacos, además de que pueden originar diarrea.

2.4.5. Anticolinérgicos

Este grupo de fármacos inhiben la actividad de otro neurotransmisor conocido como acetilcolina, cuyos efectos son opuestos a la dopamina. Son efectivos sobre el temblor, en menor medida sobre la rigidez, y poco sobre la bradicinesia. Además, mejoran la función cognitiva, reducen las alucinaciones y mejoran la estabilidad postural. Estos fármacos se suelen restringir para las personas jóvenes en las que predomine el temblor o la distonía ya que los múltiples efectos secundarios hacen que no sean la primera línea de actuación en las personas mayores. Entre los principales efectos secundarios podemos destacar visión borrosa, estreñimiento, pérdida de memoria, sequedad de boca, ginecomastia, edema y desorientación.

2.4.6. Otros tratamientos

Además de las terapias farmacológicas clásicas, encontramos dos fármacos que se puede administrar a través de infusión de forma continua con el objetivo de disminuir las fluctuaciones motoras:

- Infusión subcutánea de apomorfina.
- Infusión intraduodenal de levodopa.

Además, se disponen de técnicas quirúrgicas que solamente estarán indicadas en casos muy concretos de Parkinson en los que los pacientes siguen teniendo síntomas motores fluctuantes a pesar de estar medicados.

Encontramos técnicas reversibles o irreversibles según el grado de lesión cerebral. En cuanto a las irreversibles, se trata de cirugías en las que se destruyen núcleos cerebrales que están hiperactivados como tálamo o el globo pálido. Actualmente, estas técnicas están en desuso y han dado paso a otras menos invasivas como son ultrasonidos focalizados guiados por resonancia magnética o la estimulación cerebral profunda (ECP).

El procedimiento de ultrasonidos focalizados emplea haces de ultrasonidos concentrados para tratar de manera selectiva el tálamo, al tiempo que se utiliza la resonancia magnética para dirigir y supervisar la extensión de la lesión. La lesión generada con esta técnica ha demostrado mejorar los temblores en un 62% cuando se combina con medicamentos. Sin embargo, debido a los posibles riesgos de efectos adversos como el deterioro del habla y el equilibrio, este procedimiento solo se puede realizar de forma unilateral.

La ECP es una técnica no invasiva en la que se colocan unos electrodos transcraneales en el subtálamo o el globo pálido interno. Estos electrodos están conectados a una batería en el pecho (similar a un marcapasos) que, al activarse desde el exterior, modulan y controlan los síntomas parkinsonianos. La principal ventaja de la EPC es que los parámetros de estimulación pueden personalizarse según las necesidades de cada paciente para optimizar los beneficios. Si bien la ECP es una estrategia terapéutica probada y eficaz, su éxito depende de la selección adecuada de los pacientes y de la experiencia y la habilidad del cirujano para minimizar las complicaciones (Armstrong & Okun,

2020; Deuschl et al., 2022; Jankovic & Tan, 2020; Patel, B; and Malaty, 2022).

Actualmente, también se están estudiando como los probióticos pueden contribuir a la mejora en la sintomatología de esta enfermedad (H.-X. Fan et al., 2022; Mirzaei et al., 2022).

Por último, dadas las relaciones encontradas de algunos genes con la EP, se están llevando a cabo estudios en los que se ensayan estrategias de neuroprotección eliminando los agregados de α -sinucleína con el diseño de anticuerpos monoclonales (Savitt & Jankovic, 2019). Otros estudios llevan un enfoque más indirecto. Se está utilizando nilotinib, un inhibidor de la tirosina quinasa utilizado en leucemia, para reducir la inflamación y promover la eliminación de α -sinucleína (Wyse et al., 2016).

Nos queda por decir que, a pesar de todo este arsenal terapéutico disponible, aún no se ha encontrado el fármaco ideal para curar la EP. Es necesario seguir investigando no solo en el descubrimiento de nuevos principios activos, sino también en la mejora de plataformas que permitan conducir a los fármacos al lugar deseado, y es en esta línea en la que se desarrolla parte de la investigación que se presenta en esta memoria.

3. Barrera hematoencefálica

El concepto inicial de BHE surgió a finales del siglo XIX y puede definirse como una propiedad funcional de los vasos sanguíneos del SNC, por la que se impide el intercambio libre de iones y moléculas

orgánicas en el plasma sanguíneo y el tejido nervioso. Por tanto, la propiedad de la BHE se basa en la existencia de una permeabilidad muy restringida del endotelio vascular del SNC. Esta barrera se hace patente cuando queremos tratar una patología que afecta al SNC y, tras administrar un tratamiento farmacológico por vía intravenosa, nos encontramos con una ausencia de efecto terapéutico, ya que el fármaco no puede traspasar dicha barrera (Ribatti et al., 2006). Este es el caso, por ejemplo, de muchos antibióticos que, aunque sean los idóneos en la lucha contra el microorganismo causal de una meningitis, no pueden escogerse por su imposibilidad de paso a través de dicha barrera; o el de la mayoría de los citostáticos, de nula utilidad en la lucha contra los tumores primarios del SNC por la misma razón (Begley, 2004). Sin embargo, también se considera la principal diana para el suministro de fármacos al cerebro, ya que proporciona una gran interfaz (20 m²) entre la sangre circulante y el parénquima cerebral (Chen & Liu, 2012; Rip et al., 2009).

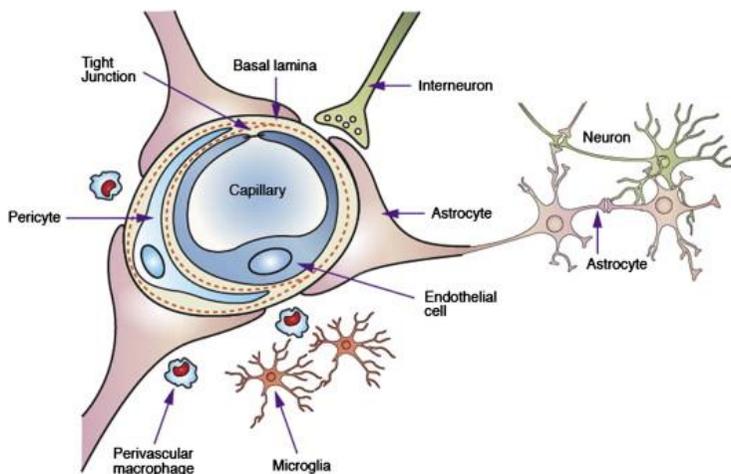


Figura 23: Representación esquemática de la Barrera hematoencefálica y otros componentes de la unidad neurovascular (Chen & Liu, 2012).

3.1. Localización y composición

Por este motivo, la BHE es una de las barreras más investigadas debido a su importancia fisiológica y terapéutica. Está constituida por una monocapa de células endoteliales, así como por los pies de los astrocitos, neuronas perivasculares y pericitos (figura 23) (Betsholtz & Keller, 2014; Bhowmik et al., 2015; Bickel & Marsch, 2001; Chen & Liu, 2012; Hawkins & Davis, 2005; Zhou et al., 2018). En esta composición, el elemento clave que determina la propiedad barrera son las células endoteliales (Alyautdin et al., 2014; Chen & Liu, 2012; Correale & Villa, 2009; Daneman & Rescigno, 2009). Estas células de los vasos del encéfalo y la médula espinal comparten una serie de características morfológicas y funcionales que las diferencian de los endotelios del resto de los vasos y que explican el aislamiento sanguíneo del tejido nervioso. En primer lugar, debemos resaltar, en comparación con las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos en el resto del cuerpo, la existencia de un sellado intercelular del endotelio por medio exclusivamente de uniones estrechas (tight junctions), consideradas de mayor complejidad respecto al resto de los epitelios (Dermietzel & Krause, 1991; Lane et al., 1992). De este modo, se encuentran estrechamente unidas existiendo zonas o bandas, denominadas *occludens*, que cierran herméticamente el espacio intercelular impidiendo cualquier comunicación con el espacio extravascular (figura 24). Esto se debe al intercalado de proteínas transmembranales (occludinas y claudinas) con otras proteínas citoplásmicas. Las uniones estrechas y la filtración de las uniones estrechas se regulan de forma activa y cercana por los astrocitos circundantes, pericitos, microglía,

neuronas y matriz extracelular (Arthur et al., 1987; Neuhaus et al., 1991; Pascual et al., 2004).

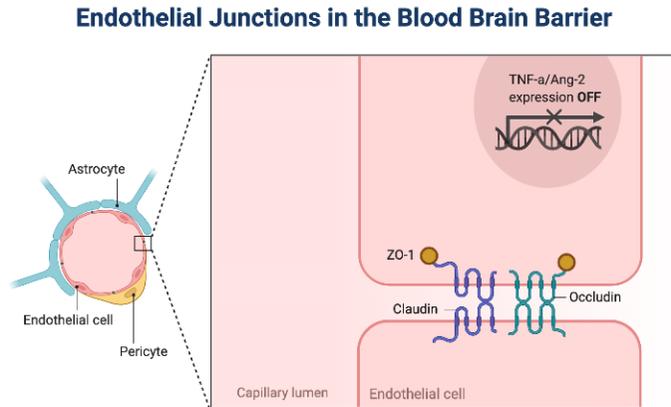


Figura 24: Representación de las uniones estrechas de la BHE. Creado con Biorender.

Otra característica es la carencia de poros intracelulares y vesículas de endocitosis intraendoteliales, en comparación con el elevado número de vesículas observable en el endotelio de otros órganos (Abbott et al., 2006; Risau & Wolburg, 1990). Mediante dichas vesículas, la mayoría de las células internalizan moléculas solubles a partir de una invaginación de la membrana celular, es la denominada endocitosis en fase fluida. En el endotelio de la BHE, esta vía de comunicación directa transcelular entre los espacios intra- y extracelulares está muy limitada, predominando la endocitosis mediada por receptores (Kandel et al., 2000). Por tanto, podemos afirmar que las células endoteliales del cerebro se encuentran altamente polarizadas y muestran una baja actividad pinocítica, aunque presentan diferentes mecanismos de transporte activo que aseguran la homeostasis en el cerebro.

No obstante, recientemente, sí se ha identificado una vía transcelular para las proteínas de mayor peso molecular. En este sentido, el elevado número relativo de mitocondrias por célula endotelial indica una actividad metabólica superior a la de otros endotelios, probablemente relacionada con el mayor número y actividad de los sistemas de transporte activo transmembrana (Villegas & Broadwell, 1993).

Adicionalmente, existe una membrana basal, constituida por colágeno tipo IV, fibronectina y laminina formando un revestimiento alrededor del endotelio (Pascual Garvi et al., 2004).

3.2. Función fisiológica

La BHE tiene variadas e importantes funciones. Su principal función es la de mantener la homeostasis de las neuronas y células gliales del cerebro, es decir, mantener un medio extracelular estable para que sea posible la transmisión sináptica.

La BHE es la responsable de que no haya interferencias en la transmisión sináptica entre neuronas mediante el intercambio de moléculas e iones entre la sangre y el espacio extracelular. Limita el paso de solutos, de tal forma que impide el paso al cerebro de sustancias grandes e hidrofílicas mientras que permite la entrada de pequeños solutos hidrofóbicos como O_2 o CO_2 , además de algunas moléculas complejas como glucosa o aminoácidos mediante transportadores específicos. Pero la BHE no solo controla el paso de macro y micromoléculas (Patel & Frey, 2015), sino que restringe y regula el tráfico de iones y neurotransmisores entre la sangre y el cerebro. Además, esta barrera permite el aislamiento del espacio extracelular con

respecto a la sangre, ya que ésta experimenta cambios continuos en su composición, y bloquea el acceso de sustancias tóxicas endógenas y exógenas que podrían alterar la señalización sináptica (Pascual Garvi et al., 2004).

Por tanto, la BHE confiere un ambiente único en el sistema nervioso: composición iónica diferente, conjunto especializado de neurotransmisores, bajos niveles de algunas proteínas para minimizar la proliferación celular, baja exposición a toxinas para evitar daño celular y menor tráfico de células inflamatorias y moléculas para disminuir la inflamación local (Varatharaj & Galea, 2017).

4. Mecanismos de transporte de moléculas al SNC

Como se observa en la figura 25, existen diferentes mecanismos de transporte para que las moléculas puedan acceder al cerebro, destacando:

- Difusión pasiva. Este transporte se realiza de manera transcelular atravesando las membranas plasmáticas de la célula. Está reservado para pequeñas moléculas lipófilas de pequeño tamaño molecular (<400 -500 Da) (de Boer & Gaillard, 2007), como el oxígeno, dióxido de carbono y nicotina. No obstante, es importante tener en cuenta que el paso de moléculas lipófilas de gran tamaño hacia el cerebro también se ve obstaculizado por el hecho de que estas células endoteliales contienen altas concentraciones de p-glicoproteínas, proteínas ATP-dependientes que mediante un mecanismo de e-flujo devuelven fármacos lipófilos de elevado peso molecular a la sangre.

- Difusión paracelular utilizada por moléculas de naturaleza hidrófila, de pequeño tamaño molecular y que puedan difundir a través de las uniones estrechas de las células endoteliales (Ballabh et al., 2004).
- Transcitosis mediada por transportador es un tipo de transporte específico facilitado, lo aprovechan pequeñas moléculas como glucosa, bases púricas o aminoácidos esenciales. Estos transportadores forman parte de la membrana de las células endoteliales y son altamente específicos.
- Transcitosis mediada por receptor. Se trata de una endocitosis mediada por receptor en la que se produce la inclusión del complejo ligando-receptor. Es el único mecanismo que permite el paso de moléculas de gran tamaño como anticuerpos y proteínas, utilizado, por ejemplo, por la leptina, transferrina o insulina. Tiene el inconveniente, además, de que es saturable (Pardridge, 2015).
- Transporte por adsorción. La membrana de las células endoteliales cerebrales está cargada negativamente a pH fisiológico debido a la presencia de proteoglicanos, mucopolisacáridos, glucolípidos y glucoproteínas que contienen sulfitos y ácidos siálicos. El transporte por adsorción se produce como resultado de una interacción electrostática entre la molécula cargada positivamente y la región de la membrana plasmática cargada negativamente. Este transporte es saturable y no específico y se produce a nivel muy pequeño en situaciones de alteración fisiológica (Loch-Neckel & Koepf, 2010).

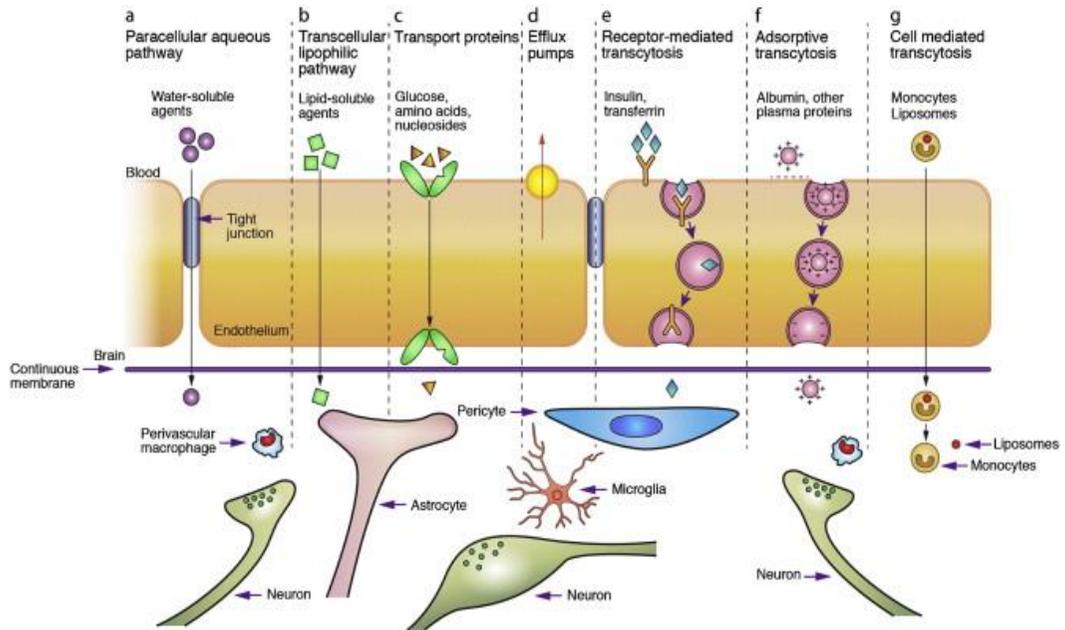


Figura 25: Representación de los mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE (Chen & Liu, 2012).

No obstante, en algunas afecciones patológicas, incluidos los tumores cerebrales, los accidentes cerebrovasculares, la enfermedad de Parkinson y la inflamación, la BHE puede perder su integridad y funcionalidad, aumentando de este modo su permeabilidad.

Aprovechando estos mecanismos fisiológicos de transporte de sustancias a través de la BHE para alcanzar el SNC es como los fármacos consiguen acceder al cerebro para el tratamiento de enfermedades cerebrales. Actualmente, se siguen estudiando los mecanismos que ocurren en las células endoteliales.

5. Estrategias de mejora en la administración de fármacos al SNC

Aproximadamente el 98 % de los fármacos que potencialmente podrían usarse en el tratamiento de varias enfermedades del SNC no son viables en clínica debido a su incapacidad para atravesar la BHE (Pardridge, 2012). Se ha demostrado que muy pocos fármacos lipófilos y con un tamaño inferior a 400-500 Da son capaces de atravesar por difusión pasiva la BHE y una vez que la atraviesan, muchos experimentan un flujo activo mediado por P-glicoproteínas (R. Singh & Lillard, 2009). Por eso son necesarias dosis iniciales muy elevadas, lo que puede conllevar problemas de toxicidad. Supone, en consecuencia, un gran reto, el desarrollo de nuevas estrategias eficaces que permitan la vectorización y liberación de fármacos en el cerebro y, en los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en este objetivo. En la actualidad, podemos decir que existen 2 estrategias fundamentales basadas en técnicas invasivas y no invasivas, respectivamente.

Las técnicas invasivas incluyen la inyección intraventricular o intracerebral directa de fármaco. El principal inconveniente de este método es el coeficiente de difusión limitado de las moléculas, asociado al lento movimiento de los componentes en el cerebro. Otra de las técnicas utilizadas es el uso de implantes, bombas osmóticas o dispositivos de infusión continua (Loch-Neckel & Koepp, 2010).

Asimismo, existe la posibilidad de alterar la BHE en lugar de atravesarla. Esta técnica consiste en interrumpir la BHE de manera reversible

utilizando reactivos bioquímicos como los péptidos que penetran en las células, tensioactivos o agentes hiperosmóticos (manitol o alquilglicerol), o por métodos físicos como ultrasonidos focalizados e hipertermia inducida por nanopartículas magnéticas. Sin embargo, la ruptura específica de una región del cerebro puede tener consecuencias graves, como cambios hidroelectrolíticos o el paso de sustancias tóxicas al cerebro.

Debido al gran número de inconvenientes asociados a estas técnicas invasivas, hoy día se continúa avanzando en el desarrollo de métodos alternativos no invasivos que permitan el acceso del fármaco al cerebro sin alterar la BHE. La primera opción se centró en la modificación química de los fármacos, por ejemplo, incrementando su lipofilia (Chen & Swanson, 2003) o el uso de profármacos, moléculas que al atravesar la BHE experimentan una transformación y se vuelven activas (como la levodopa) o proteínas catiónicas.

No obstante, en los últimos años se han barajado otras posibilidades como el transporte intranasal o el uso de nanopartículas.

5.1. Empleo de nanopartículas para atravesar la BHE.

El empleo de nanopartículas para el transporte de fármacos al SNC constituye una de las estrategias no invasivas más estudiadas en los últimos años. No olvidar que las condiciones patológicas podrían alterar en cierta medida la permeabilidad de la BHE debido a procesos inflamatorios y al incremento de la presión intracerebral (Curtis et al., 2018; Zhou et al., 2018)y, por lo tanto, dejar espacio para el transporte

pasivo de nanopartículas con ciertas propiedades superficiales. Debido a que los capilares sanguíneos tienen un diámetro mínimo de 6-9 μm , los complejos fármaco-nanotransportador pueden llegar a los órganos a través del flujo sanguíneo. Las células en el cuerpo humano tienen un tamaño promedio de 10-20 μm , lo que permite la adsorción o captación de las nanopartículas, ofreciendo así la oportunidad de administrar fármacos dentro de las células, incluidas las células endoteliales cerebrales. Además, al poder ser funcionalizadas en su superficie con ligandos de direccionamiento, las NPs tienen la capacidad de transportar fármacos a través de la BHE, mediante la vía de transcitosis mediada por proteínas o por receptor (Han & Jiang, 2021).

Basándonos en las características biológicas de la BHE, los mecanismos de transporte de las NPs se pueden clasificar en (X. Li et al., 2017):

- Apertura transitoria de la barrera inducida por el efecto “tóxico” que presentan las NPs o por el efecto estimulante que originan los surfactantes presentes en las superficies de éstas. Algunas NPs derivadas del quitosán son capaces de abrir las uniones estrechas de la BHE, mientras que altas concentraciones de algunas NPs aniónicas y catiónicas interrumpen la BHE, aunque las NPs neutras y bajas concentraciones de NPs aniónicas no tienen efecto en la integridad de la BHE (Lockman et al., 2004). El dodecil sulfato sódico también ha demostrado tener la capacidad de inducir una ruptura en la barrera. La apertura transitoria de la BHE es peligrosa debido a la propia toxicidad del nanotransportador, así como a la posibilidad de que otras moléculas de la circulación sanguínea difundan al cerebro al mismo tiempo (Kobiler et al., 1989).

- Adsorción de las NPs en la superficie de las células endoteliales, seguida de la liberación del fármaco en la superficie de la célula. Lo que se consigue es un aumento de la concentración del fármaco en el lugar, y, por tanto, aumentamos gradiente de concentración del fármaco facilitando la difusión hacia el parénquima cerebral. La mayor o menor adsorción que van a presentar las NPs sobre las células endoteliales va a estar condicionada por la hidrofobicidad, la carga superficial y los ligandos específicos. Las NPs de carácter lipófilo facilitan la adsorción. Una carga superficial positiva promueve interacciones electrostáticas con las cargas negativas de las superficies endoteliales, lo cual también facilita la adsorción (Lien et al., 2012).
- Mecanismos de transcitosis, endocitosis y exocitosis de las NPs a través de las células endoteliales. Las NPs pueden ser endocitadas por parte de las células, a veces seguidas de exocitosis lo que le permite la penetración del nanotransportador en el cerebro. La endocitosis puede ocurrir mediante la captación aleatoria de moléculas solubles en el plasma junto con gran cantidad de éste. Este proceso es independiente de cualquier interacción entre las moléculas transportadas y la membrana celular (Chopra et al., 2008).

6. Modelos de estudio de BHE *in vitro*

Resulta esencial para el proceso de investigación cerebral y el desarrollo de nuevos medicamentos, establecer un modelo de BHE *in vitro* en el que simular las condiciones cerebrales. Sin embargo, ninguno de estos

modelos *in vitro* reproduce completamente las condiciones *in vivo*, por lo que no existe un modelo de BHE *in vitro* perfecto, aunque permiten la manipulación de algunos parámetros que afectan a la barrera (p. ej., hipoxia, déficit de glucosa, toxinas, entre otros), reducen las pruebas con animales y son menos costosos que los experimentos *in vivo* (Bagchi et al., 2019; Saraiva et al., 2016).

Por lo tanto, es importante elegir cuidadosamente el modelo de BHE *in vitro* según los requisitos del estudio. Los modelos *in vitro* más habituales son monocultivos (células endoteliales), cocultivos (células endoteliales y astrocitos) o cultivos triples (células endoteliales, astrocitos y pericitos). Todos los modelos se basan en sembrar las células sobre una membrana semipermeable, en la que se simula en el lado apical de la membrana, la sangre y en el lado basolateral, el tejido nervioso. A continuación, se explican brevemente los modelos más usados (Helms et al., 2015):

- **Monocultivo:** la importancia de realizar estos modelos con células endoteliales, ya sean murinas o humanas, es por la capacidad que tienen de formar la barrera por sí solas. En este modelo, se cultivan las células en la parte superior de la membrana semipermeable. Por otra parte, en el medio inferior se puede añadir o no medio condicionado de astrocitos para recrear el contexto molecular que confieren estas células (Figura 26a).
- **Cocultivo sin contacto:** en este modelo, las células endoteliales se siembran igual que en el caso anterior, encima de la membrana, mientras que en el fondo de la placa se cultivan los astrocitos. Aunque no se permite el contacto de las células endoteliales con los

astrocitos, éstas reciben los factores difusibles que emiten los astrocitos asemejándose algo más a la realidad (Figura 26b).

- Cocultivo con contacto: las células endoteliales se siembran en la parte superior de la membrana mientras que los astrocitos crecen en la parte inferior de ésta, permitiendo así el contacto entre ambas células y la formación de una verdadera barrera. La única desventaja de este modelo es que las células no se pueden aislar de forma separada para analizar diferentes parámetros por PCR o Western Blotting (Figura 26c).
- Cultivo triple: las células endoteliales se cultivan en la parte superior del inserto y los pericitos en la parte inferior de la membrana, mientras que los astrocitos se siembran en el fondo del pocillo (Figura 26d). Aunque este es el modelo *in vitro* más real de todos porque incluye los tres tipos de células fundamentales y mimetiza con gran fidelidad el contacto celular que ocurre en la BHE, es un modelo muy laborioso.

Los modelos *in vitro* ofrecen la ventaja de permitir una manipulación más precisa en comparación con los modelos *in vivo*, lo que les permite reflejar cambios específicos que ocurren durante diversas enfermedades. Por ejemplo, es posible someter cultivos celulares a condiciones como la falta de oxígeno o glucosa, o estimularlos con lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana de bacterias Gram negativas que desencadena una respuesta inflamatoria potente del sistema inmunitario. Aunque se ha demostrado en numerosos estudios que las barreras con cocultivos y cultivos triples son altamente

específicas en la representación de la fisiología de la BHE (Ceruti et al., 2011; Nakagawa et al., 2009; Neuhaus et al., 1991; Török et al., 2003), es importante destacar que no reproducen completamente el contexto molecular y celular presente *in vivo*. Por esta razón, se han desarrollado diversas técnicas para estudiar la BHE *in vivo*, las cuales implican la simulación de alteraciones que ocurren en enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias y, posteriormente, evaluar cómo afectan a la integridad y funcionalidad de la barrera. Por ejemplo, una de las técnicas más utilizadas para simular un proceso de neuroinflamación basado en la inflamación sistémica es la administración de LPS, la cual provoca la apertura de la barrera hematoencefálica (Banks et al., 2015).

El método más utilizado para estudiar la integridad de la BHE es evaluar su permeabilidad. Esto se logra midiendo la penetración de un trazador después de ser inyectado en el torrente sanguíneo y su llegada al cerebro. Cuanto mayor sea la concentración del trazador en el tejido cerebral, mayor será la permeabilidad de la barrera. Existen diversos trazadores con diferentes pesos moleculares y marcas, como la radiactividad o la fluorescencia (Saunders et al., 2015). Dos de los trazadores más utilizados son el Evans Blue (EB) (961 Da) y el sodium fluoresceína (NaF) (376 Da). El EB se une estrechamente a la albúmina presente en la sangre (EBA), lo que aumenta su peso molecular en 69 kDa, mientras que el NaF permanece libre en la circulación (Yen et al., 2013). De esta manera, se pueden medir sustancias con pesos moleculares muy diferentes, una de alto peso molecular (EBA) y otra de bajo peso molecular (NaF). Estos trazadores también se utilizan *in vitro* de

manera similar, donde se administran en la parte superior de la placa de cultivo (simulando la sangre) y se mide su concentración en la parte inferior (simulando el tejido nervioso). En este caso, al no tener la presencia de albúmina sérica, el EB se administra previamente unido a albúmina.

En base a todo lo expuesto y considerando que cualquier modelo *in vitro* presenta debilidades, hemos seleccionado el modelo de monocultivo debido a las ventajas que presentan como primera aproximación al diseño de BHE *in vitro* en estudios de permeabilidad. Por un lado, su simplicidad y, por otro, la robustez del método para evaluar la integridad de la barrera nos ha permitido realizar una primera evaluación sobre la capacidad de las NPs para atravesar las células endoteliales (artículo pendiente de su publicación en la revista *Neuropharmacology*, Q1).

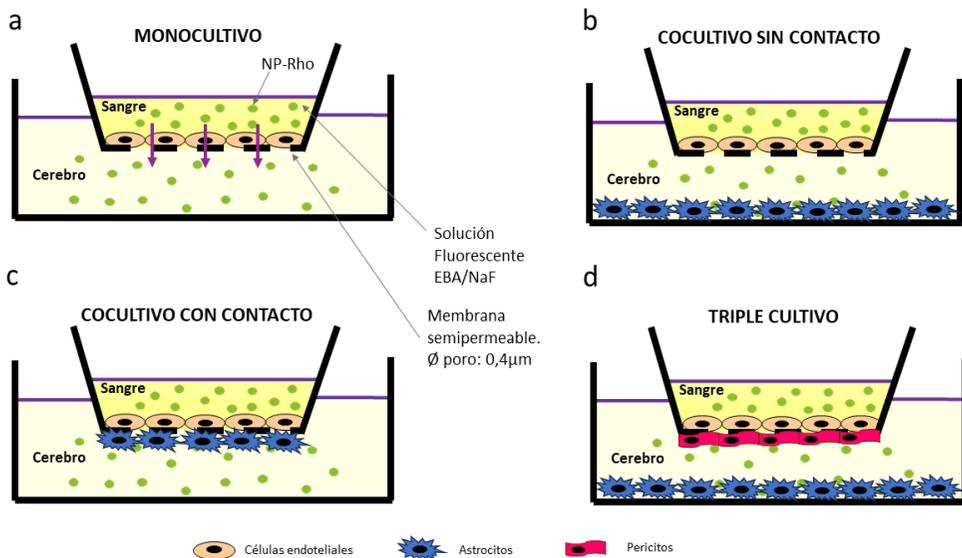


Figura 26: Representación de los diferentes tipos de cultivos de BHE *in vitro*.

Modificado de (Helms et al., 2015).

7. Administración de nanopartículas *in vivo*

El comportamiento de los cultivos celulares *in vitro* solamente se emplea como estudio preliminar para conocer el comportamiento de las NPs, siendo necesarios estudios *in vivo* para determinar la farmacocinética y la farmacodinamia, y si el nanotransportador es capaz de alcanzar la diana en un organismo completo.

En la administración de medicamentos, el tamaño y la composición del transportador se determina en función de los requisitos funcionales necesarios. Estos requisitos incluyen la carga útil del medicamento, su vida media, su capacidad para dirigirse a tejidos específicos y la biodegradabilidad del transportador. La vida media del sistema transportador depende principalmente de la eliminación renal, de la activación del sistema inmune y de la habilidad del transportador para evitar la fagocitosis en el sistema reticuloendotelial (Borm & Müller-Schulte, 2006).

Al introducirse en el cuerpo, el portador debe alcanzar el objetivo y acumularse allí antes de que pueda tener lugar su eliminación. Antes de llegar, las NPs deben enfrentarse a situaciones adversas relacionadas con el transporte, así como la respuesta inmune, la selectividad y eficiencia en la orientación, la biodistribución, la biodegradación, la eliminación y la toxicidad a nivel de órganos y sistemas.

Idealmente, se persigue que un nanotransportador tenga las siguientes características:

- Buena eficiencia en la orientación hacia el objetivo para garantizar una deposición selectiva del fármaco, al mismo tiempo que la concentración en el resto de los tejidos sea la más baja posible.
- Los materiales que forman las NPs deben ser biocompatibles y biodegradables.
- Que sean eliminadas del organismo en un periodo de tiempo determinado.

Sin embargo, en la realidad, es casi imposible satisfacer todos estos requisitos. Gracias a los avances en nanotecnología, se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de las NPs para obtener unos transportadores más eficientes y mejorar su rendimiento in vivo (Sun et al., 2014).

Para comprender completamente la farmacología de una NP, es importante analizar exhaustivamente la toxicología, la farmacocinética y las pruebas de eficacia en modelos preclínicos. Se puede realizar una biodistribución cuantitativa para estimar el número total de NPs en todo el cuerpo en un momento dado después de la inyección o exposición. Independientemente de la vía de administración de las nanopartículas (inhalación, administración por sonda al tracto gastrointestinal, inyección intravenosa o dérmica), se puede evaluar la distribución de las NPs en órganos y tejidos. Después de la administración, la distribución de las partículas se mide en varios momentos utilizando métodos adecuados. En nuestro caso, por métodos de detección de fluorescencia ya que están marcadas con rodamina. La biodistribución cambia según las propiedades de las nanopartículas y las interacciones con el sistema

vivo. En particular, el tamaño y la carga superficial de las NPs afecta la biodistribución en todo el cuerpo.

Ya que por vía oral nos encontramos con mayores obstáculos para su acceso a la circulación sanguínea, se prefiere el empleo de la vía parenteral ya que evita las barreras en el proceso de absorción. Una vez en el sistema circulatorio, enseguida comienzan los mecanismos para su eliminación por parte del sistema retículo endotelial, el sistema inmune y el sistema renal. Su eliminación y orientación dependerá del tamaño, la forma y las propiedades superficiales.

Para reducir el reconocimiento por el sistema inmunológico, las partículas se someten a modificaciones, como la adición de recubrimientos hidrofóbicos o ligandos como el PEG. Estas modificaciones evitan la absorción por los monocitos presentes en la sangre, lo que conduce a un aumento significativo en la vida media en la circulación sanguínea. Sin embargo, estas modificaciones también afectan la distribución de las NPs en los tejidos. El tamaño también es un factor relevante para su entrada en los tejidos o en la especificidad por un tejido en concreto (Borm & Müller-Schulte, 2006). Como podemos ver en la figura 27, a partir de 20 nm encontramos mayor acumulación en sangre, hígado, bazo y pulmones. Las más pequeñas, se encuentran principalmente en los riñones debido a que se filtran rápidamente y por tanto serán aclaradas rápidamente. Está bien establecido que las NPs cargadas positivamente tienen una mayor tasa de acumulación en los tejidos. También se espera que las NPs positivas tengan una alta tasa de internalización no específica y una corta vida media de circulación sanguínea. En cambio, las NPs negativas, presenta una menor

internalización celular y una mayor vida media de circulación que será, a su vez, más corta que las NPs neutras (Hoshyar et al., 2016; Rawal et al., 2019).

Aunque el fin último es que las NPs sean eliminadas del organismo, también se pretende alargar su tiempo de vida media plasmática para que les permitan acceder al lugar de acción y acumularse. Por tanto, cualquier cambio en la superficie de las NPs conllevará cambios en su tamaño hidrodinámico, carga superficial y reactividad que afectará a parámetros como filtración hepática, extravasación en tejidos, difusión en tejidos y excreción renal (Alexis et al., 2008; Sun et al., 2014).

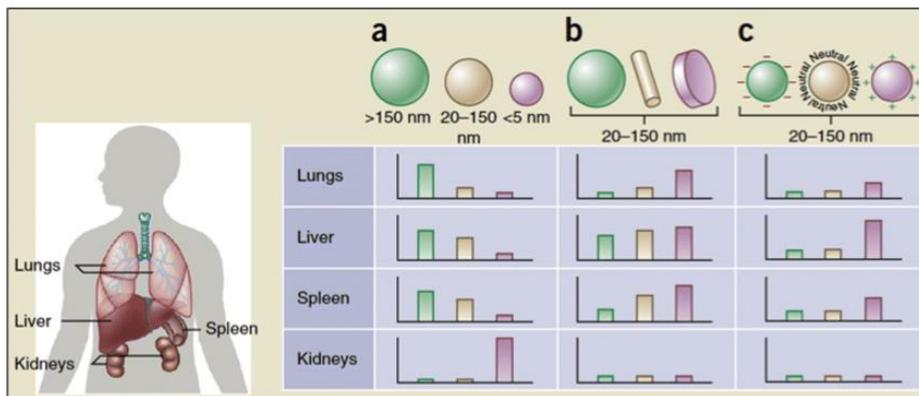


Figura 27: Biodistribución de las NPs en función del tamaño, forma y carga superficial (Rawal et al., 2019). Lungs: pulmones, liver: hígado, spleen: bazo, kidneys: riñones.

Es muy complicado establecer un perfil de eliminación de las NPs en un organismo que no sea el humano, por ello, los estudios con roedores *in vivo*, solamente nos dan una aproximación de su comportamiento, siendo más importante la información obtenida en cuanto a su

toxicidad. Se ha visto que la captación de las NPs por parte del sistema reticuloendotelial es específica de especie y tipo de NPs. En animales de laboratorio más comunes (perro, rata, ratón y conejo) se ha visto una mayor acumulación en hígado y bazo, similar a los humanos. En otras especies menos comunes a nivel de laboratorio (cabra y cerdo) se observa una mayor acumulación intrapulmonar. Por tanto, se respalda el uso de especies más tradicionales para la evaluación toxicológica y farmacocinética de las NPs debido al perfil de distribución similar del SER (Zamboni et al., 2012).

8. Modelos animales en la enfermedad de Parkinson

Para el desarrollo de modelos preclínicos en animales es necesario entender la enfermedad en su conjunto; sin embargo, ninguno de los modelos desarrollados hasta la actualidad, reproducen la gran complejidad de la enfermedad, que, como ya hemos visto, implica factores genéticos y ambientales, un proceso de neuroinflamación y estrés oxidativo y, sobre todo, el componente neurodegenerativo progresivo crónico que es uno de los contribuyentes esenciales a la enfermedad. Sin embargo, los modelos propuestos engloban características del envejecimiento y de la enfermedad lo que nos permite evaluar la eficacia de las nuevas terapias.

8.1. Modelos genéticos

Desde que se descubrieron que la EP estaba asociada a mutaciones genéticas, se han impulsado los modelos de animales con estas

mutaciones con el fin de reproducir esta enfermedad. Por ejemplo, los ratones transgénicos que expresan la proteína α -sinucleína reproducen las disfunciones motoras y no motoras observadas en etapas tempranas de la EP, pero no presentan degeneración nigroestriatal. Por otro lado, los ratones que sobreexpresan la mutación LRRK2 muestran déficits progresivos en la actividad motora, pero no experimentan la muerte neuronal característica. Además, los ratones transgénicos para otras proteínas implicadas en la forma hereditaria de la EP no presentan anomalías neuronales. Sin embargo, dado que los modelos genéticos no reflejan la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, que es la principal característica de la EP, y considerando que solo alrededor del 10% de los pacientes con EP tienen un componente genético, los modelos basados en toxinas siguen siendo los más utilizados en la investigación experimental de la enfermedad de Parkinson (Blandini & Armentero, 2012).

8.2. Modelos basados en toxinas

Varias neurotoxinas, incluyendo 6-OHDA, MPTP, paraquat y rotenona, se ha utilizado para inducir la neurodegeneración dopaminérgica *in vivo* (Salari & Bagheri, 2019).

- 6-OHDA (6- Hidroxidopamina): la inyección en la SNpc produce una degeneración dopaminérgica a partir de las 24 horas posteriores a la inyección. Sin embargo, los signos clínicos no imitan lo que ocurre con los pacientes de EP y se pierde la formación de cuerpos de Lewy. Además, aunque la 6-OHDA induce la degeneración dopaminérgica,

no está claro si el mecanismo es el mismo que en los pacientes con EP (Chia et al., 2020; Dauer & Przedborski, 2003).

- Paraquat: se ha informado que la exposición a este herbicida puede aumentar el riesgo de enfermedad de Parkinson y los ratones intoxicados con paraquat muestran inclusiones de α -sinucleína. El paraquat induce la degeneración dopaminérgica, aunque puede afectar a otros tipos de células (Chia et al., 2020; Dauer & Przedborski, 2003).
- Rotenona: insecticida que induce la degeneración dopaminérgica al inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones y generar especies reactivas de oxígeno (RLO). La inyección intravenosa de rotenona induce signos clínicos en ratas que se asemejan a los signos de la enfermedad de Parkinson, como ataxia, hipocinesia, rigidez o temblor en reposo. Además, los animales desarrollan inclusiones citoplasmáticas intraneuronales de α -sinucleína (Chia et al., 2020; Goldberg et al., 2003).
- MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina): el potencial neurotóxico de MPTP se descubrió en 1983 cuando los usuarios de drogas desarrollaron un síndrome parkinsoniano progresivo por la inyección accidental de MPP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina), un análogo del narcótico de la meperidina, que estaba contaminado con MPTP siendo el responsable de los síntomas parkinsonianos (Langston et al., 1983). MPTP produce un trastorno parkinsonismo en humanos, monos y ratones, siendo irreversible y grave en primates. Los síntomas clínicos recuerdan a los de la EP humana, incluyendo temblor de reposo, rigidez, lentitud de movimiento e inestabilidad postural. Además, como en la EP, el daño inducido por

la intoxicación con MPTP aumenta con la edad. Se ha visto que conduce a una reducción de ATP y un aumento de los niveles de RLO (Dauer & Przedborski, 2003). Además, la producción de RLO parece aumentar la agregación de α -sinucleína, y viceversa, la sobreexpresión de α -sinucleína parece aumentar la producción de RLO (Goldberg et al., 2003). Sin embargo, la intoxicación aguda por MPTP no puede generar cuerpos de Lewy (Bové & Perier, 2012). La gravedad de la lesión causada por el MPTP depende de la dosis de la toxina y la vía de administración. Se ha observado que la administración crónica de MPTP induce inclusiones similares a los cuerpos de Lewy (Goldberg et al., 2003). La inyección sistémica de MPTP en ratones es el modelo clásico y establecido utilizado para estudiar las vías moleculares involucradas en la muerte de las células neuronales en la enfermedad de Parkinson y para evaluar la eficacia de los fármacos neuroprotectores (Bové & Perier, 2012; Chia et al., 2020).

9. Detección de las nanopartículas *in vivo* e *in vitro*

La visualización de las NPs dentro de las células es vital para optimizar el direccionamiento y la entrega de fármacos. Se busca que las NPs tengan la capacidad de agregarse durante la internalización con el fin de mejorar el contraste de imagen (amplifican de forma significativa la señal fluorescente) y la eficacia terapéutica. Además, la biodistribución de las NPs es importante para establecer la relación entre la concentración de NPs y la citotoxicidad. Existen diferentes técnicas para visualizar las NPs en el interior de las células. A continuación, se

mencionan las más utilizadas, basadas todas en el principio de emisión fluorescente. En este sentido, es importante considerar que existe una variedad de fluorocromos que pueden ser empleados para marcar las NPs que tienen una longitud de onda de emisión que va desde el azul-violeta hasta el infrarrojo. Los marcadores pueden ubicarse tanto en el núcleo como en la cubierta unidos a la superficie o ser una característica intrínseca del propio compuesto que forma la NPs. Las NPs suelen etiquetarse con colorantes fluorescentes, como el isocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo nilo e indocarbocianina (Nedosekin et al., 2015).

9.1. Análisis por microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia convencional es una herramienta fundamental en numerosas aplicaciones de investigación biomédica que tiene una resolución similar a la microscopía de campo claro. Esto significa que las NPs solo pueden ser detectadas cuando están agrupadas estrechamente en agregados o empaquetadas densamente. A pesar de ello, la microscopía de fluorescencia se ha utilizado ampliamente para investigar la biodistribución de las NPs, pero presenta algunas desventajas como, por ejemplo, el fotoblanqueo dependiente del tiempo que va a suponer una pérdida gradual de la señal fluorescente. Por ello, es importante resaltar que la cuantificación de la fluorescencia siempre hay que hacerla respecto a una muestra control ya que la estabilidad del fluoróforo es crucial para una cuantificación precisa (Ostrowski et al., 2015).

9.2. Análisis por microscopía confocal

La microscopía confocal de escaneo láser es una técnica que utiliza un haz láser para escanear el volumen tridimensional de un objeto, punto por punto, similar a un microscopio electrónico de barrido. Se generan imágenes de muestras de células o tejidos marcados con un fluoróforo mediante el escaneo láser en una plataforma óptica. Las imágenes se obtienen con una mayor resolución y selectividad de profundidad en comparación con la microscopía óptica convencional o la microscopía de fluorescencia. La función clave de la microscopía confocal es su capacidad de seccionamiento óptico, en el cual las imágenes se reconstruyen mediante el escaneo punto por punto. La ventaja que supone esta técnica respecto a otras tradicionales es que éstas pueden tener cierta distorsión del tejido que puede ser debido al método de fijación o seccionamiento, o incluso por la exposición a los haces de luz; en cambio, la microscopía confocal permite poner la muestra íntegra y se pueden visualizar muchas si se almacenan adecuadamente (L. W. Zhang & Monteiro-Riviere, 2012). Una de las limitaciones que presenta esta técnica para la detección de NPs es que por el tamaño nanométrico de éstas le resulta muy difícil distinguir entre partículas individuales y pequeñas agregados de NPs. Por ello, se cuentan “eventos de partículas” que corresponde a una estructura vesicular que contiene NPs. Con esto, podemos cuantificar las diferencias relativas en cuanto a la cantidad de NPs que es capaz la célula de incorporar, y, además, evaluar las diferencias entre los diferentes tipos de células (Vanhecke et al., 2014).

9.3. Análisis citofluorimétrico

La citometría de flujo es una técnica que se utiliza para medir la fluorescencia y la dispersión de luz de las partículas y células individuales en suspensión. Para su detección las NPs son canalizadas en un flujo laminar de fluido que se excita secuencialmente por una luz láser. Entre otras aplicaciones, se utiliza para analizar y caracterizar las propiedades de las NPs en muestras biológicas. Permite obtener información de las NPs sobre el tamaño, la concentración, la forma y las propiedades ópticas. También puede utilizarse para estudiar la interacción de las nanopartículas con las células y analizar la distribución de las nanopartículas en diferentes poblaciones celulares. Pero esta técnica presenta una limitación, y es que, no consigue hacer distinción entre la localización de las Nps, si están en el interior o en superficie. Por ello, no se emplea como una técnica solamente, sino que se usa para apoyar otras técnicas de detección, ofreciendo una semicuantificación rápida de las NPs. Otras limitaciones son la capacidad de detectar NPs de tamaño muy pequeño o la interferencia de otras partículas o estructuras en la muestra. Por lo tanto, es fundamental realizar controles y validaciones adecuadas para garantizar la precisión y la interpretación correcta de los datos obtenidos (Vanhecke et al., 2014; Welsh et al., 2023).

10. Lipid nanoparticles for the transport of drugs like dopamine through the blood-brain barrier

Nanopartículas lipídicas para el transporte de medicamentos como la dopamina a través de la barrera hematoencefálica.

Elena Ortega, Santos Blanco, Adolfina Ruiz, María Ángeles Peinado, Sebastián Peralta, María Encarnación Morales. *Journal of Nanoparticle Research* (2021) 23:106. Factor de impacto (JCR)-Percentil (JCR): 2.533 – 37.71



Algunas enfermedades y trastornos del sistema nervioso, como la enfermedad de Parkinson (EP) y otras patologías neurodegenerativas, son ampliamente prevalentes en nuestra sociedad. El arsenal de tratamientos contra estas patologías sigue aumentando, pero en muchos casos su uso está limitado. Esto se debe a la barrera hematoencefálica (BHE), que actúa limitando la penetración de medicamentos en el cerebro. Para superar esta limitación, en la investigación actual se han diseñado nanopartículas sólidas lipídicas (SLNPs,) capaces de encapsular medicamentos y cruzar la BHE para transportar y liberar estos medicamentos en sus dianas. Estas SLNPs se sintetizaron mediante un método de sonicación y un proceso de agitación intensa,

buscando el perfil fisicoquímico más adecuado para lograr los objetivos establecidos.

Hoy en día, el tratamiento más eficiente para la EP consiste en suministrar la dopamina que se pierde debido a la neurodegeneración; sin embargo, la naturaleza de este neurotransmisor impide su cruce de la BHE. Por lo tanto, la dopamina puede considerarse como un buen candidato para ser encapsulado en nanopartículas. Basándose en estos antecedentes, en esta investigación, se caracterizaron fisicoquímicamente tanto las SLNPs vacías como las cargadas con dopamina. Los resultados obtenidos indicaron una gran estabilidad de las nanopartículas cargadas con dopamina cuando se utilizó el medicamento en concentraciones del 0.2 al 0.05%; estas concentraciones apenas afectaron su tamaño, índice de polidispersión y ζ -potencial, y las SLNPs elaboradas en esta investigación fueron muy adecuadas para ser inyectadas de manera sistémica.

Finalmente, las SLNPs vacías marcadas y administradas de manera sistémica en ratas Wistar macho adultas demostraron su capacidad de penetración en el parénquima cerebral.



Lipid nanoparticles for the transport of drugs like dopamine through the blood-brain barrier

Elena Ortega · Santos Blanco · Adolfin Ruiz · María Ángeles Peinado · Sebastián Peralta · María Encarnación Morales

Received: 8 March 2021 / Accepted: 20 April 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract Diseases and disorders of the nervous system, like Parkinson disease (PD) and other neurodegenerative pathologies, are widespread in our society. The arsenal of treatments against these pathologies continues to increase, but in many cases, its use is limited. This is due to the blood-brain barrier (BBB), which acts by limiting the penetration of drugs into the brain. To overcome this handicap, in the current research, solid lipid nanoparticles (SLNPs) able to encapsulate drugs and to cross the blood-brain barrier have been designed to transport and release these drugs into their targets. These SLNPs were synthesized by a sonication method and high agitation process searching the most adequate physicochemical profile to achieve the objectives set. Today, the most efficient treatment for PD consists of providing the dopamine (DP) that is lost by neurodegeneration; however, the nature of this neurotransmitter prevents its crossing of the BBB. Therefore, DP may be considered as a good candidate to be encapsulated in SLNPs while studying how the loading drug could affect such nanoparticles. Based on these antecedents, in this research, both empty and DP-charged SLNPs were characterized physicochemically. The results

obtained indicated a great stability of the nanoparticles loaded with DP when drug was used at 0.2 to 0.05%; these concentrations barely affected its size, polydispersity, and ζ -potential, and the SLNPs elaborated in this research were high appropriate to be injected systemically. Finally, empty SLNPs labeled and administered systemically to adult male Wistar rats demonstrate their penetration ability into the brain parenchyma.

Keywords Dopamine · Nanoparticles · Brain–blood barrier · Neurodegenerative diseases

Introduction

Neurodegenerative diseases represent a major issue in our society, so the development of novel strategies aiming to achieve effective methods for their treatment is crucial. Although many treatments are being developed constantly, many of them face difficulties in reaching their therapeutic targets, mainly due to the blood-brain barrier (BBB), an effective obstacle for many of the drugs designed to act on the central nervous system (CNS). In fact, when these drugs are administered, they first must go through the cerebral capillary endothelium formed by polarized endothelial cells highly glued to each other by tight connections. They also must cross the astroglial barrier, the pericytes, and in some cases even the perivascular mast cells (Masserini 2013). In addition, a large quantity of molecules, although may cross the BBB, they have a low rate of permeability showing difficulties to reach the nervous

E. Ortega · A. Ruiz · S. Peralta (✉) · M. E. Morales
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain
e-mail: seperaltag@gmail.com

S. Blanco · M. Á. Peinado
Department of Experimental Biology, University of Jaén, Building B3, Campus de Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

Published online: 29 April 2021

Springer

parenchyma (Rehman et al. 2013; Pardridge 2015). Particularly, most hydrophilic molecules fail to cross the BBB because of the tight connections between cells, which limits transport (Niu et al. 2019). In fact, 98% of the potential drugs that could improve the treatment of many CNS diseases are not actually effective because of their inability to cross the BBB (Pardridge 2012).

To overcome these difficulties, nanoparticles (NPs) have been designed with materials that achieve the purpose of crossing the BBB. Among these materials, chitosan stands out as a cationic polymer that provides positive charge to NPs while also being biodegradable, biocompatible, and non-toxic (Naskar et al. 2019); in addition, surfactants have a fundamental role in the biosynthesis of these NPs, given that they are responsible for determining their structure. Polysorbate 80 (Tween® 80) facilitates endocytosis, since once it is adsorbed on the surface of the NPs, it is able to bind to apolipoprotein E (apoE), a membrane receptor substrate of the LDL protein (Tian et al. 2018). Finally, one of the main lipids contributing to the biosynthesis of NPs is glycerol tripalmitin; it is classified as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) because it is a physiological type of lipid (Kakadia and Conway 2015). Therefore, the synthesis of drug-carrying lipid NPs synthesized from these materials offer many advantages, some of which are their low cost, high drug loading in comparison with others types of NPs, controlled released, simple synthesis, and the possibility of an intravenous administration with a constant release of the drug, which allows a possible reduction of side effects and reduction in the frequency of administrations. In fact, these types of NPs have the ability to cross the BBB and release the drug in the nervous parenchyma (Kuo and Rajesh 2018; Alyautdin et al. 2014).

There are various methods of NP preparation, including solvent injection, supercritical fluid technology, droplet-phase aerosol synthesis, microemulsion, membrane contactor method, and high-pressure homogenization among others (Ghasemiyeh and Mohammadi-samani 2018). In choosing a method for the preparation of NPs, the best option should as much as possible to avoid degradation of the drug and be easily reproducible. Following these objectives, we have used a nanoemulsion by ultra-sonification and high agitation method for the preparation of our NPs. This method is one of the most efficient approaches to preparing nanoemulsions due to the possibility of providing a high

amount of energy locally through cavitation (Kumar et al. 2018).

We decided to complete the study by encapsulating dopamine (DP) in these NPs. In fact, DP is an ideal candidate in the development of a pharmaceutical form that allows drugs unable to cross the BBB reach the brain parenchyma and subsequently release an adequate dose of the drug while also protecting it and preventing its degradation (Pahuja et al. 2015).

Parkinson’s disease (PD) is one of the most common neurodegenerative pathologies, and its most frequent treatment is to administer L-Dopa (DP precursor) because DP, as it has been mentioned, is unable to cross the BBB. L-Dopa is capable of crossing the BBB through a specific brain transport (6); once L-Dopa is located inside the brain parenchyma, a L-amino acid decarboxylase converts L-Dopa into DP. The great advantage of L-dopa is that it can go through the BBB and reach neurons. However, it has some disadvantages such as the loss of efficacy over time, sensitivity to oxidation, and the appearance of extrapyramidal symptoms like nausea or dyskinesia related to the metabolism of L-dopa outside the central nervous system (Trapani et al. 2011). Other alternatives for the treatment of PD consist in preventing the degradation of DP, but this option does not represent a long-term solution due to the effect of the neuronal degeneration progress (Zhou et al. 2018). These approaches aim to increase DP levels or regulate the synthesis of another neurotransmitter that influences motor symptoms. In fact, some drugs may improve DP levels in the brain in two ways: first, as DP precursors and second, by inhibiting enzymes that prevent the recapture of the DA (Ellis and Fell 2017).

Based on this background, the objective of this study was the design and development of solid lipid nanoparticles (SLNPs) capable of transporting different therapeutic molecules to the cerebral parenchyma affected by neurodegenerative diseases. The elaboration process was developed, and once prepared, the NPs were analyzed and physicochemically characterized. In addition, due to the prevalence of PD, one of the best drugs that could be used to treat this pathology would be DP; however, due to its nature, DP is unable to reach its therapeutic targets. So, we have encapsulated the DP inside of these SLNPs and we have studied them to ascertain if this SLNPs loaded with DP retain the same physicochemical properties as the empty ones. Finally, the empty SLNPs were marked and injected

systemically into control animals to demonstrate its ability to cross the BBB and reaching the brain cells successfully.

Material and methods

Materials

Dopamine hydrochloride (DP), Octadecylamine (OA), Glycerol Tripalmitin (GT), and Chitosan (CS) (low molecular weight) were purchased from Sigma-Aldrich Quimica SL (Madrid, Spain); Tween® 80 were obtained from Guinama (Valencia, Spain). Rhodamine-123, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, and PBS were obtained from Sigma-Aldrich Quimica SL (Madrid, Spain). Dichloromethane (DCM) was purchased from VWR (Barcelona, Spain), ketamine (Imalgene 100 mg/ml) from Merial Laboratorios S.A., and xylacine (Rompun®) from Bayer. Uranyl Acetate was obtained from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA), and distilled water was prepared by a Millipore (Billerica, MA, USA) system.

Synthesis of SLNPs

SLNPs were prepared according to a sonication method followed by the use of the high-speed homogenizer Silent Crusher-M from Heidolph. In a first step, an aqueous phase and an oily phase were mixed. On the one hand, the aqueous phase was composed of 7.5 ml of Tween® 80 solution (0.20 % w/v), 7.5 ml of CS solution (0.05 % w/v), and 10^{-4} M rhodamine but only in the empty SLNPs. In the case of NPs loaded with DP, it was used different concentrations of DP elaborated from an initial solution, reaching concentrations of (0.2 to 0.03 mg/ml). On the other hand, the oily phase was composed of GT (0.35 % w/v), OA (0.134% w/v), and 1ml of DCM.

The union of both phases is subjected to sonication during 6 min in parameters of 30 duty cycle and 3 out of control. Subsequently, it was subjected to agitation on a Silent Crusher M stirrer at 5500 rpm for 10 min.

Once elaborated, the DCM is eliminated by evaporation in a laminar flow hood at room temperature.

Characterization of SLNPs

Particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta Potential (ζ -potential) measurement

The size and PDI of the SLNPs were determined by means of dynamic light scattering with Non-invasive Backscattering Optics (NIBS). For this, the mean particle size was determined by Malvern Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK), at $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The average size is expressed in nanometers (nm).

The measurement of ζ -potentials has been carried out in the same device (Malvern Zetasizer Nano ZS®; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) using electrophoretic light scattering and a molecular weight analyzer with static light scattering. The colloidal dispersion is introduced partially diluted. ζ -potential is expressed in millivolts (mV).

In both cases, Malvern Instruments software was used; this software adapts automatically to the attenuation of the dispensing. Three measurements of each sample were made. These three measurements are the average among 10 to 15 repetitions depending on the sample.

Microphotographic analysis

SLNPs are arranged in the suitable supports (grids) for viewing under microscopy. The devices used for this study have been transmission electron microscope (TEM): CARL. ZEISS LEO 906E and Scanning Electron Microscope (SEM): Hitachi S-510. The Scientific Instrumentation Center (CIC) of the University of Granada (Spain) has facilitated both microscopes.

For TEM, the sample was prepared via negative staining. The dispersion was incubated in a grid with carbon support film for 5 min in a Petri dish and contrasted with 1% uranyl acetate in aqueous solution.

For SEM, a drop of the colloidal dispersion of SLNPs was deposited on a corresponding support for the FESEM (pin stub mount) allowing it to dry at room temperature. Subsequently, they were sputtered with carbon with Carbon Coater (Polaron CC7650).

Determination of drug encapsulation efficiency

To determine the efficiency of encapsulation performance of NPs, the dispersion was centrifuged using a centrifuge (Eppendorf AG 5804—Hamburg) at 14000 rpm for 20 min until we got a solid precipitate. The drug content in the supernatant was analyzed spectrophotometrically at 280 nm using a UV–VIS spectrophotometer (UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25) against the blank.

The encapsulation was determined using the following formula:

Encapsulated percentage = (Actual drug content/theoretical drug content) \times 100.

In vitro drug release study

In vitro drug release study was performed using a dialysis membrane (2 kDa molecular weight cutoff Spectra/Por® 6) containing 25 mL of pH 7.4 phosphate buffer. About 5 mL of SLNP dispersion was placed in the dialysis membrane, and both ends were sealed with magnetic weighted closures (Spectra/Por Clousures®). Then, the dialysis bag was kept in the receptor compartment containing dissolution medium (pH 7.4 phosphate buffer) at $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, which was stirred at 100 rpm for 168 h.

At regular time intervals, 1-ml samples were withdrawn and replaced with freshly prepared pH 7.4 phosphate buffer. The drug contents in the samples were analyzed spectrophotometrically at 280 nm by using a UV-VIS spectrophotometer (UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25) against the blank.

In vitro drug release kinetics

Different mathematical models were tested to choose the one, which most reliably explains the release kinetics. Data was analyzed according to zero-order kinetics, first-order kinetics, Higuchi and Hixson Crowell models to search the model that best explains the diffusion process (Doménech Berrozpe et al. 2013); therefore, the Akaike Information Criterion (AIC) allows us to find the function that more accurately fits to the drug release process (Portet 2020). The criterion identifies the model that best fits the data as the one with the minimum value of AIC and was calculated applying the following equation:

$$\text{AIC} = n \cdot \ln \text{SSQ} + 2p$$

n number of pairs of experimental values
 \ln Neperian logarithm
 SSQ sum of residual squares
 p number of parameters of the adjustment function

The model that best fits the data was that with the lowest AIC.

Stability study

A solution of DP in water 0.034mg/mL was prepared. Three aliquots were taken:

- A: It was kept at 4°C and in the absence of light.
- B: It was kept at 25°C and in the absence of light.
- C: It was kept at 25°C and in the presence of light.

All aliquots were measured 24 h and 1 week after their preparation. It was analyzed spectrophotometrically at 280 nm by using a UV-VIS spectrophotometer (UV-Vis PekinElmer Lambda 25) against the blank.

Experimental animals

The in vivo experimental procedures to assess the penetration of the empty SLNPs (eSLNPs) in the brain have been developed in adult male Wistar rats (Charles River). All procedures have been carried out in the Centre for Animal Production and Experimentation of the University of Jaen (CPEA) and previously approved by the local Animal Care Committee and performed in compliance with the Spanish legislation and in accordance with the EU Directive 2010/63/EU (2010).

Histology and microscopy

Histology and confocal microscopic analysis were carried out in the Research Support Services of the University of Jaén (SCAI).

To assess the efficiency of uptake of eSLNPs into the brain parenchyma, rhodamine-123-fluorescence-labeled-eSLNPs, prepared following the sonication method previously described, were injected in the animals throughout the radial tail vein. After 2h from the systemic NPs injection, animals were sacrificed; the brains were removed and cut into slices of 20 μm with a

cryostat (Leica CM1950). Then, slices were washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 15 min each and stained with DAPI (Sigma-Aldrich). Then, sections were mounted on slides for examination under confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5 II). eSLNPs appeared in red due to rhodamine (Excitation 507, Emission 525), whereas the cell nuclei were visualized in blue due to DAPI staining (Excitation 358, Emission 529).

Results and discussion

Physicochemical characterization of NPs: particles size, PDI, and particle zeta potential

In the macroscopic analysis, the dispersion of SLNPs appears with a light, uniform, whitish color, in which the formation of agglomerates is not seen. In addition, the colloidal dispersion shows stability throughout the study. Both eSLNPs and SLNPs with different concentrations of DP were prepared following the previous detailed synthesis method. The results corresponding to the analysis of its size and charge are presented in Table 1.

As can seem in Table 1, the SLNPs have an appropriate size to be injected systemically and be used as pharmaceutical preparation; in this sense, SLNPs with a size between 100 and 200 nm are easily captured by endocytosis, and particles >300 nm are captured by phagocytosis (Decuzzi et al. 2009); therefore, both eSLNP and DP-loaded SLNP should have an ideal size below 300 nm. In fact, the SLNP size is a critical feature to allow it crossing the BBB (Curtis et al. 2018). In fact, as have been published, the interval from 100 to 300nm are the most adequate (Decuzzi et al. 2009), being the optimal size for reaching brain cells around 200nm (Liu and Zhang 2019). The size of SLNPs can be quite varied depending on their nature, and they can be anywhere ranging from 50 to 1000nm in diameter (Ganesan and Narayanasamy 2017); the size, however, can be controlled via various synthesis techniques (Kumar et al. 2018; Sawtarie et al. 2017).

The eSLNPs elaborated without DP had an approximate size of 200 nm; in relation to the NPs loaded with DP, the values obtained, as can be seen in Table 1, were quite similar among them, increasing till 325 nm in the most diluted concentration of DP. The SLNPs loaded with DP resulted in sizes above 200nm, with the

exception of the SLNPs that contained the highest concentrated formulation of DP. This may be due to the fact that DP slightly affects the size of the samples, specifically in the process of synthesis, in which the size of the SLNPs would be altered by the drug (Calija 2017).

The PDI were also analyzed for all samples. All measurements show a unimodal curve around the average size obtained. The polydispersity is around 0.3, which is considered quite correct. In the case of the SLNPs with the lowest concentration of DP, the polydispersity values are slightly larger, reaching 0.495, which could also be related to their bigger size. The data obtained in polydispersion are the result of the materials used and the energy used in the sonification process (inversely related) (Tapeinos et al. 2017). In addition, the data reflect the stability of the SLNPs and they are crucial when analyzing their degradation and release kinetics (Busatto et al. 2018).

The ζ -potential is an indicator of the colloidal stability of a system (Wuttke et al. 2017). A ζ -potential with a greater absolute value creates stability in the preparation (Dave et al. 2019). It also becomes a fundamental parameter to cross cell membranes and particularly the BBB; this is due to the presence of proteoglycans, mucopolysaccharides, glycolipids, flucoproteins, sulfates, and sialic acids, all of which give the cell endothelial membrane a negative charge at physiological pH. Thus, electrostatic interaction between the positively charged part of the SLNPs and the negatively charged of the cell membrane could favor its absorption and transportation through the endothelial cells, facilitating its arrival to the brain parenchyma (Çetin et al. 2017).

In the case of our SLNPs, very similar values are presented for all preparations. All of them have a positive charge, as can be seen in Table 1, with an approximate average of 60mV. The empty SLNPs without DP present a higher ζ -potential value, and they decrease slightly in all preparations as DP concentration decrease. In both cases, its positive charge will facilitate internalization compared to neutral or negative charges (Jo et al. 2015).

TEM and SEM analysis

Empty SLNPs were photographed with SEM and TEM microscopy to ascertain its shape as well as to compare with the size data obtained in previous techniques.

Table 1 Average values of size, polydispersion, and zeta potential of NPs studied

	eSLNP(no DA)	SLNP DA 0,2% (w/v)	SLNP DA 0,1% (w/v)	SLNP DA 0,05% (w/v)	SLNP DA 0,03% (w/v)
Size average (nm)	200.1 ± 3.821	174.8 ± 14.4	273.1 ± 15.22	275.0 ± 9.237	325.5 ± 12.86
Polydispersion	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.07	0.29 ± 0.1	0.404 ± 0.03	0.495 ± 0.05
ζ-potentials (mV)	+68.2 ± 1.85	+66.5 ± 2.5	+54.4 ± 1.44	+54.9 ± 1.27	+57.4 ± 1.25

Figure 1a shows the SLNPs in SEM microscopy. Large clusters formed by the accumulation of SLNPs are visible. These aggregates may be due both to the treatment for visualization by microscopy and to the high concentration of SLNPs (Chantaburanan et al. 2017), since the polydispersity and size measurements show a high stability parameter. These SLNPs have a spherical and slightly oval shape, with a smooth surface, and their size is within the parameters analyzed in Table 1. Homogeneity in sizes is evident. Figure 1b focuses on a single SLNP by TEM microscopy. It has a spherical shape and an approximate equivalent size to the data of the previous zetasizer.

The initial spherical shape of these NPs is due, among other things, to the polysorbate 80 which acts as an emulsifier (Sjöström et al. 1995). Variations have been observed with respect to the original spherical shape, with the SLNPs tending to adopt an oval shape due, on the one hand, to the beam of light used in SEM and TEM that can deform the particles and even melt them, and on the other hand, due to polymorphism phenomena (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas 2018).

Stability of dopamine

Table 2 presents the averages of the results obtained for stability of DP in the different samples and based on temperature and time. All samples began with a solution of DP in water with a concentration of 0.034mg/mL. This concentration was chosen based on its correspondence with the lowest concentration used in the synthesis of NPs.

In Table 2, it can be observed how both time and temperature play a crucial role in the loss of DP. The oxidation is the main process by which DP is lost (Sánchez-Rivera et al. 2003), and it is evidenced in sample A, which was kept at a temperature of 4°C for 24 h and a week and demonstrates less degradation than samples B and C, which were stored at 25°C at the same times. Light also plays an important role in the oxidation of molecules due to the energy contribution of photons. However, the results of samples B and C are very similar both at 24 h and after 1 week. It is worth mentioning that in samples B and C, which were kept at 25°C, the DP is practically completely degraded after a week.

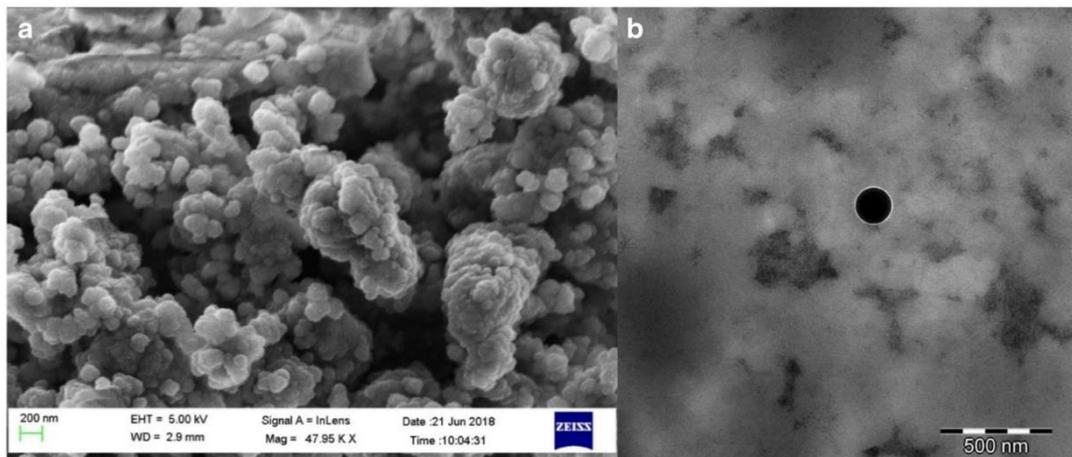
**Fig. 1** Empty NPs. **a** SEM. **b** TEM

Table 2 Percentage of lost dopamine for the different samples (A: 4°C and absence light, B: 25°C and absence light, C: 25°C and presence light)

Time	Sample	Percentage of lost dopamine (%)
24 h	A	4.8% ± 0.40%
	B	7.6% ± 0.31%
	C	7.5% ± 0.34%
1 week	A	28.9% ± 1.57%
	B	97.5% ± 0.91%
	C	98.4% ± 1.22%

In contrast, the effect of pH is no significant difference in different dopamine samples, although if it is observed that this slightly decreases the amount of dopamine added is higher. There is no difference in pH after a week of synthesis

Determination of drug encapsulation efficiency (DEE, %)

The amount of drug that can be encapsulated in SLNPs is one of the crucial parameters when determining the dose necessary to obtain the desired effect. The encapsulation should be as large as possible to decrease the amount of formulation administered.

Figure 2 shows the average values corresponding to the encapsulation for the different concentrations of DP assayed. For our study, we considered studying concentrations of around 0.12 mg/mL due to previous revisions (Pahuja et al. 2015). Since it is not administered directly in humans, there is no definite specific dose.

It can be seen that the level of every encapsulation is above 60%, reaching the maximum encapsulation at a concentration of 0.05 mg/mL where it reaches almost a 70% encapsulation. This value is quite good considering the hydrophilic nature of DP. In addition, this is attributable to the synthesis process by the method of emulsification by ultrasonication. In the field of SLNPs, DEE is a good value, and other authors achieve successful encapsulations with 63% (Pillay et al. 2009).

In vitro dopamine release

The drug release pattern is a very important parameter for any study concerning drug delivery carriers, including lipid SLNPs. Figure 3 shows the percentages of DP released over 168 h.

In the first time frame from 0 to 6 h, the release occurs quickly. This may be due to the rapid dissolution of the existing DP in the areas closest to the surface of the SLNPs (Ganesan and Narayanasamy 2017). Then the curve becomes flatter and the release becomes more

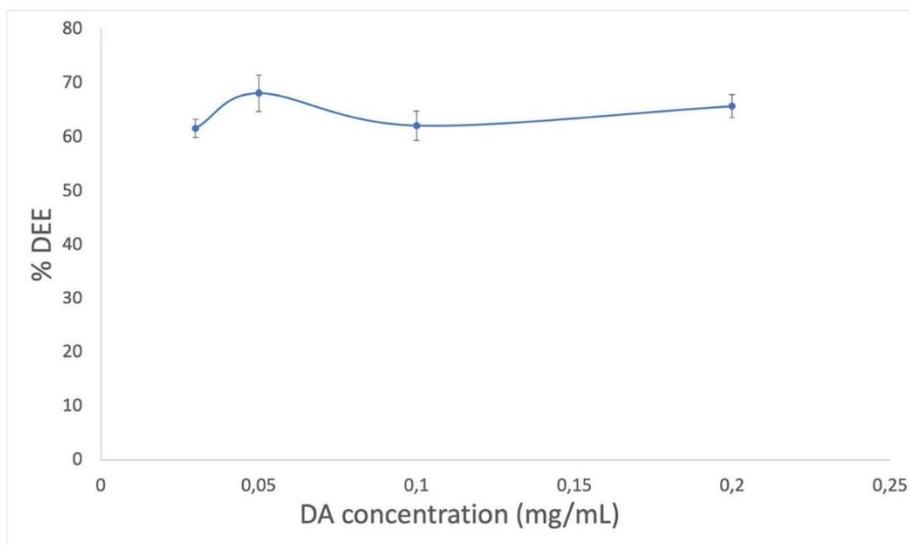


Fig. 2 Percentages of encapsulation for the different DP concentrations

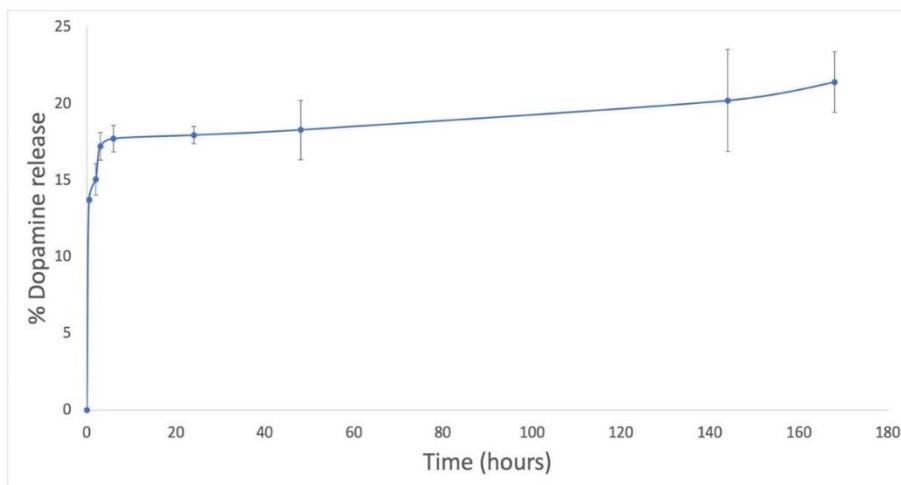


Fig. 3 Percentages of dopamine released over time

sustained over time. The results in this time period from 6 to 168 h are only increased by 4 points. This may be due to the degradation of DP. In the stability study, it can be seen that the concentration of DP decreased with temperature, playing this variable a fundamental role. In this experiment, the temperature is 37°C, which could explain the release of most of the DP and its subsequent degradation, so that, we only come to appreciate 20% of its release when it is already completed.

The experimental data has been adjusted to each of the mathematical methods using the Akaike discriminatory criterion (AIC), in which the method with the lowest AIC value best explains the diffusion process. Table 3 shows the AIC values for the different formulations.

The lowest value is presented by the square root kinetics. This type of kinetics is adjusted to drugs formulated in modified release systems or semi-solid pharmaceutical forms. In both cases, the amount of drug differed as a function of time is determined by the application of the Higuchi equation:

Table 3 Release kinetics of DP SLNPs

Order 1	Higuchi	Hixon-Crowell	Order 0
71.87 ± 2.69	53.46 ± 1.88	64.89 ± 1.07	73.13 ± 1.82

$$Q = \sqrt{(2C_0 - C_s)C_s} * D(t - t_0)$$

in which

- D is the drug diffusion coefficient
- C_0 The initial amount of drug per unit volume of the matrix
- C_s the solubility of the drug in the matrix

This model shows that liberation is not constant, but is time dependent. It will be modified with the square root of time. This type of kinetics is typical of inert matrix systems in which we have a drug and polymer mixtures homogeneously. From that matrix, the drug is released by diffusion. As the molecules inside the matrix must travel a longer path out of the matrix than the shallower molecules, it is why it modifies the release with the square root of time.

Estimation of rhodamine fluorescence of e-SPNPs in the cerebral parenchyma

As observed under confocal microscope (Fig. 4), the empty SLNPs are able to cross the BBB; they appear as red vesicles due to the rhodamine fluorescence within the cerebral parenchyma. Despite the short time elapsed since the injection of the SLNPs (2 h), they can be observed inside the

cytoplasm of the nervous cells, probably associated with the endomembrane cellular system (Fig. 4a); however, some of them are still detected in the lumen of the vessels and inside the vascular wall (Fig. 4b).

Different receptors in endothelial cells could be involved in the mechanisms responsible for the capture of the SLNPs to be transported through the BBB to the brain parenchyma (Alyautdin et al. 2014; Trapani et al. 2011). Nevertheless, these mechanisms are not yet fully known, so more research in this field will be required in the future (Partridge 2015; Alyautdin et al. 2014).

Conclusions

- The SLNPs loaded with concentrations of DP between 0.2 and 0.05% have sizes below 300nm being suitable for penetration through the blood-brain barrier.
- The surface charges of the SLNP were positive in all cases; these values endorse the stability of the dispersion and favor the internalization into cells.
- SLNPs show a spherical shape, and the DP release is sustained over time resulting adequate to be used as pharmaceutical preparation.

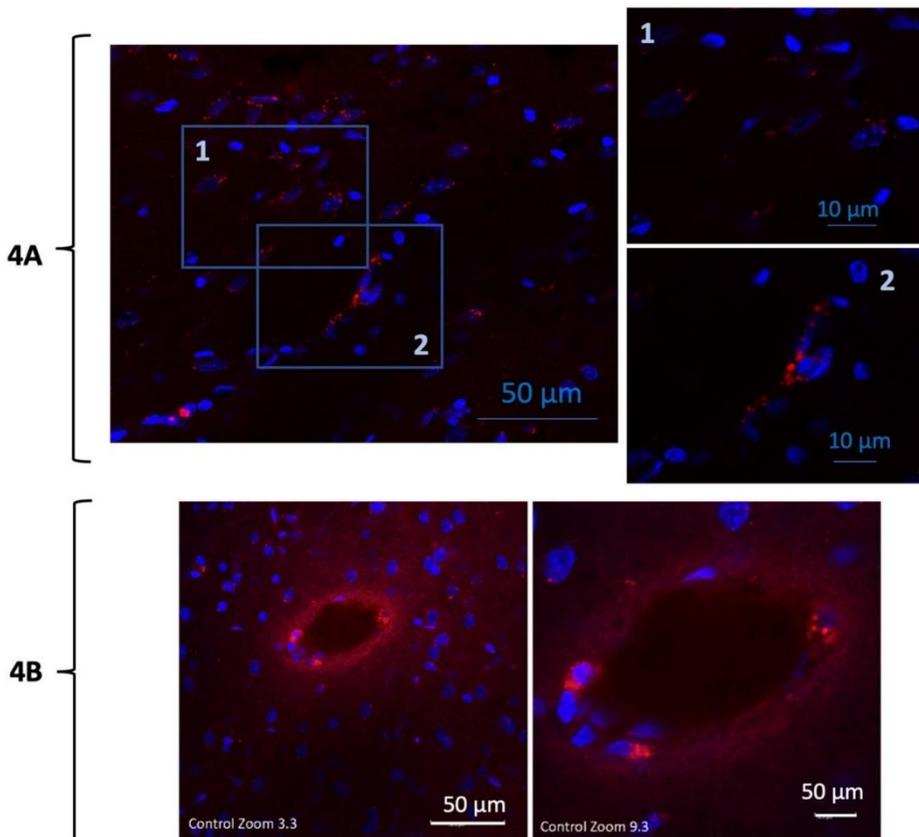


Fig. 4 Confocal microphotographs of a brain sections showing the rhodamine fluorescent eSLNPs in the cerebral parenchyma. **a** The SLNPs as red vesicles inside the nervous cells (probably

neurons) (1) and in the vasculature (2). **b** SLNPs inside the vascular wall and also in nervous cells

- At the concentrations studied, the encapsulation concentrations were around 60%.
- SLNPs are able to reach the brain, proving the ability to cross the blood brain barrier.

Author contribution Elena Ortega and Santos Blanco contributed equally to the present work and share first authorship.

Funding We received financial support from project BFU2016-80316-R of Ministerio de Economía y Competitividad (MEC).

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

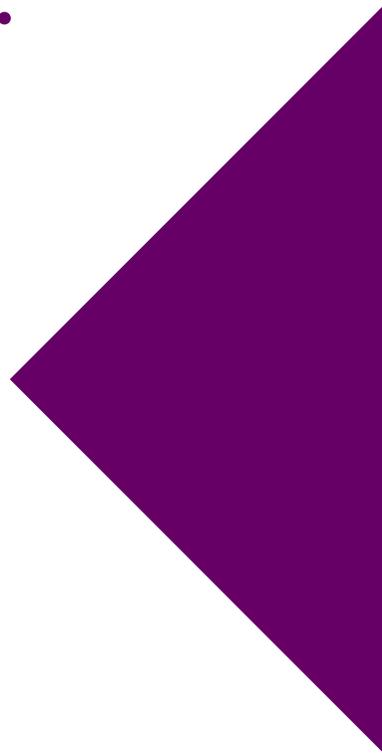
References

- Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH, Kuznetsov D (2014) Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine* 9:795–811
- Busatto C, Pesoa J, Helbling I, Luna J, Estenez D (2018) Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling. *Int J Pharm* 536:360–369
- Calija B (2017) Microsized and nanosized carriers or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Formulation Challenges and Potential Benefits*. Belgrade, Elsevier. Academic Press
- Çetin M, Aytekin E, Yavuz B, Bozdog S (2017). *Nanoscience in targeted brain drug delivery. nanotechnology methods for neurological diseases and brain tumors*. Elsevier. 117–147
- Chantaburaran T, Teeranachaideekul V, Chantasart D, Jintapattanakit A, Junyaprasert VB (2017) Effect of binary solid lipid matrix of wax and triglyceride on lipid crystallinity, drug-lipid interaction and drug release of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal delivery. *J Colloid Interface Sci* 504:247–256
- Curtis C, Toghiani D, Wong B, Nance E (2018) Colloidal stability as a determinant of nanoparticle behavior in the brain. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 170:673–682
- Dave V, Tak K, Sohgaura A, Gupta A, Sadhu V, Reddy KR (2019) Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *J Microbiol Methods* 160: 130–142
- Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M (2009) Expert Review: Intravascular Delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res* 26(1):235–243
- Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart J et al (eds) (2013) *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol II. Ed Síntesis, Madrid
- Ellis JM, Fell MJ (2017) Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. *Bioorg Med Chem Lett* 17:4247–4255
- Ganesan P, Narayanasamy D (2017) Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain Chem Pharm* 6:37–56
- Ghasemiyeh P, Mohammadi-samani S (2018) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci* 13(4):288–303
- Gordillo-Galeano A, Mora-Huertas CE (2018) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review emphasizing on particle structure and drug release. *Eur J Pharm Biopharm* 133:285–308
- Jo DH, Ki JH, Lee TG, Kim JH (2015) Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine* 11:1603–1611
- Kakadia P, Conway BR (2015) Lipid nanoparticles for dermal drug deliver. *Curr Pharm Des* 21(20):2823–2829
- Kumar R, Singh A, Garg N, Siril PF (2018) Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ultrason Sonochem* 40: 686–696
- Kuo Y, Rajesh R (2018) Current development of nanocarrier delivery systems for Parkinson's disease pharmacotherapy. *J Taiwan Inst Chem Eng* 87:15–25
- Liu Q, Zhang Q (2019) 10 - Nanoparticle systems for nose-to-brain delivery. *Brain Target Deliv Syst*:219–238
- Masserini M (2013) Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochem* 238428:1–18
- Naskar S, Sharma S, Kuotsu K (2019) Chitosan-based nanoparticles: an overview of biomedical applications and its preparation. *J Drug Deliv Sc Technol* 49:66–81
- Niu X, Chen J, Gao J (2019) Nanocarriers as a powerful vehicle to overcome blood-brain barrier in treating neurodegenerative diseases: Focus on recent advances. *Asian J Pharm Sci* 14: 480–496
- Pahuja R, Seth K, Shukla A, Shukla RK, Bhatnagar P (2015) Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in Parkinsonian rats. *ACS Nano* 9(5):4850–4871
- Pardridge WM (2012) Drug transport across the blood – brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1959–1972
- Pardridge WM (2015) Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 19:1059–1072
- Pillay S, Pillay V, Choonara YE, Naidoo D, Khan RA, Toit LC, Ndesendo VNK, Modi G, Danckwerts MP, Iyuke SE (2009) Design, biometric simulation and optimization of a nano-enabled scaffold device for enhanced delivery of dopamine to the brain. *Int J Pharm* 382:277–290
- Portet S (2020) A primer on model selection using the Akaike Information Criterion. *Infect Dis Model* 5(5):111–128
- Rehman M, Madni A, Shi D, Ihsan A, Tahir N, Chang KR, Javed I, Webster IJ (2013) Enhanced blood brain barrier permeability and glioblastoma cell targeting via thermoresponsive lipid nanoparticles. *Nanoscale*. 9:15434–15440
- Sánchez-Rivera AE, Corona-Avenidaño S, Alarcón-Angeles G, Rojas-Hernández A, Ramirez-Silva MT, Romero-Romo MA (2003) Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants.

- Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc 59(13): 3193–3203
- Sawtarie M, Cai Y, Lapitsky Y (2017) Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 157:110–117
- Sjöström B, Kaplun A, Talmon Y, Cabane B (1995) Nanoparticles prepared in water in oil microemulsion. *Pharm Res* 12:39–48
- Tapeinos C, Battaglini M, Ciofani G (2017) Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J Control Release* 264: 306–332
- Tian C, Asghar S, Xu Y, Chen Z, Zhang J, Ping Q, Xiao Y (2018) Tween 80-modified hyaluronic acid-ss-curcumin micelles for targeting glioma: Synthesis, characterization and their in vitro evaluation. *Int J Biol Macromol* 120:2579–2588
- Trapani A, De Glio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, Cassano T, Gaetani S, Cuomo V, Trapani G (2011) Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int J Pharm* 419(1):296–307
- Wuttke S, Lismont M, Escudero A, Rungtaweevoranit B, Parak WJ (2017) Biomaterials Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery e A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers. *Biomaterials*. 123:172–183
- Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM (2018) Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release* 270:290–303
- Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO III:

VÍA NASAL



1. Introducción

Como hemos visto en el capítulo anterior, el desarrollo y diseño de nanopartículas como transportadores de fármacos está suponiendo un avance en la terapéutica. No obstante, aún tiene limitaciones siendo necesario una mayor funcionalización para aumentar el rendimiento y la eficiencia en su biodistribución de modo que se puedan concentrar las NPs en el tejido diana.

Por ello, aunque se ha visto que las nanopartículas lipídicas propuestas atraviesan la BHE haciéndose disponibles en el SNC, se busca una alternativa a la administración parental que permita, al mismo tiempo, aumentar la biodisponibilidad de éstas en el tejido cerebral.

En base a este objetivo, se propone la vía nasal como vía alternativa de fácil acceso al SNC.

La administración de fármacos por vía intranasal está adquiriendo gran relevancia en los últimos años convirtiéndose en uno de los accesos más prometedores al SNC. El transporte directo de la nariz al cerebro supone una alternativa no invasiva emergente, que permite el paso de grandes moléculas hacia el cerebro de forma eficiente. Numerosos trabajos (Cayero-Otero et al., 2019; Davis, 2001; Dhuria et al., 2009, 2010; Jadhav et al., 2007; Shen et al., 2022) han demostrado que se pueden administrar por esta vía tanto fármacos como nanopartículas y que estos se pueden transportar directamente al cerebro paracelular o transcelularmente a lo largo de los nervios olfativos y trigeminales (Q. Liu & Zhang, 2018) sin una exposición periférica significativa. Por lo tanto, el suministro intranasal tiene el potencial de evitar la liberación periférica, disminuir la toxicidad sistémica y reducir la dosis necesaria.

Sin embargo, el suministro intranasal está restringido por la capacidad de administrar medicamentos concentrados en un volumen limitado. Además, la biodisponibilidad es muy limitada. Los fármacos lipofílicos generalmente pueden atravesar fácilmente la mucosa nasal con una alta biodisponibilidad (> 75%), por ejemplo, propranolol, fentanilo y buprenorfina. Sin embargo, los fármacos hidrófilos muestran una absorción pobre con una biodisponibilidad de aproximadamente el 10% y los valores para péptidos y proteínas son generalmente menos del 1% (Casettari & Illum, 2014). Las cantidades de fármaco transportadas directamente desde la nariz al cerebro a través de los nervios olfatorio o trigeminal se reducen aún más, normalmente menos de 0,1%, lo que limita la comercialización de medicamentos administrados por vía intranasal (Mistry et al., 2009). Varios potenciadores de la absorción, como el quitosán, los derivados de la β -ciclodextrina, la poli-L-arginina, y el caprato de sodio han demostrado ser eficaces en la administración intranasal de fármacos hidrófilos (Chengcheng et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de los potenciadores de la absorción son tóxicos para la mucosa nasal, limitando su aplicación en humanos. En particular, estos potenciadores no son aptos para el tratamiento de enfermedades crónicas.

Experimentos en modelos animales han demostrado que los sistemas de administración de fármacos de tamaño nanométrico pueden mejorar su administración por esta vía en comparación con formulaciones de soluciones de fármacos equivalentes (Dhuria et al., 2010). Por eso, pensamos que la administración intranasal de nanopartículas terapéuticas puede ser sumamente útil para mejorar la penetración de

los fármacos por esta vía. De hecho, se ha podido comprobar ya en tratamientos tumorales cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer.

1.1. Anatomía y fisiología nasal

La nariz es responsable del olfato y de la respiración. Está compuesta por dos cavidades simétricas, divididas por el tabique que se encuentra a lo largo del plano sagital medio. Las cavidades están revestidas por una capa de mucosa y el área total de ambas cavidades es de aproximadamente 150 cm². Estas cavidades se pueden dividir en tres regiones las cuales encontramos en la figura 28, donde podemos ver su localización y en la tabla 4 sus principales características y funciones (Crowe et al., 2018).

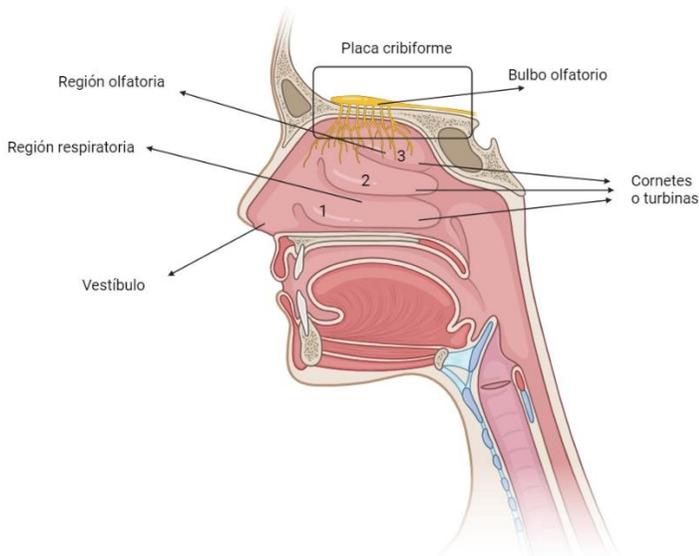


Figura 28: Representación de las diferentes regiones de la cavidad nasal. Creado con Biorender.

De forma general, la cavidad nasal tiene una función protectora, actuando como un filtro para patógenos, alérgenos y sustancias tóxicas quedando atrapados en la capa de moco que recubre las vías respiratorias. Además, se encarga del aclaramiento mucociliar, que consiste en el transporte progresivo de estas sustancias hacia la parte posterior de la garganta para que sean eliminadas por el tracto nasogástrico. Otras sustancias serán expulsadas con el aire espirado. Por último, otra función muy importante es la de humidificar y calentar el aire inhalado para que no tenga un impacto negativo en las vías respiratorias (Crowe et al., 2018; Cunha et al., 2017).

Región	Área superficial	Características	Vascularización	Epitelio
Vestibular	0,6 cm ²	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Baja permeabilidad y pequeña superficie que limita la absorción de fármacos. ▶ Presencia de moco y pelos que constituyen un mecanismo de defensa ante la entrada de patógenos, alérgenos y sustancias tóxicas. 	Baja	Epitelio escamoso
Región respiratoria	130 cm ²	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Alta permeabilidad y gran superficie, siendo el lugar preferente de absorción de fármacos. ▶ La absorción de fármacos va directamente a la circulación sistémica. ▶ Se divide en tres turbinas o cornetes. ▶ Presenta cilios, microvellosidades y moco. ▶ Ocurren eventos de aclaramiento mucociliar. 	Alta	<p>Células caliciformes</p> <p>Células basales</p> <p>Células columnares ciliadas y no ciliadas.</p>
Región olfatoria	10 cm ²	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Se localiza por encima de la región respiratoria y por debajo de la placa cribiforme. ▶ Incluye la turbina superior y la parte superior de la turbina del medio. ▶ Destacar que supone el 10% de la región en humanos y hasta el 50% en roedores. ▶ Permite el paso de fármacos hasta el SNC a través del bulbo olfatorio. ▶ Zona responsable de la detección de los olores. 	Alta	<p>Células basales</p> <p>Células de soporte</p> <p>Células trigeminales (rama oftálmica) Células nerviosas olfatorias</p>

Tabla 4: Principales regiones de la cavidad nasal y sus funciones. Modificado de (Costa et al., 2021).

1.2. Mecanismo de transporte de fármacos por vía intranasal

Además de sus funciones fisiológicas, la cavidad nasal ha sido tradicionalmente una ruta no invasiva para la administración de medicamentos con acción local como los descongestivos y vasoconstrictores. Más recientemente, se ha estudiado la administración de fármacos que puedan acceder a la circulación sistémica por esta misma vía ya que está altamente vascularizada y tiene una permeabilidad relativamente alta. Por esta razón, es importante distinguir entre el término administración nasal, que se refiere a los efectos locales y el término administración intranasal, que se refiere a la acción sistémica (Cunha et al., 2017).

Las principales ventajas de las vías nasal e intranasal son: inicio de la acción rápido, facilidad de administración por el propio paciente, una gran área de superficie para la absorción de fármacos (debido a las microvellosidades que cubren la superficie epitelial), los fármacos no sufren metabolismo de primer paso, menos efectos secundarios, alto flujo sanguíneo desde la capa subepitelial, entrega directa de fármacos al cerebro a través del epitelio olfatorio y los nervios trigéminos, y alta biodisponibilidad sistémica de los fármacos. Entre sus principales limitaciones se encuentran el rápido aclaramiento mucociliar, la limitada absorción para fármacos hidrofílicos y de alto peso molecular (Tai et al., 2022).

Para que el fármaco llegue a la circulación sanguínea, debe atravesar varias barreras. La primera barrera es la capa de moco en la que el

fármaco necesita disolverse o pasar rápidamente a través de la capa de moco, ya que los cilios lo eliminarán del sitio de absorción. A continuación, se encuentran con la membrana celular epitelial (Tai et al., 2022).

Los fármacos que consiguen atravesar la mucosa nasal lo hacen principalmente por dos mecanismos, vía transcelular o vía paracelular (Mato, 2019).

- Vía paracelular: este transporte tiene lugar a través de los espacios acuosos de las uniones estrechas de las células del endotelio por difusión pasiva. Las moléculas que atraviesan el epitelio por este mecanismo tienen que ser polares y además un peso molecular pequeño. Existe una relación inversa entre el peso molecular y la permeación del fármaco (Fortuna et al., 2014).
- Vía transcelular: en este caso, las moléculas deben atravesar las membranas de la célula. Son moléculas de carácter lipófilo que cruzan la célula por diferentes mecanismos: difusión pasiva, transporte activo a través de transportadores expresados en la membrana de las células epiteliales, o transporte vesicular. Específicamente en la mucosa nasal, se han identificado transportadores de aniones y cationes orgánicos, transportadores de péptidos y transportadores específicos con el de la glicoproteína P (Fortuna et al., 2014).
- Intracelular: los fármacos se absorben a través de las neuronas disponibles en la mucosa nasal. Al tener que atravesar la membrana de las células neuronales, los fármacos deben tener un perfil lipófilo (Crowe et al., 2018).

De forma general, independientemente del mecanismo, los fármacos con elevados pesos moleculares (> 1kDa) se absorben muy lentamente por la mucosa nasal, siendo su biodisponibilidad entre 0,5 y el 5% (Cunha et al., 2017).

1.3. Administración intranasal de fármacos hacia el SNC

Como ya he comentado, en los últimos años, la vía de administración intranasal supone una nueva estrategia en la administración de fármacos directamente al SNC. La mucosa nasal está, en general, muy vascularizada y además está inervada por las neuronas de los nervios trigémino y olfatorio por lo que es la única región del SNC que no está protegido por la BHE. Hay numerosos estudios que demuestran su eficacia tanto en ensayos preclínicos como clínicos (Battaglia et al., 2018; Z. Wang et al., 2019).

1.3.1. Vías de transporte nose-to-brain

El término “nose-to-brain”, “de la nariz al cerebro” en español, es el término más utilizado por la comunidad científica para referirse a los fármacos, estrategias y todo lo relacionado con las vías de transporte que, desde una administración nasal, se pretende alcanzar el SNC.

No obstante, todavía no se conoce el mecanismo exacto por el que los fármacos acceden al SNC, solamente se sabe que tiene lugar por el epitelio respiratorio y olfativo. Una vez que se llega a la placa cribiforme, el fármaco puede atravesar por vía directa o indirecta. Por vía indirecta,

la sustancia activa llega a la circulación, cruza la BHE y llega al cerebro; y por vía directa el fármaco alcanza las células neuronales y se deposita directamente en el tejido cerebral. Las vías de transporte neuronales son a través del nervio trigémino y nervio olfatorio (Costa, Barreiro, et al., 2021c; Khan et al., 2017). Por tanto, dependiendo de la formulación y de las características fisicoquímicas del fármaco, se pueden utilizar una o varias vías para acceder al SNC.

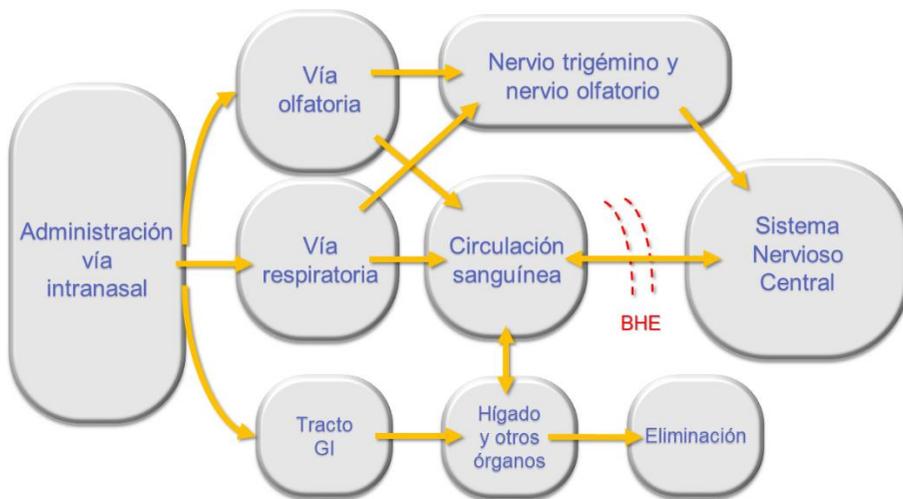


Figura 29: Esquema de las principales vías seguidas tras una administración nasal.

Los fármacos pueden acceder al SNC desde la región olfatoria o desde la región respiratoria.

► Región olfatoria

Cuando el fármaco llega la región olfatoria, puede pasar desde las fosas nasales hasta el bulbo olfatorio a través del transporte intraneuronal por las células del nervio olfatorio o vía extraneuronal (mecanismos trans- o paracelular) por las células del epitelio. También se puede absorber a

través del nervio trigémino, pasando por la placa cribiforme (Akel et al., 2020). La vía intraneuronal es lenta pudiendo tardar horas o días hasta que el fármaco llegue al SNC. En cambio, la vía transcelular, por la que se absorben la mayoría de las moléculas lipófilas, es muy rápida, apareciendo en el cerebro de forma casi inmediata (Long et al., 2020).

El bulbo olfatorio, proyecta sus neuronas hacia diferentes regiones del cerebro como la corteza piriforme, la amígdala y el hipotálamo, por ello es tan útil en la administración de fármacos al cerebro (Khan et al., 2017).

Además, aunque el epitelio olfatorio tiene proteínas típicas del endotelio cerebral, como las uniones estrechas, la tasa de regeneración de las neuronas olfatorias es aproximadamente cada 3-4 semanas, por lo tanto, mientras que las neuronas se maduran, podemos decir que la barrera nasal es más permeable, favoreciendo el paso de los fármacos (Battaglia et al., 2018; Lofts et al., 2022).

► Región respiratoria

Toda la región respiratoria, que ocupa la mayor parte de la cavidad nasal, se encuentra inervada por el nervio trigémino por lo que todo fármaco que acceda al SNC desde esta región lo hará por el mecanismo intraneuronal de este nervio. También se trata de una vía lenta tardándose horas o días en que la molécula llegue al cerebro (Lofts et al., 2022). Constituye una vía más para el paso de moléculas de la nariz al cerebro, pero menos importante que la vía olfativa (Tai et al., 2022).

Debido a que la entrada a través de la placa cribiforme es común tanto para el nervio olfatorio como para el trigémino, es difícil distinguir si los

fármacos administrados por vía intranasal alcanzan el bulbo olfatorio y otras áreas cerebrales a través de las vías olfatorias o trigéminas, o si ambas vías están involucradas (Battaglia et al., 2018).

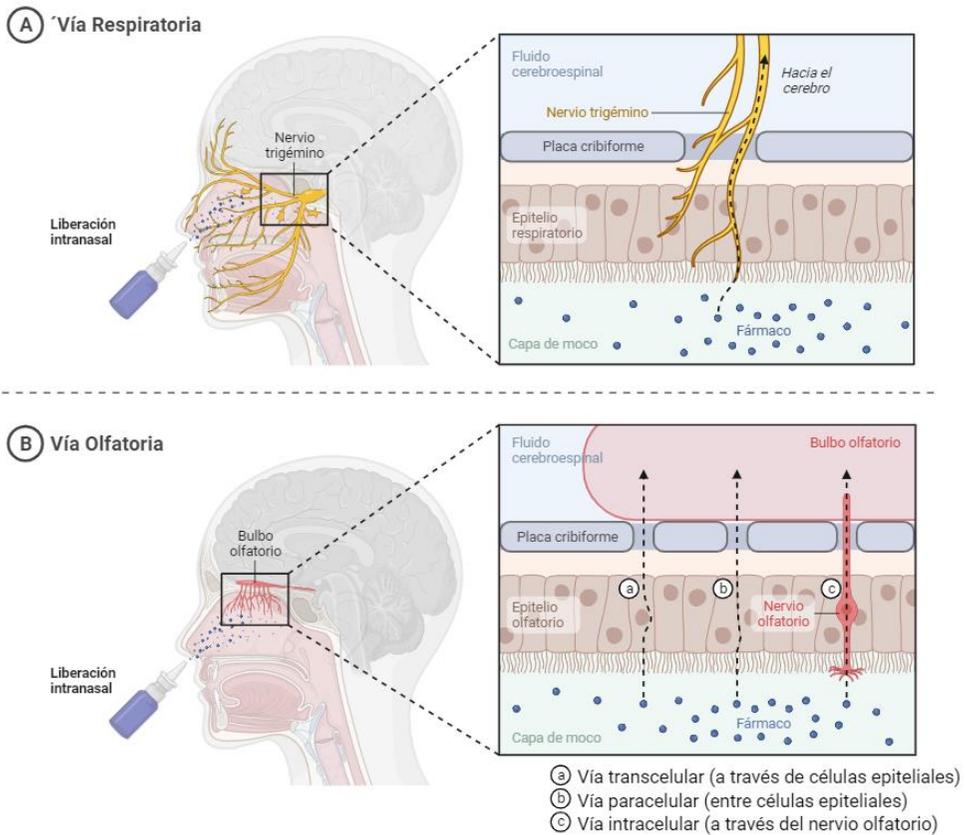


Figura 30: Representación de las principales vías *nose-to-brain*. Creado con Biorender.

Complementario a estas dos vías de acceso al SNC y debido a que las zonas respiratoria y olfativa están muy vascularizadas, puede producirse absorción del fármaco hasta la circulación sanguínea. Se trata de un mecanismo de absorción indirecto en el que los fármacos pasan primero por la circulación sanguínea y los pulmones antes de acceder al cerebro (Costa, Moreira, et al., 2021). Los fármacos entran en la circulación

sanguínea por los mecanismos previamente comentados y desde ahí, pasando a través de la BHE, consiguen acceder al SNC, por tanto, se aumenta el tiempo para lograr el efecto terapéutico y la cantidad que llega. También encontramos otras limitaciones en esta ruta como un efecto de primer paso, unión a proteínas plasmáticas, degradación por proteasas y SRE, y efectos periféricos no deseados (Tai et al., 2022). Nos enfrentaríamos a un perfil farmacocinético igual que si lo administrásemos por vía intravenosa (Yokel, 2022). Por lo tanto, los fármacos pueden llegar al cerebro tanto a través de la vía directa como de la vía sistémica, lo cual depende en gran medida de las propiedades del fármaco (Akel et al., 2020).

Por último, hay que destacar que siempre puede haber una fracción del fármaco que no pueda ser retenida en la cavidad nasal y que por el aclaramiento mucociliar continúe su camino hacia el tracto gastrointestinal. En el que sufrirá una farmacocinética igual que si se administrase por vía oral, bien siendo degradado por los fluidos gastrointestinales o bien absorbido y su incorporación en la circulación sanguínea (Costa, Moreira, et al., 2021).

1.3.2. Factores que afectan a la administración intranasal

El diseño de una formulación con aplicación nasal y como objetivo la absorción intranasal conlleva el control de varios factores que si son modificados pueden comprometer la viabilidad de los fármacos y, por tanto, su biodisponibilidad cerebral y su efecto terapéutico. En la figura 31 podemos ver de forma resumida cuales son esos factores. A continuación, se destacan los más relevantes.

FACTORES QUE AFECTAN A LA ADMINISTRACIÓN NASAL DE FÁRMACOS



Figura 31: Esquema de los factores que afectan a la administración nasal de fármacos.

Modificado de (Chaurasia & Dogra, 2017)

► Tamaño, peso molecular y lipofilia del fármaco

Como previamente comentamos en la sección anterior, las moléculas con un tamaño superior a 1kDa (proteínas, péptidos y genes) se absorben muy lentamente. Cuanto menor va siendo el peso molecular, tendrá lugar una absorción más rápida. Por debajo de 300Da, no hay

problema en su capacidad de absorberse. Para las moléculas con pesos moleculares entre 300 y 1000 Da su absorción va a depender también de otras propiedades fisicoquímicas estableciéndose una relación entre el peso molecular y la lipofilia que determinará su mecanismo y velocidad de absorción. Las partículas depositadas en la cavidad nasal deben disolverse antes de la absorción, pero no puede ser una solubilidad muy alta ya que si no serán eliminadas por el aclaramiento mucociliar. En general, deben ser de carácter lipófilo, pero ligeramente solubles en agua para favorecer su solubilización en la capa mucosa (Dhakar et al., 2011; Khan et al., 2017; Lofts et al., 2022).

► Aclaramiento mucociliar

El movimiento de los cilios y la mucosidad son mecanismos de defensa naturales para proteger el sistema respiratorio de la invasión de patógenos y otros cuerpos extraños. La mucosidad atrapa las partículas extrañas y se elimina mediante el movimiento continuo de los cilios conduciéndola hacia el tracto nasogástrico (Khan et al., 2017). La absorción de fármacos está influenciada por el tiempo de residencia entre el fármaco y el tejido epitelial. El aclaramiento mucociliar elimina el fármaco y los sistemas de formulación de la cavidad nasal y reduce el tiempo de contacto con la mucosa, lo que finalmente conduce a una disminución en la llegada de fármacos al cerebro. Cualquier cambio que conlleve a un aumento de la viscosidad va a reducir el aclaramiento y va a favorecer la absorción (Dhakar et al., 2011; Jiao & Zhang, 2019; Laffleur & Bauer, 2021).

1.3.3. *Optimización de nanopartículas para su administración en la cavidad nasal*

Tradicionalmente, se han desarrollado varias estrategias para mejorar la solubilización, la absorción y el transporte a través del epitelio y, en definitiva, la biodisponibilidad de los fármacos administrados. Estas estrategias incluyen (Alberto et al., 2022; Cunha et al., 2017):

- ▶ Los cambios estructurales en la molécula del medicamento pueden mejorar sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, su absorción. Los profármacos se administran en forma inactiva y requieren una metabolización para convertirse en su forma activa.
- ▶ Los potenciadores de absorción son excipientes que mejoran la permeabilidad de los medicamentos, especialmente los hidrofílicos. Actúan alterando la bicapa fosfolipídica y la fluidez de la membrana o abriendo las uniones estrechas entre las células epiteliales.
- ▶ Los inhibidores enzimáticos protegen los medicamentos contra la degradación enzimática en la cavidad nasal, aumentando su disponibilidad para su absorción.
- ▶ Los agentes mucoadhesivos aumentan el tiempo de contacto entre la formulación y la mucosa nasal, mejorando la absorción de medicamentos hidrofílicos y reduciendo la eliminación mucociliar.

A pesar de ello, nos encontramos con bajos niveles de transferencia de la mayoría de los fármacos, es por ello, por lo que se proponen las formulaciones a base de NPs para mejorar estos inconvenientes y hacer que la administración sea más efectiva.

Las NPs suponen un método efectivo de acceso de los fármacos al SNC ofreciendo la posibilidad de mejorar la penetración o prolongar el

tiempo de residencia en la cavidad nasal. Se debe a que presentan unas ventajas únicas como ofrecer protección al fármaco encapsulado de la degradación biológica y/o química, evitan el metabolismo de primer paso, evitan la BHE, minimizan la exposición sistémica, escapan del SRE y todo eso llegando al lugar de acción de una forma no invasiva y en concentraciones adecuadas (Alberto et al., 2022; Cunha et al., 2017). Además, presentan una liberación prolongada de los fármacos y presentan una baja o nula toxicidad debido al uso de excipientes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Costa, Moreira, et al., 2021).

Otras de las estrategias por las que las NPs llevan el fármaco de forma efectiva al SNC es porque debido a los tensioactivos que presentan la mayoría de las NPs en su composición, tienen la capacidad de abrir transitoriamente las uniones estrechas del epitelio de la mucosa nasal (Akel et al., 2020; Battaglia et al., 2018).

Para el empleo de las NPs como formas farmacéuticas es esencial que tengan un perfil de seguridad y toxicología adecuado para su administración en humanos. De entre todos los portadores de tipo coloidal, son las nanopartículas lipídicas las que resultan más prometedoras respecto a su biocompatibilidad y efectividad mostrando ser superiores a las de tipo polimérico o a las inorgánicas (Akel et al., 2020; Torres et al., 2023).

En concreto, las SLNP, como ya dijimos en el capítulo I, son partículas de hasta 1000nm que se componen de un núcleo de carácter lipídico y

de naturaleza sólida, rodeado por una capa de tensioactivo que contribuye a su estabilidad en dispersión acuosa (Akel et al., 2020; Battaglia et al., 2018). Las NPs diseñadas constan de un tamaño entre los 200 y 300 nm por lo que tienen unas características adecuadas para encapsular y transportar a través de la vía olfatoria una gran cantidad de fármacos y liberarlos en el tejido nervioso (Khan et al., 2017). En nuestro caso, debido al carácter hidrófilo de la dopamina, se intenta introducirla en el SNC dentro de estos transportadores de carácter lipófilo que cuentan con un tamaño adecuado para este fin. Además, el recubrimiento empleado con el polímero quitosan ha demostrado que mejora la capacidad de entrega de los fármacos a nivel cerebral, aunque todavía no se sabe bien el mecanismo (Z. Wang et al., 2019).

Las SLNPs tienen un gran potencial como vehículos “nose-to-brain” ya que presentan ventajas como (Akel et al., 2020; Alberto et al., 2022):

- ▶ Pueden encapsular fármacos tanto hidrófilos como lipófilos.
- ▶ Su carácter lipófilo les confiere una tendencia natural de atravesar la BHE con una toxicidad muy baja. A lo que contribuye también la ausencia de disolventes orgánicos en su síntesis.
- ▶ Su capacidad de funcionalización en la superficie puede modificar la liberación de la sustancia activa.
- ▶ Se mejora la BD de las NPs en el cerebro debido a que, como la difusión pasiva se rige por la ley de Fick, que depende de la concentración del fármaco, va a ser mucho mayor en el lugar de absorción por vía nasal que en la interfase circulación sistémica-BHE-cerebro.

Respecto al mecanismo de entrada de las NPs por vía intranasal, van a seguir las rutas previamente comentadas en este capítulo, siendo la naturaleza y las características fisicoquímicas de éstas las que marquen el camino que van a seguir. No obstante, las SLNP por su carácter lipófilo van a tener mayor facilidad para atravesar las células. Se ha visto como tras una administración intranasal se encuentran en apenas 5 minutos en el bulbo olfatorio, pero se sigue sin esclarecer aún su mecanismo exacto de entrada. No olvidar que también pueden incorporarse a la circulación sistémica y atravesar la BHE.

A pesar de todo ello, y dado que la vía olfatoria es la predominante, la penetración óptima de las NPs se dará cuando éstas sean capaces de adherirse a la región olfatoria. El inconveniente es que la eliminación mucociliar ocurre cada 15-20 min por lo que es de máxima importancia que se produzca una absorción rápida a través de la membrana mucosa. La llegada de las NPs con el fármaco será más efectiva cuando las formulaciones tengan la capacidad de mantenerse en la cavidad nasal a pesar del aclaramiento mucociliar (Maher et al., 2023).

Por ello, el empleo de dispersiones acuosas de NPs tiene sus limitaciones debido a la baja viscosidad que presentan haciendo que el tiempo de contacto con el lugar de absorción sea muy bajo y por ende reduciendo la eficacia terapéutica del fármaco (Costa, Barreiro, et al., 2021c).

Para evitar esto, se ha pensado en estrategias que aumenten la consistencia de la formulación. Se han formulado preparaciones semisólidas convencionales, como hidrogeles, cremas y ungüentos, o la adición de agentes viscosizantes, polímeros mucoadhesivos o polímeros de gelificación *in situ* directamente a la fase acuosa de las dispersiones de NPs (Costa, Barreiro, et al., 2021c).

Los últimos avances en este campo incluyen el desarrollo de hidrogeles o geles poliméricos sensibles a temperatura, pH o iones que gelifican al contacto con la mucosa nasal, permitiendo así una fácil aplicación al ser de consistencia líquida, y que una vez dentro de la cavidad nasal, debido a su consistencia semisólida son capaces de aumentar su tiempo de residencia (Maher et al., 2023; Taléns-Visconti et al., 2023).

2. Material y métodos

2.1. Materiales

Pluronic F-68 y Pluronic F-127 obtenidos de Sigma-Aldrich Química SL (Madrid, España).

Los ratones macho C57BL/6 fueron obtenidos de Charles River. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas éticas europeas y fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Unidad del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España) y por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Escuela de Medicina Mount Sinai. Todos los animales fueron alojados en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en una sala con control de temperatura de 28-30 °C y humedad relativa del 30%-40%. Se les proporcionó agua ad libitum y una dieta estándar.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación del gel termosensible in situ

Además del diseño de unas NPs de naturaleza lipídica y adhesivas por sí mismas, se pretende preparar una formulación que sea semisólida en la cavidad nasal con el fin de aumentar el tiempo de residencia en esta. Idealmente, se persigue el diseño de una formulación que presente una viscosidad lo más baja posible para que se pueda aplicar en forma de aerosol tras la pulverización nasal, y que, tras su administración en la cavidad nasal sea capaz de transformarse en un gel de alta viscosidad para aumentar el tiempo de permanencia en la misma (Qian et al., 2014).

Para ello, el gel termosensible fue preparado por el método en frío descrito por Schmolka con ligeras variaciones. En primer lugar, se mezcla Pluronic F-68 (20% w/v) con agua destilada. Se agita magnéticamente a temperatura ambiente hasta completa disolución. La mezcla, fue colocada en un baño de hielo seguido de la adición de Pluronic F-127 a la mezcla. La solución transparente final se almacenó a 4°C para futuros ensayos. A partir de la formulación de este gel base, le hemos incorporado NPs en condiciones diferentes para ver como afectaban a las propiedades del gel.

En primer lugar, se obtuvo el gel en el que se encontraban dispersas las NPs a una concentración de 1 mg/mL (NPs-Gel). En segundo lugar, al gel se le añadieron NPs liofilizadas hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL (Liof-NPs-Gel); y en tercer lugar, al gel se le añadieron NPs liofilizadas pero que contenían sacarosa al 1% (Sac-Liof-NPs-Gel) ya que

fue el crioprotector con el que no se alteraban las propiedades de las NPs.

2.2.2. Ensayo gelificación in situ

Para evaluar la temperatura a la que el gel es capaz de pasar a estado sólido, se ponen 2 mL de la formulación en estado líquido en un tubo de ensayo (10mL) con diámetro de 1cm y se sella con parafilm. Se colocan en un baño termostatzado a 10° C y bajo agitación suave. Cada 10 min, tiempo para la estabilización de la temperatura del agua, se procede a un incremento de temperatura de la siguiente forma. De 10 a 20°C se incrementa la temperatura en intervalos de 2°C. A partir de 20°C, el incremento es cada 0,5°C hasta que gelifique, es decir que cuando ponemos el tubo en horizontal, la curvatura del menisco permanece estática, ahí se habrá producido la gelificación. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

2.2.3. Medición de las propiedades reológicas

Una de las propiedades más importantes de los fluidos es la viscosidad, la cual define el comportamiento reológico de un fluido. La resistencia interna de un fluido al movimiento o a la fluidez es la viscosidad. La viscosidad depende de la magnitud de las fuerzas intermoleculares, que a su vez dependen de la distancia entre las moléculas. Por tanto, a mayor viscosidad, mayor será la resistencia que ofrezca la formulación a ser eliminada por el movimiento de los cilios. Para ello, se ha realizado un ensayo reológico para medir las diferentes viscosidades entre la formulación a diferentes temperaturas, 18 y 35°C, temperaturas a las

que la formulación se encuentra en estado líquido y semisólido, respectivamente. Para la medida de la viscosidad, se utilizó un viscosímetro Haake RotoVisco 1 (Thermo Scientific™) acoplándole los cilindros coaxiales del tamaño adecuado para la toma de medidas. En el cilindro coaxial externo, de mayor diámetro, se introduce una cantidad necesaria y suficiente de las muestras objeto de estudio, en cuyo centro se introducirá el cilindro coaxial rotatorio de menor diámetro. Este instrumento mide directamente la velocidad controlada con la que gira el cilindro coaxial menor, o bien, el esfuerzo controlado que este sufre al girar sobre una pequeña cantidad de muestra con una determinada velocidad. Esto se traduce en mediciones de viscosidad con tasas de corte definidas y curvas de flujo con rampas de velocidad con programas de temperatura automáticos registradas con ayuda de los softwares HAAKE RheoWin Job Manager y HAAKE RheoWin Data Manager. La medición se realizó aumentando la velocidad de rotación desde 0 hasta 400 s⁻¹ y viceversa, y se registraron el esfuerzo ejercido por el cilindro coaxial (τ), la velocidad de deformación del cilindro coaxial ($\dot{\gamma}$) y la viscosidad (η). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.2.4. Biodistribución

Los ensayos experimentales para evaluar la biodistribución *in vivo* de las NPs se han llevado a cabo en ratones macho C57BL/6 adultos. Para ello, los animales se distribuyeron en 3 grupos, en primer lugar, los ratones control, en segundo lugar, los ratones a los que se le administró una solución de NPs marcadas con rodamina por vía intravenosa; y, en

tercer lugar, aquellos a los que se le administró la misma solución de NPs por vía intranasal.

Para el estudio de la biodistribución *in vivo* a través de la vía intravenosa, los ratones fueron inoculados con 200 μL de NPs (65 mg/Kg) marcadas con rodamina a través de la vena de la cola. Transcurridas 1,5 horas, fueron anestesiados por vía intramuscular con una mezcla de ketamina (0,8 mg/Kg, Imalgene 1000, Merial) y acepromazina (2 mg/Kg), CalmoNeosan, Pfizer). Se realizó una perfusión cardíaca en los ratones utilizando PBS estéril para eliminar y limpiar los órganos: cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones y bazo fueron recogidos. Los tejidos se homogeneizaron en 2 ml de PBS de forma manual y el homogenizado se filtró (70 μm) y se analizó mediante citometría de flujo (BD FACSymphony™ A3 Cell Analyzer, BD Biosciences, EE.UU).

Para el grupo de ratones a los que se le administró de forma intranasal, la formulación de NPs marcadas con rodamina se administró mediante una micropipeta un volumen de 15 μL /fosa nasal, siendo un total de 30 μL (25 mg/Kg) de NPs. Transcurridos 30 min, fueron anestesiados por vía intramuscular con una mezcla de ketamina (0,8 mg/Kg, Imalgene 1000, Merial) y acepromazina (2 mg/Kg), CalmoNeosan, Pfizer). Se realizó una perfusión cardíaca en los ratones utilizando PBS estéril para eliminar y limpiar los órganos: cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones y bazo que fueron recogidos. Los tejidos fueron procesados de la misma forma que para la administración intravenosa.

Por último, los ratones control fueron tratados de la misma forma, pero con PBS únicamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Preparación del gel termosensible

Tras la elaboración del gel, se obtiene un líquido totalmente transparente, que fue conservado a 4°C para futuros ensayos. Tras la adición de las NPs en diferentes condiciones se obtuvo el mismo gel transparente. Solamente la formulación Liof-NPs-Gel no se redispersó de forma adecuada formando grumos en suspensión a los que se le tuvo que aplicar ultrasonidos para su correcta disolución.

3.2. Ensayo gelificación *in situ*

Como han publicado Qian et al. 2014, la temperatura del cambio de estado entre sol-gel del Pluronic varía en función de la concentración del mismo. Además, la presencia de otras sustancias, como es en este caso las NPs, puede hacer que la T^a también varíe. Por ello, en el ensayo se mide la T^a de gelificación del gel base, con las concentraciones establecidas de Pluronic F-68 y F-127, y la T^a de las diferentes formulaciones con NPs. Si se obtienen temperaturas de gelificación por debajo de 28°C, probablemente podría gelificar a T^a ambiente dificultando así su manipulación y su administración. En cambio, si la gelificación se produce a T^a por encima de los 34°C, la formulación se encontrará en estado líquido en la cavidad nasal y por tanto será susceptible del aclaramiento mucociliar. Por ello, dado que la T^a nasal es de 34°C, interesa que la formulación tenga una T^a de transición sol-gel ligeramente inferior para que tras su administración gelifique rápidamente (Youssef et al., 2018). Como se muestra en la figura 32, se

obtuvieron diferentes temperaturas a las que se produjo la gelificación, por lo que, excepto la preparación Liof-NPs-Gel, que gelifica a una temperatura superior a 35°C, el resto de las preparaciones serían aptas para su administración intranasal con la deseada gelificación in situ.

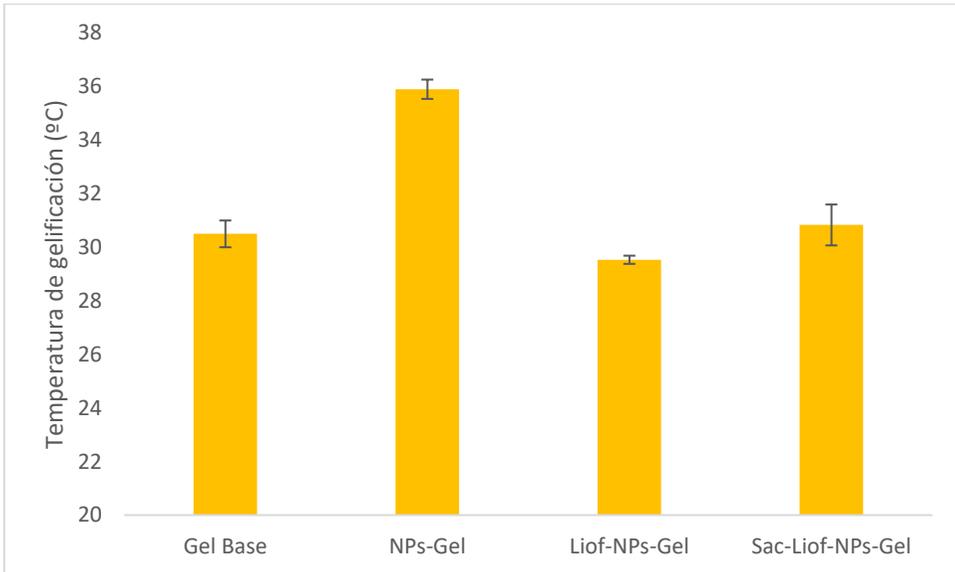


Figura 32: Temperatura de tránsito sol-gel de diferentes formulaciones.

3.3. Medición propiedades reológicas

La reología es la ciencia que se ocupa de las propiedades de deformación y flujo de las sustancias y los sistemas, ayudándonos a conocer como es y como varía la estructura interna de los sistemas. Por tanto, la viscosidad se define como la medida de la resistencia de un fluido a la deformación gradual por cizallamiento o tensión. En otras palabras, la viscosidad es una medida cuantitativa que describe la resistencia de un fluido a fluir (Kulichikhin & Malkin, 2022).

En nuestro caso, es particularmente interesante determinar las propiedades reológicas de estos compuestos con el fin de predecir como será la fluidez durante su administración y cuál será la resistencia a la fluidez que encontraremos una vez formado el gel en la cavidad nasal.

Según el esfuerzo que ejerce el cilindro para conseguir que la sustancia comience a fluir en función del tiempo, vamos a encontrar distintos tipos de fluidos viscosos.

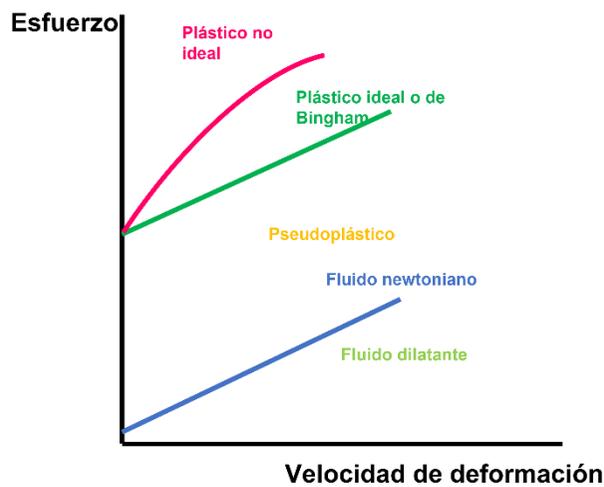


Figura 33: Reogramas de los distintos fluidos

Atendiendo a los reogramas obtenidos de las diferentes formulaciones (figura 34), vemos como tenemos dos comportamientos muy diferentes en función de si la preparación se encuentra en estado sol o gel.

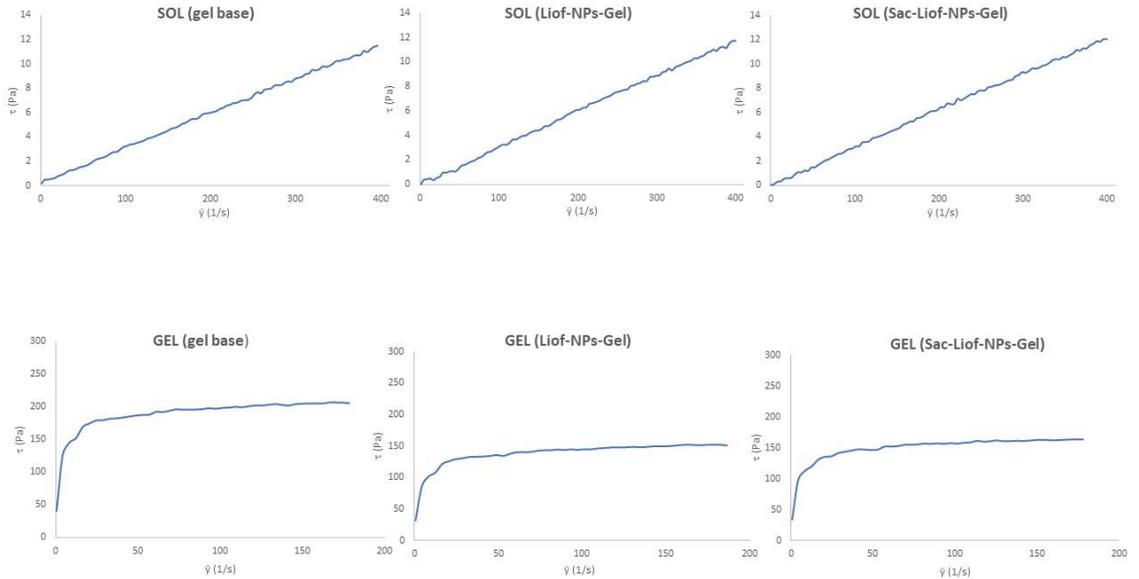


Figura 34: Representación de los reogramas obtenidos. En la parte superior las preparaciones a 18°C y en la parte inferior las preparaciones a 35°C.

Cuando las preparaciones se encuentran en estado de sol, siguen el comportamiento de un fluido newtoniano, mientras que cuando se encuentran en estado gel, siguen un comportamiento de un plástico no ideal. Respecto a los fluidos con comportamiento newtoniano, se va a regular por la ley de Newton o de fluidez. Newton observó que existe proporcionalidad directa entre la velocidad de deformación y el esfuerzo que se ejerce, esto es debido a que la viscosidad se mantiene constante. Por tanto, es independiente tanto del esfuerzo como del tiempo de aplicación del esfuerzo. La relación lineal que existe se expresa con la ecuación de Newton (Bercea, 2023).

$$\tau = \eta * \ddot{\gamma}$$

Donde “ τ ” es el esfuerzo aplicado, “ η ” la viscosidad y “ $\dot{\gamma}$ ” la velocidad de deformación. El valor inverso de la viscosidad se le conoce como fluidez (Φ).

En cambio, la mayoría de las formulaciones líquidas o semisólidas, no cumplen con la ley de Newton por tanto se llaman no newtonianos. Dentro de los no newtonianos tenemos varios comportamientos, pero considerando los resultados de nuestros reogramas (figura 34), podemos establecer que nuestros geles tienen un comportamiento plástico no ideal en el que necesitan un esfuerzo umbral para comenzar a fluir y dicho esfuerzo irá ascendiendo conforme se aumenta la velocidad de deformación hasta la curva se hace asintótica al eje de abscisas ya que por mayor que sea la velocidad, el esfuerzo no aumenta. Dicho de otra manera, no existe proporcionalidad entre el esfuerzo y la velocidad de deformación. Hay distintos modelos que nos describen este proceso, en nuestro caso, tras probar con varios ajustes, el que mejor correlación presenta es el de Herschel-Bulkley. Este modelo se caracteriza porque el esfuerzo frente a la velocidad de deformación se relaciona de una manera compleja y no lineal, pero de forma general, conforme aumenta la velocidad de deformación, disminuye la viscosidad (figura 35). Se representa con la siguiente ecuación (Eshtiaghi et al., 2013):

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$$

Donde “ τ_0 ” es el valor de esfuerzo umbral a partir del cual empieza a fluir, “ K ” es el valor de consistencia y “ n ” es el índice de flujo. Este exponente “ n ” es un índice de desviación del comportamiento newtoniano de flujo. Cuanto más difiera de 1, menor newtoniano será el

comportamiento, es decir, más rápidamente disminuirá o aumentará la viscosidad con la velocidad de deformación (Méndez-Sánchez et al., 2010; Olsson & Teitel, 2012).

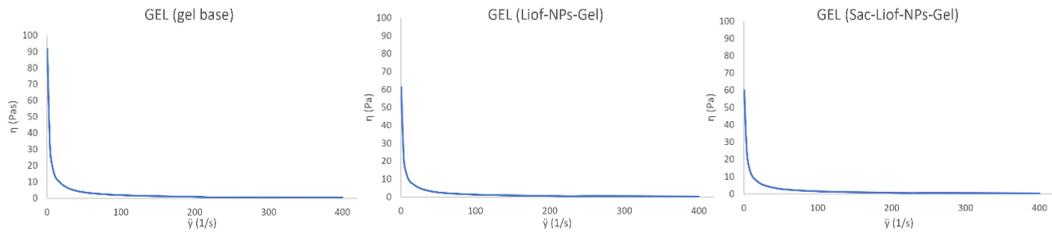


Figura 35: Curvas viscosidad de los diferentes geles

En la Tabla 5 se muestran los valores obtenidos para los modelos mencionados viendo una gran similitud entre los diferentes tipos de formulaciones dentro del mismo estado (sol o gel).

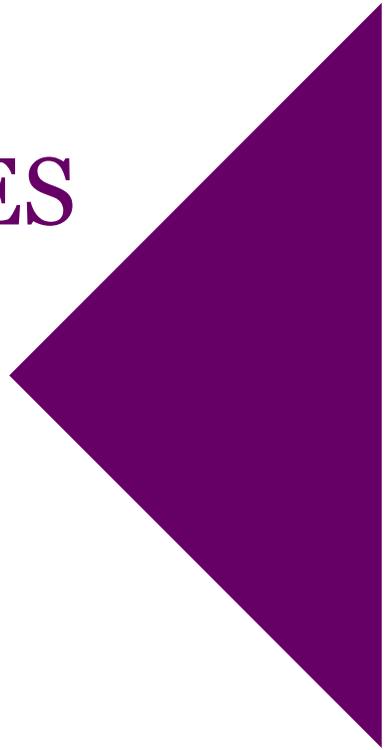
		Gel base	Liof-NPs-Gel	Sac-Liof-NPs-Gel
SOL	Viscosidad aparente			
	(η)	0,029 ± 0,001	0,030 ± 0,001	0,031 ± 0,001
	(Pa * s)			
	r	0,997 ± 0,0018	0,999 ± 0,0003	0,999 ± 0,0001
		Gel base	Liof-NPs-Gel	Sac-Liof-NPs-Gel
GEL	Esfuerzo de cizallamiento (τ_0)	-2721 ± 160	-2057 ± 46	-2470 ± 428
	(Pa)			
	Consistencia (K)	2813 ± 157	2122 ± 42	2307 ± 217
	Índice de flujo (n)	0,007 ± 0,0026	0,007 ± 0,0026	0,007 ± 0,0005
	r	0,96 ± 0,03	0,96 ± 0,03	0,96 ± 0,02

Tabla 5. Parámetros proporcionados por el software según el modelo de ajuste

3.4. Biodistribución

Por último, se realizó un ensayo de biodistribución en animales. Aunque los resultados obtenidos no nos permiten extraer conclusiones fiables acerca de la biodistribución real en los tejidos, así como las diferencias obtenidas según el método de administración de las NPs. Se trata de un estudio preliminar en el que se observó fluorescencia en todos los tejidos, incluido el cerebro. Creemos que se debe al método de homogenización. En nuestro caso fue de forma manual, no siendo adecuado para una completa digestión del tejido. Por ello, el futuro de nuestra investigación, y a lo que voy a dedicar los meses de mi contrato puente es a optimizar este ensayo, cambiando en primer lugar el método de homogenización para el cual utilizaremos el homogenizador Precellys®. De este modo, se pretende obtener una completa digestión del tejido pudiendo medir su totalidad en el citómetro y así saber la fluorescencia completa del mismo. Además, se observará a través de microscopía confocal diferentes secciones del parénquima cerebral con el fin de establecer la distribución de las NPs en dicho tejido.

CONCLUSIONES



El objetivo del trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral ha sido el diseño y desarrollo de nuevas opciones en la terapéutica de enfermedades del Sistema Nervioso Central basadas en la nanotecnología. De este modo, se persigue el diseño de unos nanotransportadores que sean capaces de proteger la sustancia activa, al mismo tiempo que consigan atravesar la barrera hematoencefálica y que, una vez en el parénquima cerebral, sean capaces de liberar el principio activo que albergan. Fruto del trabajo realizado han sido publicados tres artículos JCR, en los cuales se abordan los objetivos planteados en esta Tesis, quedando aún pendiente de publicación un cuarto artículo en el que se recogen conclusiones parciales imprescindibles para el avance de esta investigación. Además, este trabajo ha podido contribuir a 23 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, dos capítulos de libros. Teniendo en cuenta todo lo anterior, cabe resaltar las siguientes conclusiones:

Relativas a la nanotecnología

1. Desde su aparición, la nanotecnología ha sido un campo en el que se ha escalado de forma exponencial hasta llegar a ser, a día de hoy, uno de los principales campos de investigación a nivel mundial debido a las diversas aplicaciones en las que encuentra cabida.
2. Dentro de la nanomedicina, ya es una realidad el uso de nanotransportadores de fármacos para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos, siendo aprobados cada vez más, medicamentos basados en esta nanotecnología.

3. La gran variedad de nanoestructuras con aplicación biomédica llega a ser desconocido por la diversidad de materiales utilizados, su combinación y las diferentes técnicas de producción.

Relativas al proceso de obtención de NPs

4. Se han conseguido preparar nanopartículas mesoporosas de sílice de forma satisfactoria y, además, presentan una alta reproducibilidad y un alto rendimiento en su obtención.
5. Las nanopartículas mesoporosas de sílice han conseguido albergar en los poros un fármaco no hidrosoluble, el ibuprofeno, con una alta eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga.
6. Se han conseguido preparar nanopartículas lipídicas sólidas utilizando el método de emulsión-fusión en caliente, con propiedades adecuadas a su administración parenteral.
7. Estas SLNP se han modificado realizando modificaciones en el recubrimiento para conseguir una solubilidad y carga superficial adecuada a los fines propuestos.
8. Las NPs diseñadas han conseguido presentar una alta reproducibilidad y características fisicoquímicas como tamaño, índice de polidispersión, propiedades eléctricas y estabilidad coloidal adecuadas para su administración nasal y parenteral.
9. Las NPs diseñadas son capaces de albergar dopamina en concentraciones satisfactorias, para luego ir liberándola de forma progresiva.
10. La liofilización de las NPs obtenidas utilizando como crioprotector la sacarosa al 1% las preserva de alteraciones en el

tamaño durante las condiciones extremas a las que se someten durante el proceso.

Relativas a su capacidad para atravesar la BHE

11. Los estudios de toxicidad realizados a todos los SLNP demuestran su biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad, independientemente del método utilizado.
12. Mediante el diseño de un modelo de BHE *in vitro* en monocultivo con células endoteliales cerebrales murinas, se ha visto como las NPs en solución son capaces de atravesar la barrera formada, estando disponibles en el lado basolateral que simula el tejido nervioso.
13. Tras una administración parenteral de la solución de NPs se ha visto por microscopía confocal como se hacen disponibles en el parénquima cerebral tras su administración *in vivo* en modelos murinos, viendo por tanto como por sí mismas son capaces de atravesar la BHE también en modelos *in vivo*.

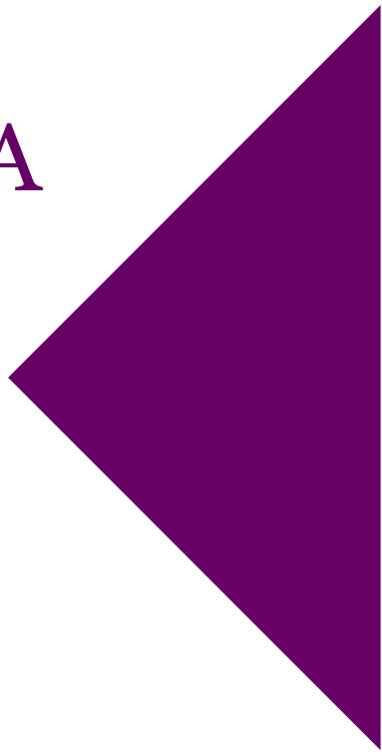
Relativas a su administración nasal

14. Se ha conseguido diseñar una preparación sol-gel dependiente de la temperatura para que se administre en forma de líquido y que una vez llegue a la cavidad nasal solidifique en forma de gel para aumentar el tiempo de permanencia en la cavidad nasal.
15. Los ensayos de biodistribución realizados por la cavidad nasal son todavía muy preliminares siendo necesario tanto la mejora de la técnica como su réplica en un mayor número de animales.

CONCLUSIÓN FINAL

Consideramos que todo el trabajo motivo de esta Tesis Doctoral nos permite poder afirmar que se pueden conseguir NPs cargadas con dopamina que podrían ser eficaces en el tratamiento del Parkinson al conseguir llegar al SNC y liberar allí el fármaco una vez administradas por la vía nasal. No obstante, será necesario realizar más estudios que corroboren todos estos datos, incluido un modelo de Parkinson para comprobar los efectos en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA



- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P., & Ko, S. (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>
- Agrawal, Y., & Patel, V. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), 81. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
- Ahmed, O., & Jabeen, M. (2020). A Review Article on Novel Drugs Used in Parkinson's Disease. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 6(5), 69–78. www.wjpls.org
- Akel, H., Ismail, R., & Csóka, I. (2020). Progress and perspectives of brain-targeting lipid-based nanosystems via the nasal route in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 148(October 2019), 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.014>
- Alberto, M., Paiva-Santos, A. C., Veiga, F., & Pires, P. C. (2022). Lipid and Polymeric Nanoparticles: Successful Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery in the Treatment of Depression and Anxiety Disorders. *Pharmaceutics*, 14(12), 2742. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122742>
- Alemán, J., Chadwick, A. V., He, J., Hess, M., Horie, K., Jones, R. G., Kratochvíl, P., Meisel, I., Mita, I., Moad, G., Penczek, S., & Stepto,

- R. F. T. (2007). Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry*, 79(10), 1801–1829. <https://doi.org/10.1351/pac200779101801>
- Alyautdin, R., Khalin, I., Nafeeza, M. I., Haron, M. H., & Kuznetsov, D. (2014). Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 795–811. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52236>
- Andhale, R., & Shrivastava, D. (2022). Huntington's Disease: A Clinical Review. *Cureus*, 14(8), e28484. <https://doi.org/10.7759/cureus.28484>
- Araujo Lopes, S. C. de, Santos Giuberti, C. dos, Ribeiro, T. G., Santos Ferreira, D. dos, Amaral Leite, E., & Cristina, M. (2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In L. Rangel (Ed.), *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55290>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*, 323(6), 548. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Arthur, F. E., Shivers, R. R., & Bowman, P. D. (1987). Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Research*, 433(1), 155–159. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90075-7)
- Athar, M., & Das, A. J. (2014). Therapeutic nanoparticles: State-of-the-art of nanomedicine. *Advanced Materials Reviews*, 1(1), 25–37. <https://doi.org/10.5185/amr.2014.1003>
- Badanjak, K., Fixemer, S., Smajić, S., Skupin, A., & Grünewald, A. (2021a). The contribution of microglia to neuroinflammation in

- parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094676>
- Badanjak, K., Fixemer, S., Smajić, S., Skupin, A., & Grünewald, A. (2021b). The contribution of microglia to neuroinflammation in parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094676>
- Bagchi, S., Chhibber, T., Lahooti, B., Verma, A., Borse, V., & Jayant, R. D. (2019). In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies : an overview. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 3591–3605. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S218708>
- Baimanov, D., Cai, R., & Chen, C. (2019). Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle-Protein Interactions. *Bioconjugate Chemistry*, 30(7), 1923–1937. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00348>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, 27(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6)
- Banik, B. L., Fattahi, P., & Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *WIREs Nanomedicine and*

- Nanobiotechnology*, 8(2), 271–299.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1364>
- Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., Cook, D. G., & Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 223. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1>
- Barnabas, W. (2019). Drug targeting strategies into the brain for treating neurological diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 311(October 2018), 133–146.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.10.015>
- Battaglia, L., Panciani, P. P., Muntoni, E., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., De Bonis, P., Mioletti, S., Fontanella, M., & Swaminathan, S. (2018). Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(4), 369–378.
<https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1429401>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.
<https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Begley, D. J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*, 104(1), 29–45.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.08.001>

- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Préat, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(1), 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
- Bercea, M. (2023). Rheology as a Tool for Fine-Tuning the Properties of Printable Bioinspired Gels. *Molecules*, *28*(6), 2766. <https://doi.org/10.3390/molecules28062766>
- Betsholtz, C., & Keller, A. (2014). PDGF, pericytes and the pathogenesis of idiopathic basal ganglia calcification (IBGC). *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *24*(4), 387–395. <https://doi.org/10.1111/bpa.12158>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhowmik, A., Khan, R., & Ghosh, M. K. (2015). Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International*, *2015*, 320941. <https://doi.org/10.1155/2015/320941>
- Bickel, W. K., & Marsch, L. A. (2001). Toward a behavioral economic understanding of drug dependence: delay discounting processes. *Addiction (Abingdon, England)*, *96*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2001.961736.x>
- Blandini, F., & Armentero, M.-T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS Journal*, *279*(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, *397*(10291), 2284–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)

- Borm, P. J. A., & Müller-Schulte, D. (2006). Nanoparticles in drug delivery and environmental exposure: same size, same risks? *Nanomedicine (London, England)*, *1*(2), 235–249. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.2.235>
- Bouloudenine, M., & Bououdina, M. (2016). Toxic Effects of Engineered Nanoparticles on Living Cells. In *Emerging Research on Bioinspired Materials* (pp. 35–68). <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9811-6.ch002>
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *211*, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Caldonazo, A., Almeida, S. L., Bonetti, A. F., Lazo, R. E. L., Mengarda, M., & Murakami, F. S. (2021). Pharmaceutical applications of starch nanoparticles: A scoping review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 697–704. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.061>
- Casettari, L., & Illum, L. (2014). Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *190*, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.003>
- Cayero-Otero, M. D., Gomes, M. J., Martins, C., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M., Sarmiento, B., & Martín-Banderas, L. (2019). In vivo biodistribution of venlafaxine-PLGA nanoparticles for brain delivery: plain vs. functionalized nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *16*(12), 1413–1427. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1690452>
- Cebrián, C., & Sulzer, D. (2017). Neuroinflammation as a Potential Mechanism Underlying Parkinsons Disease. In *Parkinson's*

- Disease: Molecular Mechanisms Underlying Pathology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803783-6.00008-0>
- Ceruti, S., Colombo, L., Magni, G., Viganò, F., Boccazzi, M., Deli, M. A., Sperlágh, B., Abbracchio, M. P., & Kittel, A. (2011). Oxygen-glucose deprivation increases the enzymatic activity and the microvesicle-mediated release of ectonucleotidases in the cells composing the blood-brain barrier. *Neurochemistry International*, *59*(2), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.013>
- Chauhan, A. (2018). Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules*, *23*(4), 938. <https://doi.org/10.3390/molecules23040938>
- Chaurasia, S., & Dogra, S. S. (2017). TRANSFERSOMES: NOVEL APPROACH FOR INTRANASAL DELIVERY. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH*, *3*(4), 192–203.
- Chen, Y., & Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(7), 640–665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *23*(2), 137–149. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C>
- Chengcheng, F., Xiayan, S., Chi, Z., Qingfeng, L., Jie, C., Yehong, S., Qizhi, Z., & Xinguo, J. (2011). Effect of absorption enhancers on nasal delivery of basic fibroblast growth factor. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *5*.
- Chia, S. J., Tan, E.-K., & Chao, Y.-X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2464. <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>

- Chopra, D., Gulati, M., Saluja, V., Pathak, P., & Bansal, P. (2008). Brain permeable nanoparticles. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3(3), 216–225. <https://doi.org/10.2174/157488908786242461>
- Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*, 34(12), 2067–2077. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y>
- Costa, C. P., Barreiro, S., Moreira, J. N., Silva, R., Almeida, H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2021a). In Vitro Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Pharmaceuticals*, 14(8), 711. <https://doi.org/10.3390/ph14080711>
- Costa, C. P., Barreiro, S., Moreira, J. N., Silva, R., Almeida, H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2021b). In Vitro Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Pharmaceuticals*, 14(8), 711. <https://doi.org/10.3390/ph14080711>
- Costa, C. P., Barreiro, S., Moreira, J. N., Silva, R., Almeida, H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2021c). In Vitro Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Pharmaceuticals*, 14(8), 711. <https://doi.org/10.3390/ph14080711>
- Costa, C. P., Moreira, J. N., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2021). Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(4), 925–940. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.012>
- Croissant, J. G., Fatieiev, Y., & Khashab, N. M. (2017). Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed

- Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials*, 29(9). <https://doi.org/10.1002/adma.201604634>
- Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195(December 2017), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025>
- Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Cunha, S., Amaral, M. H., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2017). Lipid nanoparticles for nasal/intranasal drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 34(3), 257–282. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2017018693>
- Curtis, C., Toghiani, D., Wong, B., & Nance, E. (2018). Colloidal stability as a determinant of nanoparticle behavior in the brain. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 170, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.050>
- Dai, Z. R., Bradley, J. P., Joswiak, D. J., Brownlee, D. E., Hill, H. G. M., & Genge, M. J. (2002). Possible in situ formation of meteoritic nanodiamonds in the early Solar System. *Nature*, 418(6894), 157–159. <https://doi.org/10.1038/nature00897>
- Daneman, R., & Rescigno, M. (2009). The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different? *Immunity*, 31(5), 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.012>
- Dante, S., Petrelli, A., Petrini, E. M., Marotta, R., Maccione, A., Alabastri, A., Quarta, A., De Donato, F., Ravasenga, T., Sathya, A., Cingolani, R., Proietti Zaccaria, R., Berdondini, L., Barberis, A., & Pellegrino, T. (2017). Selective Targeting of Neurons with

- Inorganic Nanoparticles: Revealing the Crucial Role of Nanoparticle Surface Charge. *ACS Nano*, 11(7), 6630–6640. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00397>
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- Davis, S. S. (2001). Nasal vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51(1), 21–42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00162-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00162-4)
- de Boer, A. G., & Gaillard, P. J. (2007). Drug targeting to the brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105237>
- Dermietzel, R., & Krause, D. (1991). Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *International Review of Cytology*, 127, 57–109. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60692-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60692-0)
- Deuschl, G., Antonini, A., Costa, J., Śmiłowska, K., Berg, D., Corvol, J.-C., Fabbrini, G., Ferreira, J., Foltynie, T., Mir, P., Schrag, A., Seppi, K., Taba, P., Ruzicka, E., Selikhova, M., Henschke, N., Villanueva, G., & Moro, E. (2022). European Academy of Neurology/Movement Disorder Society-European Section Guideline on the Treatment of Parkinson's Disease: I. Invasive Therapies. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 37(7), 1360–1374. <https://doi.org/10.1002/mds.29066>
- Dhakar, R. C., Maurya, S. D., Tilak, V. K., & Gupta, A. K. (2011). A review on factors affecting the design of nasal drug delivery system. *International Journal of Drug Delivery*, 3(October), 194–208. <https://doi.org/10.5138/ijdd.v3i2.214>

- Dhuria, S. V, Hanson, L. R., & Frey, W. H. 2nd. (2009). Novel vasoconstrictor formulation to enhance intranasal targeting of neuropeptide therapeutics to the central nervous system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(1), 312–320. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145565>
- Dhuria, S. V, Hanson, L. R., & Frey, W. H. 2nd. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(4), 1654–1673. <https://doi.org/10.1002/jps.21924>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- El-Say, K. M., & El-Sawy, H. S. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1–2), 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>
- Eshtiaghi, N., Markis, F., Yap, S. D., Baudez, J.-C., & Slatter, P. (2013). Rheological characterisation of municipal sludge: A review. *Water Research*, 47(15), 5493–5510. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.001>
- Fan, H.-X., Sheng, S., & Zhang, F. (2022). New hope for Parkinson's disease treatment: Targeting gut microbiota. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 28(11), 1675–1688. <https://doi.org/10.1111/cns.13916>
- Fan, J., Cheng, Y., & Sun, M. (2020). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *Chemical Record*, 20(12), 1474–1504. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000087>

- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 192, p. 113642). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
- Fang, L., Zhou, H., Cheng, L., Wang, Y., Liu, F., & Wang, S. (2023). The application of mesoporous silica nanoparticles as a drug delivery vehicle in oral disease treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1124411>
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)*, 400(10360), 1363–1380. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01272-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01272-7)
- Fortuna, A., Alves, G., Serralheiro, A., Sousa, J., & Falcão, A. (2014). Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 88(1), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.004>
- Fu, X., Cai, J., Zhang, X., Li, W. Di, Ge, H., & Hu, Y. (2018). Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.006>
- Gabal, Y. M., Kamel, A. O., Sammour, O. A., & Elshafeey, A. H. (2014). Effect of surface charge on the brain delivery of nanostructured lipid carriers in situ gels via the nasal route. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1–2), 442–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.025>

- Garcés, M. (2016). ESTUDIO SOBRE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS EN ESPAÑA Y SU IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL. *Informe Neuroalianza*, 175.
- García-García, G., Fernández-Álvarez, F., Cabeza, L., Delgado, Á. V., Melguizo, C., Prados, J. C., & Arias, J. L. (2020). Gemcitabine-Loaded Magnetically Responsive Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles against Breast Cancer. *Polymers*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/polym12122790>
- Goldberg, M. S., Fleming, S. M., Palacino, J. J., Cepeda, C., Lam, H. A., Bhatnagar, A., Meloni, E. G., Wu, N., Ackerson, L. C., Klapstein, G. J., Gajendiran, M., Roth, B. L., Chesselet, M.-F., Maidment, N. T., Levine, M. S., & Shen, J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43628–43635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308947200>
- Gommes, C. J. (2019). Ostwald ripening of confined nanoparticles: Chemomechanical coupling in nanopores. *Nanoscale*, 11(15), 7386–7393. <https://doi.org/10.1039/c9nr01349k>
- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 601, 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>
- Halwani, A. A. (2022). Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. *Pharmaceutics*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010106>
- Han, L., & Jiang, C. (2021). Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(8), 2306–2325. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.023>

- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, *57*(2), 173–185. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V., Stebbins, M. J., Vandenhoute, E., Weksler, B., & Brodin, B. (2015). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *36*(5), 862–890. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, *11*(6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>
- Hulisz, D. (2018). Amyotrophic lateral sclerosis: disease state overview. *The American Journal of Managed Care*, *24*(15 Suppl), S320–S326.
- Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S., & Shahab, M. (2018). Neurodegenerative Diseases: Regenerative Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Brain Sciences*, *8*(9), 177. <https://doi.org/10.3390/brainsci8090177>
- Jadhav, K., Gambhire, M., Shaikh, I. M., Kadam, V., & Pisal, S. (2007). Nasal Drug Delivery System-Factors Affecting and Applications. *Current Drug Therapy*, *2*, 27–38. <https://doi.org/10.2174/157488507779422374>
- Jagaran, K., & Singh, M. (2022). Lipid Nanoparticles: Promising Treatment Approach for Parkinson's Disease. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9361.
<https://doi.org/10.3390/ijms23169361>
- Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 524–539.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), 795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
- Jenjob, R., Phakkeeree, T., Seidi, F., Theerasilp, M., & Crespy, D. (2019). Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1–13.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>
- Jiao, J., & Zhang, L. (2019). Influence of Intranasal Drugs on Human Nasal Mucociliary Clearance and Ciliary Beat Frequency. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 11(3), 306.
<https://doi.org/10.4168/aaair.2019.11.3.306>
- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., & Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(7), a024240.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024240>
- Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G., & Kim, J. H. (2015). Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7), 1603–1611.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>

- Jost, W. H., & Reichmann, H. (2017). "An essay on the shaking palsy" 200 years old. *Journal of Neural Transmission*, 124(8), 899–900. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1684-0>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Principles of neural science. In *McGraw-Hill Health Professions Division*. (4th ed). McGraw-Hill, Health Professions Division. <https://doi.org/LK-https://worldcat.org/title/42073108>
- Kaneko, K., Osman, N., Carini, V., Scagnetti, G., & Saleem, I. (2020). Overview of the Advantages and Disadvantages of Different Mucosal Sites for the Delivery of Nanoparticles. In P. Muttill & N. K. Kunda (Eds.), *Mucosal Delivery of Drugs and Biologics in Nanoparticles* (pp. 61–82). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35910-2_3
- Kataria, I., & Shende, P. (2022). Nose-to-brain lipid nanocarriers: An active transportation across BBB in migraine management. *Chemistry and Physics of Lipids*, 243(February), 105177. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105177>
- Kaur, K., Gill, J. S., Bansal, P. K., & Deshmukh, R. (2017). Journal of the Neurological Sciences Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson ' s disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 381(July), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3251>
- Khan, A. R., Liu, M., Khan, M. W., & Zhai, G. (2017). Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of Controlled Release*, 268(May), 364–389. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.001>
- Khosa, A., Reddi, S., & Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*,

- 103(February), 598–613.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>
- Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2010). Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2434–2443.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273>
- Kobiler, D., Lustig, S., Gozes, Y., Ben-Nathan, D., & Akov, Y. (1989). Sodium dodecylsulphate induces a breach in the blood-brain barrier and enables a West Nile virus variant to penetrate into mouse brain. *Brain Research*, 496(1–2), 314–316.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91079-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91079-2)
- Koo, H., Huh, M. S., Sun, I.-C., Yuk, S. H., Choi, K., Kim, K., & Kwon, I. C. (2011). In Vivo Targeted Delivery of Nanoparticles for Theranosis. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1018–1028.
<https://doi.org/10.1021/ar2000138>
- KREUTER, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.021>
- Kreuter, J. (2014). Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>
- Kulichikhin, V. G., & Malkin, A. Ya. (2022). The Role of Structure in Polymer Rheology: Review. *Polymers*, 14(6), 1262.
<https://doi.org/10.3390/polym14061262>
- Kumar, R., Singh, A., Garg, N., & Siril, P. F. (2018). Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40(January 2017), 686–696.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.08.018>

- Kyeong, S., Kim, J., Chang, H., Lee, S. H., Son, B. S., Lee, J. H., Rho, W.-Y., Pham, X.-H., & Jun, B.-H. (2021). Magnetic Nanoparticles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1309, 191–215. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6158-4_8
- Laffleur, F., & Bauer, B. (2021). Progress in nasal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 120994. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120994>
- Lane, N. J., Reese, T. S., & Kachar, B. (1992). Structural domains of the tight junctional intramembrane fibrils. *Tissue & Cell*, 24(2), 291–300. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90102-d](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90102-d)
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrad, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Letchford, K., Liggins, R., Wasan, K. M., & Burt, H. (2009). In vitro human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly (ethylene glycol) -block-poly (caprolactone) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.003>
- Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 640–653. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>
- Li, S., Ji, Z., Zou, M., Nie, X., Shi, Y., & Cheng, G. (2011). Preparation , Characterization , Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Tetrandrine. *AAPS PharmSciTech*, 12(3), 2–9. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9665-3>

- Li, W., & Szoka, F. C. J. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(3), 438–449. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9180-5>
- Li, X., Montague, E. C., Pollinzi, A., Lofts, A., & Hoare, T. (2022). Design of Smart Size-, Surface-, and Shape-Switching Nanoparticles to Improve Therapeutic Efficacy. *Small*, 18(6), 1–29. <https://doi.org/10.1002/smll.202104632>
- Li, X., Tsibouklis, J., Weng, T., Zhang, B., Yin, G., Feng, G., Cui, Y., Savina, I. N., Mikhalovska, L. I., Sandeman, S. R., Howel, C. A., & Mikhalovsky, S. V. (2017). Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, 25(1), 17–28. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1184272>
- Lien, C.-F., Molnár, E., Toman, P., Tsibouklis, J., Pilkington, G. J., Górecki, D. C., & Barbu, E. (2012). In vitro assessment of alkylglyceryl-functionalized chitosan nanoparticles as permeating vectors for the blood-brain barrier. *Biomacromolecules*, 13(4), 1067–1073. <https://doi.org/10.1021/bm201790s>
- Liu, Q., & Zhang, Q. (2018). Nanoparticle systems for nose-to-brain delivery. In *Brain Targeted Drug Delivery System*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814001-7.00010-x>
- Liu, T.-W., Chen, C.-M., & Chang, K.-H. (2022). Biomarker of Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4148. <https://doi.org/10.3390/ijms23084148>
- Llinàs, M. C., & Sánchez-garcía, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad LXXI*, 565, 20–31.

- Loch-Neckel, G., & Koeppe, J. (2010). [The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system]. *Revista de neurologia*, 51(3), 165–174.
- Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J., & Allen, D. D. (2004). Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of Drug Targeting*, 12(9–10), 635–641. <https://doi.org/10.1080/10611860400015936>
- Lofts, A., Abu-Hijleh, F., Rigg, N., Mishra, R. K., & Hoare, T. (2022). Using the Intranasal Route to Administer Drugs to Treat Neurological and Psychiatric Illnesses: Rationale, Successes, and Future Needs. *CNS Drugs*, 36(7), 739–770. <https://doi.org/10.1007/s40263-022-00930-4>
- Long, Y., Yang, Q., Xiang, Y., Zhang, Y., Wan, J., Liu, S., Li, N., & Peng, W. (2020). Nose to brain drug delivery - A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacological Research*, 159, 104795. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104795>
- Lucignani, G. (2009). Nanoparticles for concurrent multimodality imaging and therapy: The dawn of new theragnostic synergies. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(5), 869–874. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1104-2>
- Maher, R., Moreno-Borrallo, A., Jindal, D., Mai, B. T., Ruiz-Hernandez, E., & Harkin, A. (2023). Intranasal Polymeric and Lipid-Based Nanocarriers for CNS Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 15(3), 746. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030746>
- Maleki, A., Kettiger, H., Schoubben, A., Rosenholm, J. M., Ambrogi, V., & Hamidi, M. (2017). Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-

- soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 262(June), 329–347.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.047>
- Mallakpour, S., Azadi, E., & Hussain, C. M. (2021). The latest strategies in the fight against the COVID-19 pandemic: The role of metal and metal oxide nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 45(14), 6167–6179. <https://doi.org/10.1039/d1nj00047k>
- Mao, Q., Qin, W. zhi, Zhang, A., & Ye, N. (2020). Recent advances in dopaminergic strategies for the treatment of Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 471–482.
<https://doi.org/10.1038/s41401-020-0365-y>
- Márquez, E., David, D., Moreno, H., Prado, M., Santiyán, M., Soler Rodríguez, F., Pérez, M., & Índice, L. (2021). *Las Nanopartículas Y Sus Aplicaciones Biomédicas*.
- Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 27(10), 1918–1929. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- Matea, C. T., Mocan, T., Tabaran, F., Pop, T., Mosteanu, O., Puia, C., Iancu, C., & Mocan, L. (2017). Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5421–5431.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S138624>
- Mato, Y. L. (2019). Nasal route for vaccine and drug delivery : Features and current opportunities. *International Journal of Pharmaceutics*, 572(August), 118813.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118813>
- Mccolgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 25(1), 24–34.
<https://doi.org/10.1111/ene.13413>

- McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H., & Rae-Grant, A. D. (2021). Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 325(8), 765–779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
- Méndez-Sánchez, A., Pérez-Trejo, L., & Paniagua-Mercado, A. (2010). Determinación de la viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos (una revisión del viscosímetro de Couette). *Latin-American Journal of Physics Education*, 4.
- Mendoza-Muñoz, N., Quintanar-Guerrero, D., & Allémann, E. (2012). The impact of the salting-out technique on the preparation of colloidal particulate systems for pharmaceutical applications. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 6(3), 236–249. <https://doi.org/10.2174/187221112802652688>
- Ministerio de Sanidad, C. y B. Social. (2022). *Número de casos de enfermedad de Parkinson registrados en España de 2011 a 2020*. In *Statista*. <https://es.statista.com/estadisticas/1037915/numero-de-casos-de-parkinsonismo-en-espana/>
- Mirzaei, H., Sedighi, S., Kouchaki, E., Barati, E., Dadgostar, E., Aschner, M., & Tamtaji, O. R. (2022). Probiotics and the Treatment of Parkinson's Disease: An Update. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(8), 2449–2457. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01128-w>
- Mistry, A., Stolnik, S., & Illum, L. (2009). Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(1), 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.019>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for

- drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Montes-García, V., Squillaci, M. A., Diez-Castellnou, M., Ong, Q. K., Stellacci, F., & Samorì, P. (2021). Chemical sensing with Au and Ag nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 50(2), 1269–1304.
<https://doi.org/10.1039/docs01112f>
- Moritz, M., & Geszke-Moritz, M. (2015). Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: principles and applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 49, 114–151.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.079>
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2021). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimonon, T., Kittel, A., Tanaka, K., & Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*, 54(3–4), 253–263.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002>
- National Nanotechnology Initiative (NNI)*. (n.d.). www.nano.gov
- Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Nita, L. E., & Chiriac, A. P. (2017). Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. In *Drug Delivery* (Vol. 24, Issue 1, pp. 539–557). <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>
- Nedosekin, D. A., Foster, S., Nima, Z. A., Biris, A. S., Galanzha, E. I., & Zharov, V. P. (2015). Photothermal confocal multicolor microscopy of nanoparticles and nanodrugs in live cells. *Drug Metabolism*

- Reviews*, 47(3), 346–355.
<https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1058818>
- Neuhaus, J., Risau, W., & Wolburg, H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 633, 578–580.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb15667.x>
- Olsson, P., & Teitel, S. (2012). Herschel-Bulkley Shearing Rheology Near the Athermal Jamming Transition. *Physical Review Letters*, 109(10). <https://doi.org/10.1103/physrevlett.109.108001>
- Ortega, E., Ruiz, M. A., Peralta, S., Russo, G., & Morales, M. E. (2020). Improvement of mesoporous silica nanoparticles: A new approach in the administration of NSAIDS. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58(June), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101833>
- Ostrowski, A., Nordmeyer, D., Boreham, A., Holzhausen, C., Mundhenk, L., Graf, C., Meinke, M. C., Vogt, A., Hadam, S., Lademann, J., Rühl, E., Alexiev, U., & Gruber, A. D. (2015). Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 263–280.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.6.25>
- Pajares, M., I. Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 9(7), 1687.
<https://doi.org/10.3390/cells9071687>
- Pallares, R. M., Mottaghy, F. M., Schulz, V., Kiessling, F., & Lammers, T. (2022). Nanoparticle Diagnostics and Theranostics in the Clinic.

-
- Journal of Nuclear Medicine*, 63(12), 1802–1808.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.122.263895>
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), 1959–1972.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>
- Pardridge, W. M. (2015). Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(8), 1059–1072. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1042364>
- Pascual Garvi, J. M., González Llanos, F., Prieto Arribas, R., Cerdán, S., & Roda, J. M. (2004). [Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system]. *Revista de neurologia*, 38(6), 565–581.
- Pascual, J. M., González-Llanos, F., Prieto, R., Cerdán, S., & Roda, J. M. (2004). *La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central*.
- Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., Malaplate, C., Yen, F. T., & Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13954.
<https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- Patel, B; and Malaty, I. (2022). Parkinson Disease Treatment Advances. *Practical Neurology*, September.
<https://practicalneurology.com/articles/2022-sept/parkinson-disease-treatment-advances>

- Patel, J. P., & Frey, B. N. (2015). Disruption in the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder? *Neural Plasticity*, 2015, 708306. <https://doi.org/10.1155/2015/708306>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Pramanik, A., Gao, Y., Patibandla, S., Mitra, D., McCandless, M. G., Fassero, L. A., Gates, K., Tandon, R., & Chandra Ray, P. (2021). The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles. *Nanoscale Advances*, 3(6), 1588–1596. <https://doi.org/10.1039/d0na01007c>
- Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah, J. A., & Sudesh, K. (2022). Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/nano12030576>
- Qian, S., Wong, Y. C., & Zuo, Z. (2014). Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine. *International Journal of Pharmaceutics*, 468(1–2), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.015>
- Rambaran, T. F. (2020). Nanopolyphenols: a review of their encapsulation and anti-diabetic effects. *SN Applied Sciences*, 2(8), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3110-8>
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>

- Rawal, M., Singh, A., & Amiji, M. M. (2019). Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharmaceutical Research*, 36(11), 153. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2692-6>
- Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jaklenec, A., Langer, R., & Blankschtein, D. (2016). mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery*, 7(5), 319–334. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., & Artico, M. (2006). Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anatomical Record. Part B, New Anatomist*, 289(1), 3–8. <https://doi.org/10.1002/ar.b.20087>
- Rip, J., Schenk, G. J., & de Boer, A. G. (2009). Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(3), 227–237. <https://doi.org/10.1517/17425240902806383>
- Risau, W., & Wolburg, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 13(5), 174–178. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90043-a](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90043-a)
- Rode, A., Sharma, S., & Mishra, D. K. (2018). Carbon Nanotubes: Classification, Method of Preparation and Pharmaceutical Application. *Current Drug Delivery*, 15(5), 620–629. <https://doi.org/10.2174/1567201815666171221124711>
- Sabjan, K. B., Munawar, S. M., Rajendiran, D., Vinoji, S. K., & Kasinathan, K. (2019). Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review. *Current Drug Research Reviews*, 12(1), 4–15. <https://doi.org/10.2174/2589977511666191024173508>
- Saeedi, T., Alotaibi, H. F., & Prokopovich, P. (2020). Polymer colloids as drug delivery systems for the treatment of arthritis. In *Advances in*

- Colloid and Interface Science* (Vol. 285, p. 102273). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102273>
- Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological Research*, 17–24.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>
- Sanna, V., Roggio, A. M., Siliani, S., Piccinini, M., Marceddu, S., Mariani, A., & Sechi, M. (2012). Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5501–5516. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36684>
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 235, 34–47.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Satapathy, M. K., Yen, T. L., Jan, J. S., Tang, R. D., Wang, J. Y., Taliyan, R., & Yang, C. H. (2021). Solid lipid nanoparticles (SLNs): An advanced drug delivery system targeting brain through bbb. *Pharmaceutics*, 13(8), 1–36.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081183>
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9, 385.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>
- Savitt, D., & Jankovic, J. (2019). Targeting α -Synuclein in Parkinson's Disease: Progress Towards the Development of Disease-Modifying

- Therapeutics. *Drugs*, 79(8), 797–810.
<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01104-1>
- Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. (2022a). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303(December 2021).
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>
- Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. (2022b). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303(December 2021).
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>
- Shah, S., Rangaraj, N., Singh, S. B., & Srivastava, S. (2021). Exploring the unexplored avenues of surface charge in nano-medicine. *Colloids and Interface Science Communications*, 42(April), 100406. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100406>
- Sharma, A., Garg, T., Aman, A., Panchal, K., Sharma, R., Kumar, S., & Markandeywar, T. (2016). Nanogel—an advanced drug delivery tool: Current and future. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 165–177.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2014.930745>
- Shen, F., Zhang, Q., Xu, Y., Wang, X., Xia, J., Chen, C., Liu, H., & Zhang, Y. (2022). Effect of Intranasal Dexmedetomidine or Midazolam for Premedication on the Occurrence of Respiratory Adverse Events in Children Undergoing Tonsillectomy and Adenoidectomy. *JAMA Network Open*, 5(8), e2225473.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.25473>
- Shivananjegowda, M. G., Hani, U., Osmani, R. A. M., Alamri, A. H., Ghazwani, M., Alhamhoom, Y., Rahamathulla, M., Paranthaman, S., Gowda, D. V., & Siddiqua, A. (2023). Development and

- Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles for the Clearance of A β in Alzheimer ' s Disease. *Pharmaceutics*, 15(221), 1–21.
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Singh, A., & Amiji, M. M. (2021). ScienceDirect Application of nanotechnology in medical diagnosis and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 74, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.12.011>
- Singh, P., Pandit, S., Mokkapatil, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
- Singh, R., & Lillard, J. W. J. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Souto, E. B., & Doktorovová, S. (2009). Solid Lipid Nanoparticle Formulations. Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery. In *Methods in Enzymology* (Vol. 464, Issue C, pp. 105–129). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)64006-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)64006-4)
- Subramaniam, B., Siddik, Z. H., & Nagoor, N. H. (2020). Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of*

- Nanoparticle Research*, 22(6), 141.
<https://doi.org/10.1007/s11051-020-04848-0>
- Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(46), 12320–12364. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>
- Tai, J., Han, M., Lee, D., Park, I.-H., Lee, S. H., & Kim, T. H. (2022). Different Methods and Formulations of Drugs and Vaccines for Nasal Administration. *Pharmaceutics*, 14(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051073>
- Taléns-Visconti, R., De Julián-Ortiz, J. V., Vila-Busó, O., Diez-Sales, O., & Náchter, A. (2023). Intranasal Drug Administration in Alzheimer-Type Dementia: Towards Clinical Applications. *Pharmaceutics*, 15(5), 1399. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051399>
- Tan, Y.-Y., Jenner, P., & Chen, S.-D. (2022). Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of Parkinson's Disease*, 12(2), 477–493. <https://doi.org/10.3233/JPD-212976>
- Tansey, M. G., Wallings, R. L., Houser, M. C., Herrick, M. K., Keating, C. E., & Joers, V. (2022). Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Immunology*, 22(11), 657–673. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00684-6>
- Tatulian, S. A. (2022). Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, 27(4), 1027–1043. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.01.016>
- Török, M., Huwyler, J., Gutmann, H., Fricker, G., & Drewe, J. (2003). Modulation of transendothelial permeability and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured brain capillary endothelial cells by astrocytic factors and cell-culture conditions.

- Experimental Brain Research*, 153(3), 356–365.
<https://doi.org/10.1007/s00221-003-1620-4>
- Torres, J., Costa, I., Peixoto, A. F., Silva, R., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2023). Intranasal Lipid Nanoparticles Containing Bioactive Compounds Obtained from Marine Sources to Manage Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 16(2), 311.
<https://doi.org/10.3390/ph16020311>
- Travers, B. S., Tsang, B. K.-T., & Barton, J. L. (2022). Multiple sclerosis: Diagnosis, disease-modifying therapy and prognosis. *Australian Journal of General Practice*, 51(4), 199–206.
<https://doi.org/10.31128/ajgp-07-21-6103>
- Vanhecke, D., Rodriguez-Lorenzo, L., Clift, M. J. D., Blank, F., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2014). Quantification of nanoparticles at the single-cell level: an overview about state-of-the-art techniques and their limitations. *Nanomedicine (London, England)*, 9(12), 1885–1900. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.108>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Vijiaratnam, N., Simuni, T., Bandmann, O., Morris, H. R., & Foltynie, T. (2021). Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(7), 559–572.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00061-2)
- Villegas, J. C., & Broadwell, R. D. (1993). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *Journal of Neurocytology*, 22(2), 67–80.
<https://doi.org/10.1007/BF01181571>

- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet (London, England)*, 369(9557), 218–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1)
- Wang, Y., Li, P., Tran, T. T. D., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Wang, Z., Xiong, G., Tsang, W. C., Schätzlein, A. G., & Uchegbu, I. F. (2019). Nose-to-Brain Delivery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 593–601. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258152>
- Welsh, J. A., Arkesteijn, G. J. A., Bremer, M., Cimorelli, M., Dignat-George, F., Giebel, B., Görgens, A., Hendrix, A., Kuiper, M., Lacroix, R., Lannigan, J., Van Leeuwen, T. G., Lozano-Andrés, E., Rao, S., Robert, S., De Rond, L., Tang, V. A., Tertel, T., Yan, X., ... Van Der Pol, E. (2023). A compendium of single extracellular vesicle flow cytometry. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12(2). <https://doi.org/10.1002/jev2.12299>
- Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., Fresta, M., Nie, G., Chen, C., Shen, H., Ferrari, M., & Zhao, Y. (2015). Safety of Nanoparticles in Medicine. *Current Drug Targets*, 16(14), 1671–1681. <https://doi.org/10.2174/1389450115666140804124808>
- Wong, K. H., Lu, A., Chen, X., & Yang, Z. (2020). Natural ingredient-based polymeric nanoparticles for cancer treatment. *Molecules*, 25(16), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25163620>
- Worldometer. (2023). *Life Expectancy of the World Population*. <https://www.worldometers.info/demographics/life-expectancy/>

- Wyse, R. K., Brundin, P., & Sherer, T. B. (2016). Nilotinib - Differentiating the Hope from the Hype. *Journal of Parkinson's Disease*, 6(3), 519–522. <https://doi.org/10.3233/JPD-160904>
- Yen, L. F., Wei, V. C., Kuo, E. Y., & Lai, T. W. (2013). Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats. *PloS One*, 8(7), e68595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068595>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*, 25(9), 2193. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>
- Yokel, R. A. (2022). Direct nose to the brain nanomedicine delivery presents a formidable challenge. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(2), 1–40. <https://doi.org/10.1002/wnan.1767>
- Youssef, N. A. H. A., Kassem, A. A., Farid, R. M., Ismail, F. A., EL-Massik, M. A. E., & Boraie, N. A. (2018). A novel nasal almotriptan loaded solid lipid nanoparticles in mucoadhesive in situ gel formulation for brain targeting: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 609–624. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.014>
- Zamboni, W. C., Torchilin, V., Patri, A. K., Hrkach, J., Stern, S., Lee, R., Nel, A., Panaro, N. J., & Grodzinski, P. (2012). Best practices in cancer nanotechnology: perspective from NCI nanotechnology alliance. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(12), 3229–3241. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2938>
- Zhang, L. W., & Monteiro-Riviere, N. A. (2012). Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin. *Journal of*

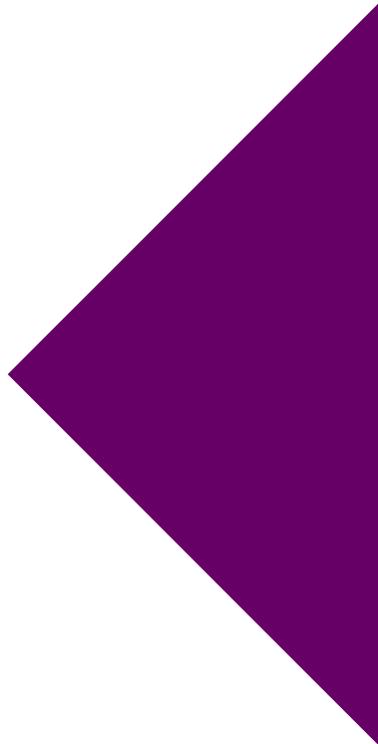
Biomedical Optics, 18(6), 61214.
<https://doi.org/10.1117/1.jbo.18.6.061214>

Zhang, P.-F., & Gao, F. (2022). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a meta-analysis of PET imaging studies. *Journal of Neurology*, 269(5), 2304–2314. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10877-z>

Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S., & Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 270, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.015>

Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/molecules25163731>

ANEXOS



**Anexo 1: Design and development of a facial Serum
with *Lactobacillus fermentum* CECT 5716**

**Diseño y elaboración de un sérum facial con
Lactobacillus fermentum CECT5716**

Florina Iulia Bura; Elena Ortega Martínez*; Adolfinia Ruiz Martínez,

M^a Encarnación Morales Hernández. *Ars Pharmaceutica* (2023)

64(3):230-242. Factor de impacto (JCR): 0.4



Introducción: De todos los órganos del cuerpo, la piel es el que está directa y constantemente expuesto a agentes externos. De ahí la importancia de proporcionarle todos los nutrientes necesarios para mantenerla sana, cuidada e hidratada. Con esta intención se ha diseñado y desarrollado un sérum hidratante con ingredientes activos naturales que incluye una cepa de la especie probiótica *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, como innovación, para potenciar el efecto sinérgico del producto.

Método: El producto citado ha sido caracterizado mediante determinaciones de pH, conductividad y viscosidad para probar su estabilidad. Además, se ha estudiado la viabilidad del probiótico y la percepción de los consumidores en estudios de eficacia del producto.

Resultados: Los datos extraídos de las mediciones de pH y conductividad aseguran que la aplicación tópica del sérum es segura, al

igual que la percepción de eficacia del producto por los consumidores, ofreciendo una mejor apariencia en términos de suavidad y luminosidad. Además, esta investigación ha revelado las características pseudoplásticas del sérum, óptimas para su propósito. Por último, se ha visto que la viabilidad probiótica disminuye con el tiempo.

Conclusiones: En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que nuestro sérum hidratante es seguro y eficaz en la hidratación cutánea, debido a las propiedades de las materias primas incorporadas y el mecanismo competitivo de los probióticos incluidos.

**Anexo 2: Silica Nanoparticles: Preparation,
Characterization and Applications in Biomedicine**
**Nanopartículas de sílice: preparación, caracterización y
aplicaciones en biomedicina**

M^a Encarnación Morales Hernández; Elena Ortega Martínez; Adolfina Ruiz Martínez. *Pharmaceutical Chemistry Journal* (2019) 53, 329–336. Factor de impacto (JCR)- Percentil (JCR): 0.538– 2.77



Se ha desarrollado una metodología rápida y efectiva con el fin de obtener nanopartículas de sílice que se caracterizan ampliamente mediante diversas técnicas, incluyendo microscopía electrónica, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía ultravioleta e infrarroja, determinación de su carga mediante movilidad electroforética y mediciones de potencial zeta. Se ha estudiado la capacidad de las nanopartículas para incorporar distintos ingredientes activos, como 5-fluorouracilo y dos protectores UV (Neo Heliopan BB y Eusolex 232), con el fin de verificar (entre otros parámetros) la eficacia de su encapsulación y las condiciones más adecuadas para llevar a cabo este proceso. Se encontró que las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño ideal para la administración a través de diferentes medios y un potencial zeta que indica su buena estabilidad.

Anexo 3: Bilayer melatonin tablet formulation: a novel approach to therapeutic efficacy

Formulación de comprimidos bicapa de melatonina: un nuevo enfoque para la eficacia terapéutica

Herminia Castán Urbano; Adolfina Ruiz Martínez; M Teresa Sánchez Rodríguez; Elena Ortega 4. 1-4. Factor de impacto (JCR): 1.66



La melatonina es una hormona con múltiples acciones, una de las cuales, con una administración adecuada, es la capacidad de controlar el peso y prevenir enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad y la diabetes. Por lo tanto, este trabajo se centra en el diseño y la creación de tabletas de doble capa que, a través de la capa superior, permiten una liberación más rápida de melatonina después de la administración y, a través de la otra capa, ofrecen una liberación prolongada en el tiempo. Las tabletas se caracterizan desde una perspectiva tecnológica y se han sometido a pruebas de desintegración y liberación para ayudar a determinar su perfil biofarmacéutico.