

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA VEHICULIZAR ACTIVOS
FARMACÉUTICOS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Memoria presentada por la licenciada M^a DOLORES
CAYERO OTERO para optar el Título de Doctor por la
Universidad de Sevilla.

Sevilla, septiembre 2018



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
Fax: 954 55 60 85
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

Memoria presentada por M^a Dolores Cayero Otero para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Sevilla

Fdo.: M^a Dolores Cayero Otero

V^oB^e

Las Directoras del Trabajo

Fdo.: Dra Mercedes Fernández Arévalo

Fdo.: Lucía Martín Banderas

Índice de contenidos

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 2 |
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1 NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA..... | 5 |
| 1.1.1 NPs como vehículos de fármacos..... | 7 |
| 1.1.2 Polímeros empleados..... | 8 |
| 1.2 BARRERA HEMATOENEFÁLICA (BHE)..... | 9 |
| 1.2.1 Morfología y funciones de la BHE..... | 10 |
| 1.2.2 Sistemas de transporte a través de la BHE..... | 16 |
| 1.3 ESTRATEGIAS PARA EL DIRECCIONAMIENTO DE ACTIVOS HACIA EL SNC..... | 21 |
| 1.3.1 Métodos invasivos..... | 22 |
| 1.3.2 Métodos no invasivos..... | 26 |
| 1.3.3 Funcionalización superficial de las NPs..... | 31 |
| 1.3.4 <i>Nose-to-brain</i> | 48 |
| 1.4 VENLAFAXINA (VLX) COMO FÁRMACO MODELO..... | 56 |
| 2 OBJETIVOS..... | 59 |
| 3 HIPÓTESIS..... | 61 |
| 4 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 63 |
| 4.1 MATERIALES..... | 63 |
| 4.2 MÉTODOS..... | 66 |
| 4.2.1 Preparación de las NPs..... | 66 |
| 4.2.2 Modificación superficial de las NPs de PLGA..... | 70 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.2.3 | Preparación de NPS fluorescentes para estudios <i>in vitro</i> de captación celular..... | 72 |
| 4.2.4 | Preparación de las NPs fluorescentes para estudios de permeabilidad | 73 |
| 4.2.5 | Preparación de NPs fluorescentes con FITC encapsulado para estudios de biodistribución..... | 74 |
| 4.2.6 | Estudios de caracterización fisicoquímica de las NPs | 75 |
| 4.2.7 | Determinación de la eficiencia de encapsulación y carga de fármaco..... | 77 |
| 4.2.8 | Determinación de la eficacia de funcionalización | 79 |
| 4.2.9 | Estudio de la influencia de la congelación en las NPs. Optimización de las condiciones de liofilización..... | 80 |
| 4.2.10 | Estudios de liberación <i>in vitro</i> | 82 |
| 4.2.11 | Estabilidad de las formulaciones de NPs en líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial | 83 |
| 4.2.12 | Estudios celulares <i>in vitro</i> | 84 |
| 4.2.13 | Estudios <i>in vivo</i> en animales de experimentación..... | 95 |
| 5 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 100 |
| 5.1 | Estudios de caracterización de las NPs preparadas..... | 100 |
| 5.1.1 | Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños..... | 100 |
| 5.1.2 | Determinación de la carga eléctrica superficial de las NPs | 105 |
| 5.1.3 | Estudio de la morfología..... | 110 |
| 5.1.4 | Determinación del contenido en fármaco (VLX) | 110 |
| 5.1.5 | Análisis de la eficacia de funcionalización..... | 112 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.1.6 | Estudio de la influencia de la congelación en las NPs. Optimización de las condiciones de liofilización..... | 114 |
| 5.1.7 | Estudio de liberación <i>in vitro</i> | 119 |
| 5.1.8 | Estabilidad de las NPs en líquido cefalorraquídeo | 121 |
| 5.1.9 | Estudios <i>in vitro</i> de toxicidad celular | 122 |
| 5.1.10 | Estudios <i>in vitro</i> de internalización celular..... | 124 |
| 5.1.11 | Estudios de permeabilidad a través de un modelo de barrera <i>in vitro</i> | 129 |
| 6 | CONCLUSIONS..... | 148 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA..... | 152 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 1 | Esquema de la BHE | 11 |
| Figura 2 | Representación esquemática detallada de las proteínas que componen las uniones estrechas y adherentes | 12 |
| Figura 3 | Esquema del receptor de transferrina | 18 |
| Figura 4 | Principales sistemas de transporte a través de la BHE | 21 |
| Figura 5 | Esquema del mecanismo de acción de los profármacos a través de la BHE. | 27 |
| Figura 6 | Representación esquemática de las rutas de acceso al sistema nervioso central por vía intranasal (<i>Nose-to-brain</i>) | 51 |
| Figura 7 | Principales etapas del método de evaporación del disolvente de una emulsión. | 67 |
| Figura 8 | Esquema de las reacciones que comprenden la funcionalización de NPs a través del método carbodiimida. | 71 |
| Figura 9 | Principales estructuras de modelos celulares de barrera. (A) Modelo monocultivo; (B-C) Modelos cocultivo con contacto; (D-E) Modelos cocultivo sin contacto y (F-G) Modelos de cocultivo triple. | 91 |
| Figura 10 | Representación esquemática del modelo <i>in vitro</i> de BHE empleado en los ensayos de permeabilidad (tipo monocapa). | 92 |
| Figura 11 | Histogramas de los tamaños de las formulaciones de NPs blancas, funcionalizadas y sin funcionalizar. | 102 |
| Figura 12 | Histogramas de los tamaños de las formulaciones de NPs cargadas con fármaco, funcionalizadas y sin funcionalizar. | 102 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 13 | Valores de potencial zeta de NPs de PLGA blancas y cargadas con fármaco obtenidos para las NPs recién preparadas, tras un primer lavado por ultracentrifugación y tras un segundo lavado. | 108 |
| Figura 14 | Valores de eficacia de encapsulación (EE%) y carga de fármaco obtenidos para partículas preparadas con diferente concentración inicial de fármaco. | 112 |
| Figura 15 | Efecto de la adición de diferentes concentraciones de trealosa en el tamaño y dispersión de las partículas tras un proceso de congelación. | 116 |
| Figura 16 | Histogramas de tamaños para las NPs después de un proceso de congelación resuspendidas en diferentes medios. | 117 |
| Figura 17 | Influencia de la adición de diferentes concentraciones de trealosa en el tamaño y dispersión de las partículas tras un proceso de liofilización. | 118 |
| Figura 18 | Histogramas de tamaños para las NPs después de un proceso de liofilización resuspendidas en diferentes medios. | 119 |
| Figura 19 | Perfiles de liberación <i>in vitro</i> para NPs no modificadas y modificadas superficialmente. | 120 |
| Figura 20 | Tamaño y PDI de las partículas antes y después de la incubación en LCR durante 24 h. | 122 |
| Figura 21 | Viabilidad celular en células hCMEC/D3 tras la incubación con NPs de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con VLX, a diferentes concentraciones durante 24 h. | 124 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figura 22 | Estudio cualitativo de captación celular. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células hCMEC/D3 después de 30 minutos de incubación con diferentes formulaciones de NPs de PLGA cargadas con NR a 37 °C. (A) NPs no modificadas superficialmente; (B) NPs modificadas con Tf; (C) NPs modificadas con TfRp | 127 |
| Figura 23 | Histogramas obtenidos tras el estudio cuantitativo de la fluorescencia por citometría de flujo en las células hCMEC/D3 tras 30 minutos de incubación con diferentes formulaciones de NPs cargadas con NR. (A) Control (células sin NPs); (B) NPs de PLGA no modificadas superficialmente; (C) NPs de PLGA modificadas con Tf; (D) NPs de PLGA modificadas con TfRp. | 129 |
| Figura 24 | Valores de TEER de las células hCMEC/D3 cultivadas en insertos Transwell de 0.4 µm para ambos experimentos. | 131 |
| Figura 25 | Valores de TEER para ambos experimentos de permeabilidad (NPs y fármaco) antes y después de la incubación con las NPs | 132 |
| Figura 26 | Porcentaje de NPs fluorescentes (funcionalizadas y no funcionalizadas) en el lado basolateral después de los tiempos predeterminados | 134 |
| Figura 27 | Concentraciones de fármaco en el lado basolateral de diferentes formulaciones (VLX libre, NPs cargadas con VLX sin funcionalizar y funcionalizadas con Tf o TfRp) | 136 |
| Figura 28 | Imágenes de microscopía confocal de secciones de cerebro en ratones control (A) y tras 24 h de una administración aguda (130mg/kg) de NPs fluorescentes no funcionalizadas (B), funcionalizadas con Tf (C) y funcionalizadas con TfRp (D). | 139 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 29 | Imágenes de microscopía confocal de secciones de bazo en ratones control tratados con PBS (A) y tras 4 h de una administración aguda (65 mg/kg) de NPs fluorescentes no funcionalizadas (B) | 140 |
| Figura 30 | Comparación de histogramas de cerebro (izquierda) y bazo (derecha) obtenidos tras el análisis de citometría de flujo de tejidos control (A, B), tejidos tratados crónicamente con 65 mg/kg de partículas (A1, B1), tejidos con tratamientos agudo con 65 mg/kg de partículas (después de 4 h) (A1, B2) y tejidos con tratamiento de 130 mg/kg (después de 4 h) | 141 |
| Figura 31 | Representación gráfica del porcentaje de fluorescencia de cada órgano normalizado con respecto al total de fluorescencia de los órganos estudiados. Los d | 144 |
| Figura 32 | Porcentaje de fluorescencia mostrado por cada formulación de NPs en relación al porcentaje de fluorescencia tras una inyección directa de la dosis total | 146 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|--|-----|
| Tabla 1 | Método de gradiente de la fase móvil para la determinación de VLX por cromatografía líquida-espectrometría de masa. | 94 |
| Tabla 2 | Tamaño medio y distribución de tamaños de NPs blancas y cargadas (funcionalizadas y no funcionalizadas). | 101 |
| Tabla 3 | Tamaño medio y distribución de tamaño de NPs de NR (funcionalizadas y no funcionalizadas). | 103 |
| Tabla 4 | Tamaño y distribución de tamaño de las partículas fluorescentes de cFITC-PLGA (funcionalizadas y no funcionalizadas). | 104 |
| Tabla 5 | Tamaño y distribución de tamaños de las partículas fluorescentes de FITC encapsulado (funcionalizadas y no funcionalizadas). | 104 |
| Tabla 6 | Potencial zeta obtenido para las diferentes formulaciones (NPs cargadas y blancas, funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar). | 107 |
| Tabla 7 | Valores de potencia zeta obtenido por las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes empleando NR como fluoróforo (funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar). | 108 |
| Tabla 8 | Valores de carga superficial obtenido para las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes de FITC-PLGA (funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar). | 109 |
| Tabla 9 | Valores de carga superficial obtenido para las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes con cFTIC encapsulado | 109 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| 16HBE | Células epiteliales bronquiales humanas |
| 8D3 | Anticuerpo específico del receptor de transferrina |
| AAV-PHP.eB | Cápsida de virus adeno-asociados con el serotipo PHP.eB |
| AAV-PHP.S | Cápsida de virus adeno-asociados con el serotipo PHP.eB |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANG | Angiopep-2, un ligando específico de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad. |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AS1411 | Péptido de unión a la proteína nucleolina, expresada en la membrana de las células cancerosas |
| ATC | Antidepresivos tricíclicos |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| AUC | Área bajo la curva |
| BCA | Ácido bicinconánico |
| BCEC | Brain capillary endothelial cells |
| BCRP | Proteínas resistentes al cáncer de mama |
| bFGF | Factor básico de crecimiento fibroblástico |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| BMEC | Brain microvascular endothelial cell |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CBA | Albúmina catiónica de suero bovino |
| CIRSAL | Centro Interdepartamental de Servicio de Investigación Experimental de la Universidad de Verona |
| CRT | Péptido tricíclico (CRTIGPSVC) similar al hierro que induce un cambio alostérico en el receptor de transferrina |
| DCM | Diclorometano |
| DE | Desviación estándar |

| | |
|------------------|--|
| DE2B4 | Anticuerpo contra el péptido β -amiloide |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EC | Eficacia de conjugación |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EE | Eficacia de encapsulación |
| EGFP-EGF1 | Proteína de análoga del Factor VII de la cascada de coagulación |
| EMA | Agencia Europea del Medicamento |
| ETPN | Plataforma Tecnológica Europea de Nanomedicina |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| GLUT1 | Transportador de glucose 1 |
| GSH | Glutación |
| hCMEC/D3 | Línea de células endoteliales de cerebro humano |
| HEPES | Ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazinaetanosulfónico |
| HPG | Poli-glicerol hiperramificado |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| ISRN | Inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| MRPs | Proteínas multirresistentes a fármacos |
| MTT | Bromuro de tetrazolio o Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NHS | N-hidroxisuccinimida |
| NPs | Nanopartículas |
| NR | Nile-Red |
| OX26 | Anticuerpo monoclonal contra el receptor de |

| | |
|------------------------------------|---|
| | transferrina |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCL | Poli- ϵ -caprolactonas |
| PDGFRβ | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PEG | Polietilenglicol |
| Péptido Aβ | Péptido β -amiloide |
| PFA | Paraformaldehído |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PLGA | Ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico) |
| PLGA-PEG | Ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico) con cadenas de polietilenglicol |
| PVA | Alcohol polivinílico |
| RG2 | Células de glioma de rata |
| RMP-7 | Agonista de la bradicinina |
| S1 | Péptido corto inhibidor de las placas β -amiloide |
| SH-SY5Y | Línea celular de neuroblastoma |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SRE | Sistema reticuloendotelial |
| Tc-99m | Tecnecio 99 metaestable |
| TEER | Resistencia eléctrica transendotelial |
| Tf | Transferrina |
| TfRp | Péptido específico del receptor de transferrina |
| TGN | Péptido de 12 aminoácidos para direccionamiento cerebral |
| U-87 MG | Línea celular humana de glioblastoma |
| UHPLC-MS/MC | Cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas |
| VLX | Venlafaxina |

ABSTRACT

Currently, nanotechnology has become in an emergent science. It offers the possibility of development of novel products and numerous applications for several fields like alimentary, cosmetic or engineer industry. In this sense, nanomedicine is an innovative alternative focused in the improvement of traditional therapies, a useful tool to solve numerous pharmacokinetics and pharmacodynamics drawbacks of conventional treatments and it can be able to control the physicochemical and biopharmaceutical behavior. Specifically, polymeric nanoparticles (NPs) are widely used as drug transport system in a nanometric scale and present various advantages compared to traditional pharmaceutical forms.

On the other hand, the treatment of different diseases which affect to the brain results very difficult due to the presence of blood-brain barrier (BBB). This barrier restrict the passage of toxic substances and virus which can be harmful for nervous system (CNS) but, unfortunately, it also impede that drugs and therapeutic actives can cross it, preventing an effective treatment of neuronal disorders. Specifically, depression is a major international health problem; affecting millions of people worldwide. Actually, no drugs provide therapeutic benefit to approximately one third of depressed patients. With depression predicted to become the number one global disease burden by 2030, it is imperative that new therapeutic interventions are established. In the present work we used venlafaxine as antidepressant drug model.

Therefore, the main objective of this doctoral thesis has been the development of biodegradable and biocompatible polymeric system in a nanometric range to improve the drug

delivery in CNS which is limited by the presence of BBB using a dual action antidepressant as model drug.

Firstly, we developed a VLX loaded-polymeric nanosystem based on poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA), a US Food & Drug Administration (US FDA)-approved biocompatible and biodegradable polymer. Particles were surface functionalized with two different ligands against transferrin receptor: transferrin (Tf) and specific cell-penetrating peptide for this receptor (TfRp).

Particles were prepared using a double emulsion-solvent evaporation method and functionalized employing carbodiimide strategy. Plain and functionalized NPs were evaluated and characterized for particle size and size distribution, zeta potential and morphology. Encapsulation efficiency was calculated by a validated HPLC method and conjugation efficiency was estimated using a BCA kit.

In order to determine the release profile, an *in vitro* drug delivery assay was performed and the stability of NPs was analyzed after incubation in artificial cerebrospinal fluid and after freezing and lyophilization process.

For *in vitro* cytotoxicity study, a colorimetric assay was carried out in order to quantify the cell viability after incubation with NPs. Cell uptake of polymeric particles was evaluated by qualitative and quantitative studies. For quantitative analysis, confocal laser scanning microscopy was used and qualitative determination was achieved by flow cytometry. To visualize NPs, a

fluorophore loaded-particles (Nile-Red) were employed as a marker and the nuclei was stained with Hoechst® 33342.

For the study of permeability across the BBB, an *in vitro* model was developed, employing FITC-PLGA NPs for this purpose. Drug permeability was evaluated by ultra-high-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and NPs permeability was estimated measuring the fluorescence in basolateral side.

For all cell studies, immortalized human cerebral microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3) was used.

Regarding *in vivo* studies, the ability of NPs to cross the BBB was evaluated. For this, C57/bl6 mice were administered intravenously during 7 days for chronic administration and with two different particle concentrations for single-dose. Brain and spleen were collected in order to quantify the fluorescence by confocal microscopy and flow cytometry.

In vivo biodistribution studies were performed using C57/bl6 mice. For this, fluorescent NPs with encapsulated-FITC as fluorophore were administered intranasally using *nose-to-brain* pathway and, after 30 minutes, spleen, brain, heart, lungs, liver and kidneys were collected and analyzed by flow cytometry. The percentage of particles detected was expressed as the ratio of the fluorescence unit of each tissue relative to the sum of fluorescence units of all the tissue analyzed and fluorescence of each organ from treatment group was compared to fluorescence of control group.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA

En la actualidad, la focalización del campo farmacéutico se centra en la personalización de los tratamientos según paciente y patología, así como en el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos, capacitados para controlar los comportamientos fisicoquímico y biofarmacéutico, Lo que parece evidente es que, salvo para ciertas situaciones, actualmente resulta insuficiente el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con una determinada actividad farmacológica para proporcionar una mejora en las terapias si no van acompañadas de sistemas de administración más eficaces. La razón del fracaso en la terapéutica actual puede deberse a numerosas causas de carácter físico-químico y biológico que se traducen en baja o incorrecta biodisponibilidad, motivada por una absorción y/o solubilidad limitada del fármaco, rápido metabolismo y corta duración del efecto farmacológico, presencia de efectos secundarios no deseados y llegada de activos a localizaciones no deseadas del organismo, entre otras.

En este sentido, la nanotecnología, descrita generalmente como el estudio de materiales y fenómenos físicos, químicos, biofísicos y bioquímicos en la escala nanométrica (Sweeney 2015) juega un papel destacado, proporcionando nuevas alternativas para vehicular activos farmacéuticos, productos de interés alimentario o cosméticos, por poner algunos ejemplos. Aunque los rangos de tamaño para la definición siguen siendo, a día de hoy, objeto de

debate y la legislación que lo regula muy escasa (Bregoli et al. 2016), la nanociencia y sus aplicaciones constituyen sin duda una interesante plataforma para el control y la manipulación de los materiales a nanoescala (Fatehi et al. 2012), al posibilitar el desarrollo de sistemas de administración más eficientes comparados con la farmacoterapéutica tradicional.

Además, la nanotecnología farmacéutica también ofrece beneficios importantes en otras áreas como pueden ser el empleo de imágenes para diagnóstico, la valoración de la eficacia de un tratamiento en tiempo real o la aplicación en odontología (Demetzos and Pippa 2014), por poner sólo algunos ejemplos.

La nanomedicina, definida por *European Technology Platform of Nanomedicine* (ETPN) como “*la aplicación de la nanotecnología para lograr avances en el cuidado de la salud que explota las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales a escala nanométrica*” (Fornaguera and José García-Celma, 2017), se ha convertido en los últimos años en una ciencia emergente que permite fabricar, caracterizar y modificar de forma controlada las propiedades de los materiales nanométricos con fines diagnósticos y biomédicos (Mirza and Siddiqui 2014). Por tanto, aunque el concepto no posee una definición oficial, la ETPN y la *Food and Drugs Administration* (FDA) aceptan que la nanomedicina engloba cinco principales disciplinas: (a) herramientas analíticas; (b) herramientas de imágenes; (c) nanomateriales y nanodispositivos; (d) nuevos sistemas terapéuticos de administración de fármacos; y (e) todas aquellas implicaciones sobre su regulación y seguridad (Webster 2006).

En la actualidad, numerosos activos farmacéuticos integrados en nanosistemas, aprobados por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA), ya están disponibles para su administración en humanos. Caelyx[®], Mepact[®] y Myocet[®], vehiculizados en liposomas o Abraxane[®], Rapamune[®] y Sinerem[®], comercializados en nanopartículas (NPs)(*European Medicines Agency* 2014), son algunos ejemplos de nanomedicinas, desarrollados para el tratamiento del cáncer, el rechazo de órganos en pacientes trasplantados o el diagnóstico de tumores.

1.1.1 NPs como vehículos de fármacos

El potencial de estos nuevos sistemas de administración es enorme; entre ellos caben destacar liposomas, NPs (inorgánicas, poliméricas, lipídicas, metálicas), nanocristales, nanotubos de carbono o dendrímeros (Caban et al. 2014). Concretamente, las NPs poliméricas se han convertido en objeto de investigación debido a su gran capacidad para transportar y liberar, de manera sostenida, una extensa variedad de fármacos hasta numerosas regiones del organismo (Bari et al. 2015).

Las NPs poliméricas pueden ser administradas por numerosas rutas, y, debido a su tamaño, pueden alcanzar las áreas más pequeñas del organismo (Kashi et al. 2012b), mejorar las propiedades farmacocinéticas del compuesto y su solubilidad, aumentar su vida media y reducir los efectos adversos, liberándose únicamente en los tejidos diana y minimizando la toxicidad en el resto de órganos (Mahajan et al. 2012), por comentar sólo algunas posibilidades, lo que se traduce en un aumento de la eficacia

terapéutica (Cetin et al. 2013)(Saraiva et al. 2016). Por resaltar alguna de las posibilidades, juegan un papel fundamental en la liberación de fármacos en el cerebro y pueden emplearse como una herramienta útil para mejorar la eficacia de los tratamientos convencionales y el diagnóstico de las enfermedades que afectan al Sistema Nervioso Central (SNC) (Zhang *et al.*, 2016), hecho muy limitado, principalmente, por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE).

1.1.2 Polímeros empleados

Actualmente hay disponible una amplia de gama de polímeros, tales como quitosano, gelatinas, ácido poliláctico (PLA), copolímeros de láctico y glicólico (PLGA) o poli- ϵ -caprolactonas (PCL), para su uso en la preparación de NPs poliméricas, mostrando una excelente compatibilidad tanto con células como con tejidos humanos (Campos, Bentley, and Torchilin 2016)(Kashi et al. 2012a).

Uno de los polímeros más empleados es el PLGA, un copolímero de los ácidos láctico y glicólico, metabolizado fácilmente por el organismo vía ciclo de Krebs (Gaillard, Visser, and de Boer 2005), que se presenta en el mercado con diferentes proporciones de cada ácido y distintos pesos moleculares, lo que le otorga capacidad para ejercer control sobre la liberación del activo, pudiendo abarcar desde días, semanas o incluso meses (Danhier et al. 2012a)(Berrocoso et al. 2017). Globalmente, la degradación del PLGA depende de su peso molecular y de la relación entre los dos ácidos que lo forman (Danhier et al. 2012b). Los copolímeros

formados por polímeros amorfos, más hidrófilos y de bajo peso molecular que posean mayor cantidad de glicólico exhiben un tiempo de degradación más corto puesto que el ácido glicólico posee mayor grado de hidrofilia que el ácido láctico. Luego, los polímeros hidrófobos con un mayor contenido de ácido láctico absorben menos agua y por consiguiente, muestran un tiempo de degradación más prolongado (Dinarvand et al. 2011).

Aunque una de las características más ventajosas de este polímero es su degradación en agua, también posee numerosas propiedades de interés farmacéutico destacando (i) biocompatibilidad y biodegradabilidad, (ii) está aprobado como vehículo de fármacos por la FDA y la EMA, (iii) permite una liberación controlada (iv) es fácilmente modificable, según sus grupos terminales, para lograr mayor efectividad lo que posibilita su llegada a órganos o células diana (v) protege al activo frente a degradaciones externas e internas y (vi) permite encapsular fármacos de diversa naturaleza (hidrófobos e hidrófilos) (Mir, Ahmed, and Rehman 2017).

1.2 BARRERA HEMATOENEFÁLICA (BHE)

Las enfermedades o trastornos del SNC suponen un problema de salud a nivel mundial debido al aumento de envejecimiento en la población y la falta de tratamientos efectivos para las mismas. Para el año 2020, la cifra de personas afectadas por trastornos neurológicos podría rondar los 2 billones en todo el mundo (Brasnjevic et al. 2009).

La dificultad añadida en el tratamiento de las enfermedades del SNC radica en la presencia de la BHE, que imposibilita un tratamiento efectivo, y la complejidad del cerebro, principalmente (Dong 2018). A continuación, se describe brevemente su morfología, principales funciones y algunas estrategias desarrolladas para favorecer la liberación de activos.

1.2.1 Morfología y funciones de la BHE

La BHE es una barrera fisiológica semipermeable y selectiva intuida por primera vez en 1885 por Paul Ehrlich, quien sentó las bases de su descubrimiento demostrando que, tras una administración intravenosa de Trypan Blue, todos los órganos se teñían de azul excepto el cerebro. Años más tarde, Edwin Goldman, pupilo de Ehrlich, evidenció la presencia de una barrera entre líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre, demostrando que, tras una inyección directa del tinte en el LCR, el único órgano que resultaba teñido era el cerebro (Eyal, Hsiao, and Unadkat 2009)(Alyautdin et al. 2014).

La BHE es una de las barreras biológicas más exclusivas, un sistema de intercambio entre la sangre y el SNC formada por diferentes tipos de células, incluyendo astrocitos, pericitos y células capilares endoteliales (ver figura 1)(Gao 2016)(Harris and Pierpoint 2012). Los microvasos cerebrales, las células gliales y las neuronas forman la unidad neurovascular, en contacto con las células endoteliales a través de la lámina basal (Najjar *et al.*, 2013)

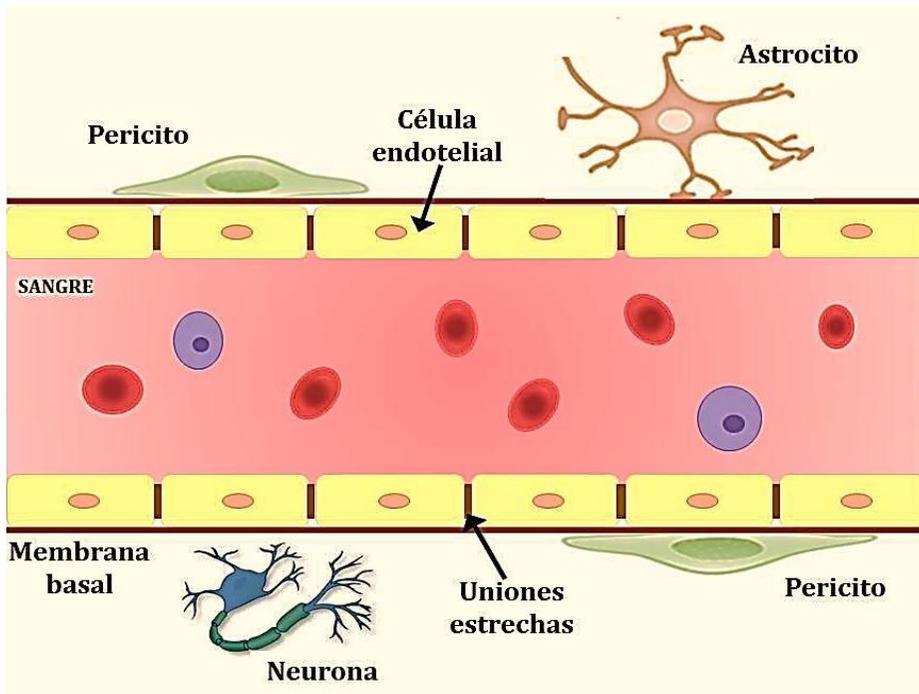


Figura 1. Esquema de la BHE

1.2.1.1 Células endoteliales

Este tipo de células son las que se encuentran en mayor número, ocupando una superficie endotelial aproximada de 20 m² (Pardridge, 2003) y cubiertas por una lámina basal. A diferencia del resto de endotelios corporales, carece de fenestraciones (Brasnjevic et al. 2009)(D. Wang and Wu 2016), exhibe un número muy bajo de vesículas pinocíticas (Saunders, Habgood, and Dziegielewska 1999) y están selladas por uniones estrechas y adherentes continuas.

1.2.1.2 Uniones estrechas

La BHE posee un elaborado entramado de uniones estrechas situadas entre las células endoteliales, dotándola de un sellado particular y único en el organismo. Este exclusivo sistema de sellado le proporciona a la BHE de una resistencia eléctrica transendotelial extremadamente alta ($>1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (Wong, Wu, and Bendayan 2012), restringiendo incluso el desplazamiento de iones pequeños como Na^+ o Cl^- . Las uniones estrechas se encuentran en la parte apical de las células endoteliales y están formadas por varias proteínas transmembrana entre las que destacan claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión. Las claudinas se unen entre sí formando dímeros que sellan las células endoteliales mientras que las ocludinas tienen una función reguladora (Figura 2) (Colin and Gonzalez-villalva 2012).

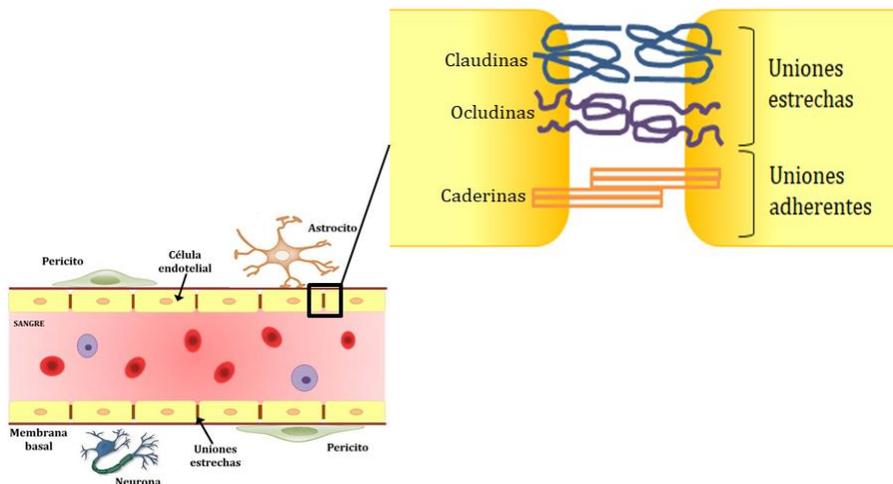


Figura 2. Representación esquemática detallada de las proteínas que componen las uniones estrechas y adherentes

1.2.1.3 Uniones adherentes

Por otro lado, las uniones adherentes se localizan en la región basal, por debajo de las uniones estrechas, y están formadas por glucoproteínas transmembrana (mayoritariamente cadherinas reguladas por Ca^{2+})(Figura 2), que se unen al citoesqueleto e interceden en la adhesión de las células del endotelio entre sí, lo que ayuda a la función protectora de la BHE (Yan Chen and Liu 2012). Además intervienen en funciones como la remodelación vascular o el inicio de la polaridad celular (Hawkins and Davis, 2005)

1.2.1.4 Pericitos

Los pericitos son células polimórficas (Guillemin and Brew 2016) con capacidad contráctil que rodean las células endoteliales (Attwell *et al.*, 2016) y son imprescindibles en funciones tan importantes como la angiogénesis, lo que le confiere cierto carácter de célula madre, el mantenimiento de la BHE o el control del flujo sanguíneo. (Hall et al. 2014). Como se ha citado previamente, la cantidad de células endoteliales en la BHE es significativamente mayor con respecto al resto de las células que la forman. En humanos, la relación es de un pericito por cada tres-cuatro células endoteliales, aunque dicha proporción varía entre cada individuo e incluso entre cada órgano (Dore-Duffy and Cleary 2011).

La pluripotencialidad de dicha célula, junto con su capacidad migratoria (Dore-Duffy 2008), originan un desconocimiento

relativo del papel de dichas células que no se encuentra correctamente definido y no hay certeza absoluta de la función que desempeñan (J. A. Kim et al. 2006).

1.2.1.5 **Astrocitos**

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el cerebro de mamíferos. Su presencia varía entre un 20-40% del total de células, dependiendo de la especie y el área del cerebro (Khakh and Sofroniew, 2015) y junto con oligodendrocitos, microglía y células de Schwann forman la glía. Poseen prolongaciones que finalizan en pies terminales (“*endfeet*”) que conectan con la vasculatura cerebral con células endoteliales y pericitos que, tras un aumento de los niveles de Ca^{2+} , posibilitan la modulación de la actividad de las neuronas y del flujo sanguíneo (Cabezas et al. 2014).

Suelen clasificarse en 2 grupos según su forma, fenotipo y ubicación: protoplasmáticos y fibrosos. El primer tipo suele localizarse en la sustancia gris y posee una forma redondeada central con numerosas ramificaciones. Por el contrario, los fibrosos se encuentran en la sustancia blanca y, aunque con una forma oval similar, tienen un grado de ramificación menor (Guillamón-Vivancos, Gómez-Pinedo, and Matías-Guiu 2015). Coexiste un tercer grupo, denominados astrocitos radiales que se disponen de manera perpendicular a los ventrículos (Yongmei Chen and Swanson 2003)

Además de su papel estructural y entre muchas, cumplen funciones de soporte metabólico (producción de compuestos antioxidantes o enzimas, control del pH cerebral...) participan en la homeostasis cerebral y se encargan de la señalización en circuitos neurona-glía (Verkhatsky *et al.*, 2010).

Como dificultad añadida para el tratamiento terapéutico de los desórdenes que afectan al SNC, las bombas de eflujo sobreexpresadas en la cara luminal de las células endoteliales consiguen bombear de nuevo a la sangre sustancias que, previamente, habrían conseguido atravesar la barrera (Wohlfart, Gelperina, and Kreuter 2012) y, por tanto, disminuyen las concentraciones terapéuticas del fármaco. Entre los más destacados cabe citar algunos como la glicoproteína-P, las proteínas resistentes a múltiples fármacos (MRPs) y la proteína resistente al cáncer de mama (BCRP), presente también en otras localizaciones del cuerpo humano pero en menor medida (Eyal, Hsiao, and Unadkat 2009).

La BHE se encarga de funciones tan destacadas como el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos cerebrales, controlando estrictamente la circulación de células y moléculas entre la sangre y el cerebro (Nair *et al.* 2016), la fibrinólisis y coagulación o la conservación del microambiente neuronal, entre otras (Alam *et al.* 2010). Además protege al SNC de la invasión de numerosas toxinas o sustancias perjudiciales circulantes lo que, a su vez, restringe el acceso a numerosos agentes neuroterapéuticos y de diagnóstico (Tosi *et al.* 2015). De hecho, el 100% de los activos macromoleculares (como proteínas o anticuerpos) son

incapaces de atravesarla y sólo alrededor de un 2% de las pequeñas moléculas serían capaces de alcanzar el cerebro (M. M. Patel et al. 2009). Dicha barrera ofrece un transporte muy pobre de moléculas solubles en agua (T Yoshikawa and Pardridge 1992) y, de manera excepcional, únicamente moléculas pequeñas (<500 Da) y con un marcado carácter hidrófobo podrían atravesarla (Blasi et al. 2007).

Ante esta situación, como se ha indicado con anterioridad, es importante destacar que las NPs poliméricas se presentan como un mecanismo eficiente para la administración de agentes terapéuticos y de diagnóstico (incluyendo moléculas de gran tamaño) a nivel cerebral cuyas propiedades superficiales desempeñan una tarea fundamental en este propósito (Kreuter 2014).

Por suerte, las células capilares del endotelio cerebral muestran numerosos mecanismos de transporte mediados por receptores, existiendo diversas rutas de paso a través de la BHE. En base a ello, se han desarrollado múltiples estrategias para poder atravesarla.

A continuación, se describe brevemente los mecanismos de transporte a través de la BHE y las principales estrategias desarrolladas para evitarla.

1.2.2 Sistemas de transporte a través de la BHE

Entre las vías de acceso al cerebro cabe distinguir entre mecanismos pasivos (difusión paracelular y transcelular) o activos

(endocitosis mediada por receptores, transportadores o células y transcitosis por adsorción) en función de los requerimientos de energía. Como sistema de transporte, se incluyen también las bombas de eflujo (citadas en el apartado anterior)(ver figura 3).

La difusión pasiva es un proceso insaturable y posee la mayor tasa de transporte, seguido de la endocitosis adsorptiva que, aunque sí es un mecanismo saturable, se necesitan concentraciones tres veces más altas que para los procesos mediados por receptor (Oller-Salvia et al. 2016).

1.2.2.1 Difusión pasiva

Dentro de este tipo de transporte se puede distinguir entre dos formas diferentes para atravesar la BHE dependiendo de la naturaleza de la sustancia. En la vía paracelular, pequeñas moléculas hidrófilas acceden a través de las uniones estrechas mientras que las sustancias de carácter hidrófobo pueden ingresar a las células endoteliales a través de la membrana de las mismas, es decir, vía transcelular (Brasnjevic et al. 2009). Dicho paso está influenciado por diferentes factores como pueden ser la características fisicoquímicas y estructurales de la molécula (tamaño, carga, número de enlaces de hidrógeno y grado de lipofilia)(Dong 2018).

1.2.2.2 Endocitosis mediada por receptor

La endocitosis mediada por receptor es un tipo de transporte altamente específico (Bhaskar et al. 2010). Requiere un

aporte de energía (dependiente de ATP)(Bickel, Yoshikawa, and Pardridge 2001) y su mecanismo implica la unión del ligando específico a los receptores presentes en la membrana apical de la barrera (Fullstone et al. 2016).

La BHE expresa de manera fisiológica numerosos receptores como el receptor de lipoproteína, insulina o transferrina (Tf), entre otros (Parashar and Nema 2012).

De manera destacada, el receptor de Tf está formado por dos monómeros glicoprotéicos (760 aminoácidos cada uno) de unos 90 kDa unidos por puentes disulfuro y tres dominios principales (proteasa, helicoidal y apical) dispuestos en forma de mariposa (Macedo and Sousa 2008) (Figura 3). Cada subunidad se une a una molécula de Tf en un proceso reversible y dependiente de pH (Moos and Morgan 2000).

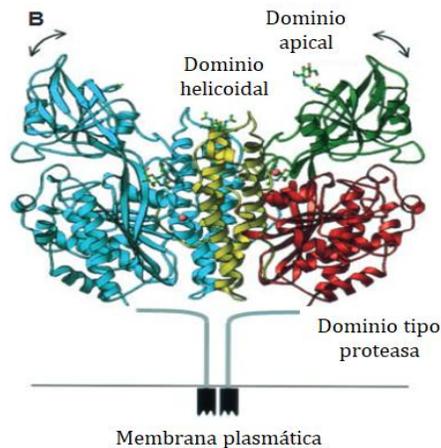


Figura 3. Esquema del receptor de Tf (Lawrence et al. 1999).

Se encarga de mantener la homeostasis del hierro, proporcionándose a las células a través de la unión específica con

la Tf, regulando la cantidad del oligoelemento en función de las necesidades metabólicas celulares (H. Li and Ming Qian 2002).

Un nuevo receptor de Tf, conocido como receptor de Tf II, ha sido investigado y se cree que tiene un papel en la homeostasis del hierro, aunque su función no se conoce con exactitud (Calzolari et al. 2010). La diferencia principal con el receptor de Tf I reside en su localización. Mientras que el I está presente prácticamente en todas las células, el II se encuentra primordialmente en hígado y eritrocitos aunque, en menor medida, puede hallarse en otras células del organismo. Sin embargo, existen varias similitudes entre ellos ya que ambos se sobreexpresan en células tumorales y sus dominios extracelulares son semejantes (Voth et al. 2015).

1.2.2.3 **Transcitosis por adsorción**

Este tipo de mecanismo transportador no específico que depende de interacciones electrostáticas, la endocitosis se desencadena por la unión entre moléculas con carga positiva las partes aniónicas de la membrana apical de las células endoteliales (concretamente con el glucocáliz) (Pehlivan, 2013) ya que, a pH fisiológico, tanto la membrana apical como la basolateral exhiben una carga negativa (Hervé, Ghinea, and Scherrmann 2008).

El proceso de endocitosis sigue pasos similares a los producidos cuando interviene un receptor, la diferencia radica en la afinidad y la capacidad de cada tipo. El mecanismo mediado por receptor, aunque con mayor afinidad ofrece menos capacidad de

transporte ya que es saturable a concentraciones más bajas (Yan Chen and Liu 2012).

1.2.2.4 Transcitosis mediada por transportador

El aporte de nutrientes como glucosa o aminoácidos necesarios para el buen funcionamiento de la BHE se realiza a través de proteínas de transporte expresadas en su superficie (tanto apical como basolateral). El ejemplo más conocido es el transportador de glucosa (GLUT1)(Sanchez-Covarrubias et al. 2014). Para que los fármacos puedan acceder al cerebro a través de este sistema, deben tener un tamaño pequeño y poseer una estructura análoga a la de los nutrientes que transportan lo que limita su explotación (Béduneau, Saulnier, and Benoit 2007).

1.2.2.5 Endocitosis mediada por células

La movilidad de las células inmunitarias les permite viajar con facilidad desde el torrente sanguíneo hasta focos inflamatorios, síntoma común para la mayoría de numerosos trastornos neurodegenerativos (M. M. Patel and Patel 2017). Las células encargadas de este tipo de transporte son células específicas del sistema inmunitario como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y monocitos que, condicionados por la presencia de inflamación, llevan a cabo el paso a través de la capa endotelial por dos procesos llamados quimiotaxis y diapédesis (E. V. Batrakova and Kabanov 2013).

Aunque puede presentarse como un método exitoso para la liberación de fármacos en lugares de inflamación, su empleo se ve reducido por los inconvenientes que presenta ya que: (a) las células pueden transportar una cantidad de fármaco baja, (b) los inmunocitos no tienen buena capacidad de liberar las moléculas terapéuticas que, además, debe ser de manera controlada una vez alcanzado el lugar de acción, (c) la cantidad de células que migran a la zona inflamatoria no es elevada y (d) las formulaciones no pueden ser tóxicas ni perjudiciales para el portador celular (E. V Batrakova, Gendelman, and Kabanov 2011).

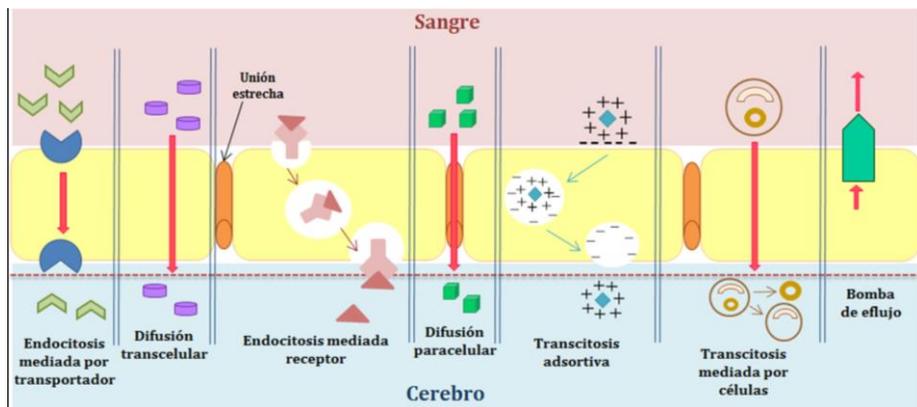


Figura 4. Principales sistemas de transporte a través de la BHE

1.3 ESTRATEGIAS PARA EL DIRECCIONAMIENTO DE ACTIVOS HACIA EL SNC

Por todas las razones mencionadas con anterioridad, la llegada de fármacos al SNC está muy limitada actualmente pero, afortunadamente, se están desarrollando numerosas estrategias para atravesarla. Estas estrategias podrían dividirse en dos grandes grupos: métodos invasivos y no invasivos.

Adicionalmente, existe una ruta alternativa para la llegada de fármacos al cerebro denominada *nose-to-brain* tras una administración vía intranasal. En los siguientes apartados se describe brevemente cada una de ellas.

1.3.1 **Métodos invasivos**

En las técnicas invasivas el agente terapéutico ingresa al SNC por una apertura provocada en la BHE, o es administrado directamente en el cerebro.

Los procedimientos invasivos poseen notables desventajas, ya que son relativamente costosos y peligrosos requiriéndose la hospitalización del paciente, anestesia y/o cirugía, y además se posibilita el que pueden acceder al cerebro sustancias no deseables perjudiciales para el ambiente cerebral (Soddu et al. 2015).

Dentro de esta clasificación se incluyen la disrupción de la barrera, la entrada por convección o la inyección directa en el SNC.

1.3.1.1 **Disrupción de la BHE**

La finalidad es abrir las uniones estrechas que se encuentran sellando las células endoteliales que forman la barrera. La apertura debe ser reversible, provisional y momentánea y controlada en extensión para evitar posibles efectos no deseados (Martin-Banderas et al. 2011).

Existen numerosas técnicas para lograrlo:

1. Disrupción osmótica: la disrupción hiperosmótica se comenzó a explotar en los años 70 cuando Rapoport et al. observaron que las soluciones hiperosmóticas aplicadas en el córtex cerebral de conejo permitían el paso del colorante azul Evans al interior del cerebro (Rapoport and Hori, 1972). Tras una administración intravenosa de la solución hiperosmótica, el proceso de apertura por hiperósmosis se desencadenaba por la salida del agua de las células endoteliales hacia la sangre, provocando la crenación de las mismas. Seguidamente, el aumento de agua en los vasos sanguíneos produce vasodilatación y, finalmente, el citoesqueleto celular se contrae conduciendo a una expansión de las uniones estrechas (Rapoport and Robinson, 1986)(Chavan and D'souza, 2010).

Este procedimiento manifiesta claras mejoras en la terapia neurooncológica, aumentando los niveles de los fármacos quimioterápicos en el SNC tras una administración intravenosa, sin embargo, las concentraciones pueden alcanzar niveles tóxicos (Doolittle et al. 2000).

Uno de los agentes hiperosmóticos más usados es el manitol, aunque también se han empleado otros como la urea y la arabinosa. Las limitaciones en el uso de manitol residen en los efectos secundarios que presenta, ya que puede provocar convulsiones, infecciones, entrada de toxinas al cerebro o el paso de proteínas plasmáticas (Martin-Banderas et al. 2011).

2. Disrupción bioquímica: se basa en la administración intrarterial de sustancias vasoactivas que provocan una reacción inflamatoria en las células endoteliales. Entre las sustancias

vasoactivas más conocidas se encuentran la bradiquinina junto con su análogo RMP-7 y la histamina. La bradiquinina es un nonapéptido que aumenta la permeabilidad de las uniones estrechas tras una activación del receptor B2, presente en las células endoteliales (Ding-Zhou et al. 2003). Tras la activación, se desencadenan una serie de procesos que desembocan en un aumento de óxido nítrico, que produce vasodilatación.

La adenosina es otra sustancia vasoactiva que actúa sobre los receptores de adenosina 2A que se encuentran en las células endoteliales. Pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G y su activación conlleva un aumento de la permeabilidad de la BHE por la apertura de las uniones estrechas (M. M. Patel and Patel 2017).

Por último, los alquilgliceroles han surgido como una alternativa no tóxica para facilitar el acceso al SNC. Gracias a su carácter anfílico no iónico (Hersh et al. 2016), pueden incorporarse a la membrana y desestabilizarla, provocando su apertura, cuya extensión dependerá de la estructura y concentración del compuesto (Erdlenbruch et al. 2003).

3. Disrupción por ultrasonidos: una alternativa emergente para producir la disrupción de la membrana es la aplicación de ultrasonidos. Para ello, se inyectan microburbujas de tamaño micrométrico (Dube et al. 2017) que, tras la aplicación de ultrasonidos, son capaces de transformar la energía acústica en energía mecánica (Gao 2016). La alteración de la barrera puede alcanzarse controlando el tiempo de aplicación de ultrasonidos, así como su frecuencia (Martin-Banderas et al. 2011).

4. Disrupción inducida por radiación: un uso alternativo de la radioterapia puede ser su empleo para lograr una disrupción focalizada de la BHE. La radiación produce un daño en el ADN que provoca la muerte celular y puede ser utilizada en el tratamiento de tumores cerebrales (Azad et al. 2015).

1.3.1.2 **Administración de fármacos por convección**

Este método invasivo permite la administración de agentes terapéuticos directamente en parénquima cerebral o tejido específico. Para ello, uno o más catéteres de pequeño calibre se colocan estereotácticamente en el cerebro a través de surcos perforados en el cráneo y los agentes terapéuticos son administrados a través de una bomba de microinfusión mediante presión positiva (Ratliff and Oldfield 2001).

Hoy en día, este tipo de administración requiere la optimización de las características de infusión, unas propiedades determinadas de catéter y técnicas de colocación específicas, así como un seguimiento preciso y en tiempo real de la distribución de infusiones, por lo que esta técnica no resulta confiable y reproducible (Vogelbaum and Iannotti 2012).

A diferencia de otras técnicas invasivas actualmente disponibles para la administración de fármacos al SNC, esta estrategia consigue una distribución uniforme de los fármacos cuya cantidad administrada coincide con la cantidad infundida, lo que

permite lograr una distribución más extensa de manera controlada (Stockwell et al. 2014).

1.3.1.3 Inyección intracerebral o uso de implantes

La inyección directa de fármacos en el cerebro contribuye a la disminución de los efectos adversos en tejidos periféricos no afectados, logrando la llegada directa del fármaco al lugar de acción (Tam et al. 2016).

Otra opción es la colocación de un implante biodegradable en el lugar que contiene la sustancia terapéutica. La inserción del implante debe ser lo más exacta posible ya que la difusión de fármacos se reduce con la distancia (Gabathuler 2010). Gliadel® es un implante polimérico biodegradable impregnado en carmustina, aprobado por la FDA en 2003 para el tratamiento del glioma, que se implanta en la cavidad craneal mediante cirugía y que ha demostrado ser un tratamiento seguro y eficaz en pacientes con este tipo tumor (Westphal et al. 2006).

1.3.2 Métodos no invasivos

Afortunadamente, como se ha citado con anterioridad, la BHE exhibe numerosos mecanismos de transporte que pueden ser aprovechados para mejorar la llegada de fármacos al cerebro. Dentro de este apartado, cabe citar estrategias como el empleo de profármacos, los sistemas de liberación química, el uso de vectores virales, la lipidización, la inhibición de la glicoproteína-P, o la funcionalización de sistemas nanométricos.

1.3.2.1 Empleo de profármacos

Un profármaco es una molécula inactiva o menos activa que la de partida que, tras la administración, se metaboliza, transformándose en una molécula activa capaz de ejercer una acción farmacológica (Figura 5).

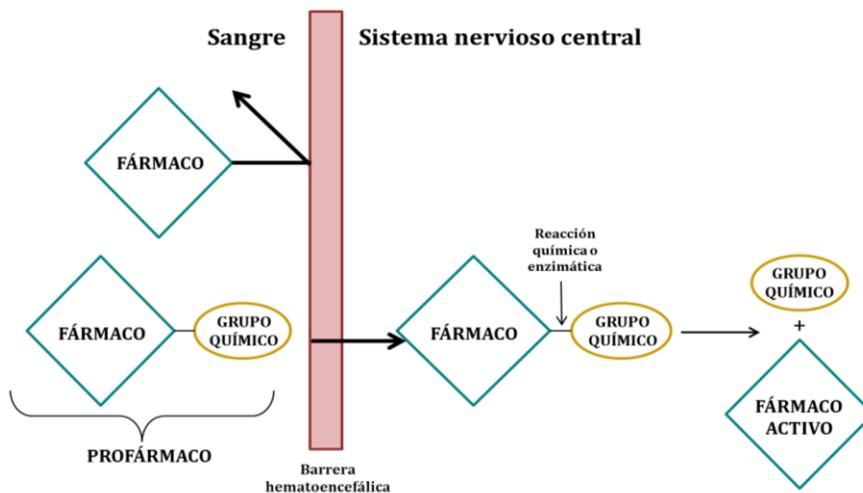


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de los profármacos a través de la BHE.

Los procesos químicos más utilizados para la conversión de profármacos en sustancias activas incluyen esterificación, desaminación de adenosina, biotransformación de fosfodiésteres y fosfotriésteres y activación de oxidasa por numerosas enzimas como el citocromo P-450 (Anderson 1996).

El empleo de profármacos genera cierta controversia que puede dar lugar a modificaciones en la toxicidad y la eficacia con respecto a la molécula original (C.-T. Lu et al. 2014).

1.3.2.2 Sistemas de liberación química

De manera análoga a los profármacos, los sistemas de liberación química son moléculas inactivas derivadas de una sustancia terapéutica activa. Sin embargo, a diferencia de los profármacos, son más específicos ya que se dirigen a la región diana donde se activan tras una serie de reacciones enzimáticas y/o químicas e incluyen dos tipos de restos químicos: un marcador que se encarga de dirigir el sistema hacia el lugar específico de acción y un “modificador” que actúa aumentando la lipofilia de la molécula primitiva (Buchwald and Bodor 2016).

Se pueden distinguir tres tipos de sistemas de liberación química: (a) sistemas fisicoquímicos enzimáticos que alteran el transporte de un lugar de acción mediante reacciones metabólicas, (b) sistemas activados por enzimas que se encuentran de manera exclusiva en el lugar de acción o que poseen mayor actividad enzimática en la región diana y (c) dependientes de la presencia de un receptor diana al que se unen de manera selectiva (Dwibhashyam and Nagappa 2008).

Se supone que, una vez atravesada la BHE, los sistemas de liberación química que hayan sufrido una transformación en moléculas hidrófilas quedarán enclaustrados y ya no podrá salir, permitiendo la liberación del fármaco únicamente en el lugar de acción (Takayoshi Yoshikawa et al. 1999).

1.3.2.3 **Uso de vectores virales**

Después de la secuenciación del genoma humano, el uso de virus como vehículos de administración de genes para el tratamiento de enfermedades neurológicas ha ganado interés en el campo de la medicina, aprovechando la capacidad nativa de los virus para infectar células (Gray, Woodard, and Samulski 2010). Los virus adeno-asociados se han utilizado ampliamente como vehículos para la transferencia de genes al SNC pero debían administrarse de manera local. Recientemente, Chan et al. han desarrollado dos cápsidas de este tipo de virus (AAV-PHP.eB y AAV-PHP.S) que se presentan como un sistema alternativo no invasivo de administración de genes al sistema nervioso, resaltando la capacidad de modulación cerebral de dichos virus para el tratamiento de enfermedades neurológicas (Chan et al. 2017).

1.3.2.4 **Lipidización de fármacos**

Uno de los factores que influyen para que las moléculas pequeñas puedan atravesar la membrana por difusión transcelular es el grado de lipofilia de la misma. Los factores que afectan a la liposolubilidad son: el peso molecular, los puentes de hidrógeno y el log P (Pavan et al. 2008). Idealmente, el intervalo de log P para que moléculas pequeñas puedan atravesar libremente la barrera debe encontrarse entre 1.5 – 2.5 (Mikitsh and Chacko 2014).

Por consiguiente, una propuesta no invasiva para mejorar la llegada de fármacos al cerebro sería aumentar el carácter lipídico de la molécula, convirtiendo los grupos funcionales polares en

grupos apolares: así fármacos solubles en agua se transforman en lipófilos (Pardridge 2002).

Uno de los ejemplos más claros es la conversión de morfina en heroína. La heroína se obtiene por la acetilación de los grupos hidroxilo- de las posiciones 3 y 6 de la morfina resultando en un compuesto 100 veces más lipófilo que la molécula original y, por lo tanto, con una mayor facilidad para atravesar la BHE (Bodor and Buchwald 1999).

1.3.2.5 **Inhibición de la glicoproteína P**

La glicoproteína P es una proteína de membrana de unos 170 kDa que tiene aproximadamente 1300 aminoácidos, formada por dos mitades similares con seis segmentos transmembrana y un lugar de unión de ATP intracelular, lo que le aporta la energía necesaria para expulsar los fármacos a la sangre (Schinkel 1999).

Principalmente, se localiza en las células epiteliales de la BHE, colon, intestino delgado, páncreas, conductos biliares, túbulos renales, glándula suprarrenal y, además, está sobreexpresada en células cancerosas (Amin 2013).

La función principal de la glicoproteína constituye un obstáculo para el tratamiento de numerosas enfermedades neurológicas, ya que, al ser resistente a un gran número de fármacos, los expulsa hacia la región apical impidiendo que se alcancen concentraciones terapéuticas de los mismos y puedan ejercer su acción (Eyal, Hsiao, and Unadkat 2009). Por tanto, la administración conjunta con fármacos inhibidores de la

glicoproteína podría resultar interesante para mejorar la eficacia de los tratamientos neurológicos aunque puede dar lugar a toxicidad y/o pérdida de especificidad (Callaghan, Luk, and Bebawy 2014).

1.3.3 Funcionalización superficial de las NPs

Entre las estrategias de carácter invasivo más estudiadas e investigadas para atravesar la BHE y, por tanto, mejorar la terapéutica del SNC, se encuentra la funcionalización superficial de los nanosistemas. Centrados en las NPs con PLGA como matriz polimérica, la variedad de ligandos a emplear es muy amplia y se pueden dividir en dos grupos principales: (i) ligandos que modulan la carga eléctrica, la hidrofobicidad, la adsorción de proteínas y el tiempo de circulación sanguínea (direccionamiento pasivo); y (ii) ligandos que interactúan directamente con receptores de la BHE (direccionamiento activo)(Cayero-Otero et al. 2018).

El direccionamiento activo ha sido estudiado por numerosos autores para asegurar la selectividad en el órgano diana que exprese el receptor específico. Una vez que el ligando se ha unido al receptor, el complejo receptor-ligando se internaliza dentro de vesículas y el receptor se recicla, volviendo a la superficie. El direccionamiento es una de las áreas más prometedoras de investigación debido a su rápida evolución y acelerado desarrollo (Lin et al. 2008)

1.3.3.1 Aptámeros

Los aptámeros son pequeñas secuencias de oligonucleótidos con 20-60 nucleótidos en una sola cadena de ADN o ARN. Se definen por su estructura tridimensional, que les permite unir moléculas diana (desde pequeñas moléculas inorgánicas a moléculas complejas) con alta afinidad y especificidad (Lakhin, Tarantul, and Gening 2013). Descritos por primera vez en 1990, su nombre está formado por dos palabras provenientes del griego: aptus, que se traduce como “encajar” y merus que significa “partícula” (Darmostuk et al. 2015). Mayoritariamente, los aptámeros suelen obtenerse por una técnica denominada SELEX o selección *in vitro* y presentan numerosas ventajas: (1) en teoría, pueden diseñarse para ser reconocidos por cualquier receptor de manera selectiva, (2) su síntesis química es altamente reproducible, (3) son más estables que las proteínas y no suelen perder su capacidad de unión, (4) poseen una baja inmunogenicidad y toxicidad y (5) gracias a su pequeño tamaño, pueden unirse a epítomos a los que no podrían acceder los anticuerpos (W. Zhou et al. 2014).

Comparado con los anticuerpos, aunque la secuencia de nucleótidos sea análoga, la síntesis de aptámeros es más barata y fácil, presentan mayor estabilidad, menor tamaño y baja inmunogenicidad y nula toxicidad (Kulbachinskiy 2007, Bouchard, Hutabarat, and Thompson 2010). Debido a esto, los aptámeros son una buena alternativa a los anticuerpos y excelentes candidatos para el direccionamiento específico de fármacos y el diagnóstico de enfermedades.

En la lucha contra el cáncer, los aptámeros pueden unirse específicamente a moléculas sobreexpresadas en células cancerosas. Para el tratamiento del glioma, las NPs pueden funcionalizarse con ligandos específicos y facilitar el acceso de los agentes quimioterápicos al tumor. Uno de ellos, llamado Gint4.T (anti-PDGFR β), conjugado en nanosistemas (Monaco et al. 2017), es un ligando capaz de unirse de forma específica y selectiva al receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β), un receptor expresado en la superficie de las células cancerosas, incluidas las células de glioma.

Otro conocido aptámero, AS1411, es rico en G (Shan 2004) y se une a la nucleolina con alta afinidad, una proteína altamente expresada en la membrana de las células cancerosas, incluidas las células C6 del glioma. Tras penetrar en la célula cancerosa, el complejo AS1411-nucleolina produce, entre otros, la inhibición de la síntesis de ADN o la inducción de la apoptosis celular (Luo et al. 2017).

Los estudios *in vitro* desarrollados por Guo y cols., demostraron que las NPs no modificadas muestran una menor asociación con las células C6 que las NPs conjugadas con el aptámero. De manera similar, la cantidad de partículas conjugadas acumuladas en el cerebro fue mayor que la de las partículas no conjugadas o el fármaco libre (J. Guo et al. 2011).

1.3.3.2 Péptidos

En los últimos años, se están estudiando nuevas moléculas peptídicas para el tratamiento de enfermedades, llamados péptidos lanzadera. Uno de los más populares es el glutatión (GSH), un tripéptido endógeno hidrófilo formado por glutamato, cisteína y glicina (G. H. Kim et al. 2015), de especial relevancia debido a su papel en los procesos de desintoxicación. Es el agente protector más importante contra los radicales libres y protege a las células frente a especies reactivas del oxígeno y xenobióticos, así como a los órganos más expuestos a los mismos (riñón, pulmón, hígado o intestino) (Koo et al. 2011).

La concentración de glutatión en el cerebro es aproximadamente 2-3 mM, va disminuyendo con el envejecimiento y puede asociarse con la aparición de enfermedades ligadas al mismo y en órganos con funciones depurativas (Valdovinos-Flores and Gonsebatt 2012).

El glutatión, ayudado por la glicoproteína-P es capaz de atravesar la BHE y es una ruta ampliamente explorada por numerosos autores para una administración eficaz de fármacos en el cerebro (G. H. Kim et al. 2015).

Acharya et al. (Acharya and Reddy 2016) estudiaron la influencia de la funcionalización de NPs de PLGA cargadas de paclitaxel para el tratamiento del cáncer cerebral. Las NPs con glutatión mostraron un direccionamiento más efectivo hacia el cerebro que las NPs no conjugadas. Del mismo modo, en un estudio similar, ambos tipos de NPs presentaban una endocitosis más alta

que la suspensión de paclitaxel. Se obtuvieron resultados similares para las NPs de PLGA cargadas con curcumina. Los resultados de captación celular (cuali- y cuantitativos) mostraron que la acumulación de NPs funcionalizadas y no funcionalizadas en el interior de las células neuronales era más alta que la del fármaco libre (Paka and Ramassamy 2016). Otros autores estudiaron la capacidad de las NPs funcionalizadas con glutatión para cruzar la BHE utilizando un modelo *in vitro* de barrera, demostrando que la penetración de NPs recubiertas de glutatión era mayor que la del compuesto sin encapsular (Grover et al. 2014).

Otros péptidos pequeños han sido empleados para mejorar el acceso al SNC. Uno de ellos es Angiopep-2 (ANG), capaz de unirse al receptor de lipoproteínas, que está sobreexpresado en células endoteliales capilares del cerebro y células tumorales malignas (Demeule et al. 2007). Las NPs de PLGA conjugadas con ANG pueden ser una plataforma prometedora para el tratamiento del glioma. Wang et al. compararon la capacidad de captación celular de NPs funcionalizadas con ANG y NPs no funcionalizadas. Los estudios *in vitro* confirmaron que las NPs modificadas superficialmente exhibían una mayor captación por las células U-87MG que las no funcionalizadas, tanto cualitativa como cuantitativamente (L. Wang et al. 2015). De manera paralela, los ensayos *in vivo* mostraron que tanto las NPs funcionalizadas como las no funcionalizadas podían atravesar la BHE, y atribuyeron la capacidad de las NPs no conjugadas a las interacciones electrostáticas inespecíficas entre la carga superficial positiva de las NPs y las células endoteliales de los capilares cerebrales.

Finalmente, se ha estudiado un pequeño péptido específico contra el receptor de Tf (TfR β)(secuencia H - Thr - His - Arg - Pro - Pro - Met - Trp - Ser - Pro - Val - Trp - Pro - OH). Los estudios *in vitro* indicaron que las NPs conjugadas con el péptido exhibieron una mejor interacción con las células endoteliales del cerebro humano (hCMEC) que las NPs no conjugadas (Gomes et al. 2017).

Más recientemente, Huang et al. (Huang et al. 2017) realizaron estudios *in vivo* con NPs de PLGA cargadas con curcumina y un inhibidor de la producción de placas A β (S1, péptido corto con la secuencia PQVGHL). Las partículas se funcionalizaron con el péptido CRT (péptido CRTIGPSVC cíclico), un péptido funcionalmente similar al hierro que se dirige al receptor de Tf que induce un cambio alostérico. Las partículas, que tenían menos de 150 nm de diámetro y presentaban valores de potencial zeta negativo, exhibieron una captación celular notablemente mejorada y una capacidad de penetración de la barrera *in vitro*; las imágenes *in vivo* confirmaron esto, y las pruebas con animales demostraron una reducción de la generación de placas A β y la disminución de la producción de gliosis, proinflamación y citoquinas.

Este péptido, fue usado también por otros investigadores para funcionalizar NPs de PLGA-PEG e intervenir en el transporte de fármacos a través de la BHE y su penetración en las células del glioma. Las partículas conjugadas mostraron que la interacción con las células C6 y BCEC mediante endocitosis fue elevada así como el paso a través de un modelo *in vitro* de BHE. Los ensayos *in vivo* a

través de imágenes en tiempo real, mostraron la acumulación de manera selectiva en el glioma (Kang et al. 2015).

1.3.3.3 Anticuerpos y otras proteínas

La superficie de los nanosistemas puede funcionalizarse con moléculas que se unen a receptores específicos presentes en la BHE a fin de mejorar su acceso al SNC. Un tipo especial de proteínas, los anticuerpos monoclonales (moléculas hidrófilas y de vida media larga), se usan conjugados en la superficie de NPs dirigidas a la BHE para unirse a ligandos específicos de la misma.

Debido a su gran tamaño (alrededor de 150 KDa), los anticuerpos no pueden atravesar la BHE mediante transcitosis mediada por adsorción. Sin embargo, pueden usarse como ligandos específicos de los receptores de la BHE, ingresando al SNC por endocitosis mediada por receptor como se describió anteriormente (J. a Loureiro et al. 2014). Esta estrategia es probablemente uno de los enfoques más eficaces para el direccionamiento de las NPs. Fornaguera et al. (C. Fornaguera et al. 2015) desarrollaron un nanovehículo dirigido a la BHE, cargado con loperamida y funcionalizado con el anticuerpo 8D3 (anticuerpo contra el receptor de Tf) como molécula diana. Después de su inyección intravenosa en la vena de la cola, los investigadores evaluaron la llegada de las NPs al cerebro midiendo el porcentaje de efectos antinociceptivos producidos por la loperamida. La loperamida, usualmente comercializada en cápsulas tradicionales para el tratamiento de la diarrea, no puede cruzar la BHE. Sin embargo, incluida en un sistema de administración nanométrico adecuado

(por ejemplo, encapsulado en NPs funcionalizadas) puede producir efectos centrales y analgesia (Tosi et al. 2007). El efecto antinociceptivo después de la administración de NPs funcionalizadas con anticuerpos fue mayor que el de las NPs no modificadas (50% frente a ~ 25%), lo que confirma la capacidad de 8D3 para actuar como un caballo de Troya a través de la BHE (C. Fornaguera et al. 2015). OX26 es un anticuerpo monoclonal de roedor que se une selectivamente a receptores de Tf presentes en las células endoteliales de los capilares cerebrales de la BHE (Monsalve et al. 2015). Este anticuerpo es capaz de unirse a un dominio extracelular del receptor y penetrar en la BHE (X. Tang et al. 2015). Carrol et al. (Carroll et al. 2010) desarrollaron NPs de PLGA cargadas con tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo), un fármaco heterocíclico neuroprotector que puede eliminar el peroxinitrito, que en asociación con otras especies reactivas puede tener un papel en trastornos neurodegenerativos como Alzheimer o Parkinson. Para mejorar la captación celular y el acceso al SNC, se prepararon NPs de PLGA-polietilenglicol (PEG) por nanoprecipitación y se funcionalizaron con OX26. Los estudios *in vitro* usando RG2 (células del glioma de rata) mostraron que las NPs modificadas superficialmente con OX26 entraron en las células de manera más eficiente que las NPs no conjugadas.

Por otra parte, Bao et al. (Bao et al. 2012), usando endomorfina como fármaco analgésico modelo, estudiaron la capacidad de un nanosistema hiperramificado modificado en la superficie con OX26. Los autores llevaron a cabo experimentos de captación de células *in vitro* en células BMEC. Los resultados

mostraron que la captación de NPs dependía tanto del tiempo como de la concentración y que la captación se produjo a través de un proceso de endocitosis caveolar. Para estudiar el cruce de la BHE después de la inyección intravenosa y usando la conjugación con OX26, los autores evaluaron el efecto analgésico de las endomorfinas usando un modelo de lesión de constricción crónica en ratas. Tras la administración intravenosa del fármaco libre no se observó ningún efecto y las NPs sin OX26 mostraron un efecto analgésico leve (debido a su pequeño tamaño). Sin embargo, las NPs con OX26 produjeron un efecto analgésico mayor y durante más tiempo.

Además de los anticuerpos, se han utilizado otras proteínas para la funcionalización de nanosistemas como las que componen la familia de las Tfs están entre las más ampliamente utilizadas como ligandos para dirigir nanosistemas al cerebro.

Las más conocidas son: (a) la Tf sérica humana presente en la sangre y otros líquidos corporales (líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, linfa, leche, bilis), (b) la ovotransferrina (ovo-Tf) de la clara de huevo, (c) la lactoferrina localizada en leche de mamíferos, lágrimas, saliva, moco y glóbulos blancos y (d) la melanotransferrina (melano-Tf), en la membrana de los melanocitos, principalmente.

A excepción de la lactoferrina (punto isoeléctrico = 8.7), el resto son proteínas ácidas con un punto isoeléctrico entre 5.6-5.8 (H. Li and Ming Qian 2002).

Concretamente, la Tf se ha estudiado ampliamente como ligando específico para mejorar la llegada de NPs al SNC a través del receptor de Tf, expresado en las células endoteliales de la BHE.

La Tf es una glicoproteína endógena de 679 aminoácidos y un peso de 79 kDa que puede penetrar en las células del endotelio cerebral por endocitosis mediada por receptor a través de los receptores de Tf presentes en las mismas (Cetin et al. 2013), aportando el hierro necesario a las células cerebrales para su metabolismo (Pahuja et al. 2015). En su estructura se diferencian hélices alfa y láminas beta que comprenden los dos dominios principales N-terminal y C-terminal. A pH fisiológico, una o dos moléculas de hierro se unen a la Tf por estos dominios principales gracias a dos tirosinas, una histidina y un ácido aspártico, siendo necesaria también la presencia de un anión (Aisen 2004).

El principal productor de Tf es el hígado (Voth et al. 2015).

Fundamentalmente, la Tf se encarga de distribuir el hierro por el organismo en forma de Fe^{3+} , aunque interviene en otras funciones como la eritropoyesis y la división celular (Cheng et al. 2004).

Mediante el empleo de ligandos contra el receptor de Tf (Tf, anticuerpos o péptidos) se puede lograr la llegada efectiva de fármacos al cerebro. En este sentido, Chang et al. (Chang et al. 2009) desarrollaron una nanoplataforma de PLGA recubierto con diferentes estabilizadores (para evitar la agregación) y demostraron que la endocitosis de las NPs conjugadas con Tf fue mayor que la de las NPs no modificadas.

En otro estudio para el tratamiento de gliomas, combinaron la funcionalización superficial con Tf y la aplicación de un campo magnético, obteniéndose las mayores tasas de captación celular usando ambas estrategias, hecho que se reproduce en el ensayo para la evaluación del transporte paso a través de la BHE utilizando un modelo de barrera *in vitro*, donde los mejores resultados se obtuvieron cuando ambas tácticas eran empleadas. Resultados *in vivo* confirman la capacidad de las NPs para atravesar la barrera, y a la inhibición más acusada del crecimiento tumoral era la producida por las NPs funcionalizadas con Tf (Cui et al. 2013).

Anteriormente nombrada, otra de las moléculas de la familia de las Tf más ampliamente usada para estos propósitos es la lactoferrina, una proteína catiónica de 80 KDa involucrada en diversas funciones fisiológicas, incluida la protección contra la infección y la inflamación (Kumari and Kondapi 2017). Como ocurre con la Tf, es una buena opción para el tratamiento del glioma porque su receptor está sobreexpresado en células tumorales así como en las células endoteliales del cerebro, y es capaz de atravesar la BHE, empleándose para mejorar el acceso cerebral de numerosas drogas.

Hu et al. (Hu et al. 2011) estudiaron el desarrollo de una nueva nanoplataforma para el tratamiento del Parkinson, bioconjugando lactoferrina a la superficie de NPs de PLGA-PEG.

Este estudio demostró que, tras la inyección en la vena caudal del ratón, el porcentaje de acumulación de NPs con lactoferrina en la corteza, la sustancia negra y el cuerpo estriado

era más alto que el de las NPs simples. Los estudios farmacocinéticos mostraron un aumento de aproximadamente 2,5 veces del área bajo la curva (AUC) de las NPs con lactoferrina en comparación con las NPs sin lactoferrina. Al respecto, investigaciones de la Universidad de Yantai (China), a través de estudios cualitativos y cuantitativos, demostraron que la captación celular del conjugado nanopartícula-lactoferrina en células 16HBE y SH-SY5Y era mayor que la de las NPs sin lactoferrina (Bi 2016). Además, mostraron que la acumulación cerebral de NPs funcionalizadas era mayor que la de las no funcionalizadas después de la administración intranasal para el tratamiento del Parkinson. En este caso, la región del cerebro con la mayor concentración de partículas fue el cuerpo estriado, una de las áreas directamente involucradas en las alteraciones motoras que caracterizan a esta enfermedad.

Lalani et al. compararon el comportamiento farmacodinámico *in vivo* de NPs funcionalizadas con Tf o lactoferrina después de la administración intravenosa. Los autores evaluaron el efecto antinociceptivo (analgésico) de NPs no recubiertas y funcionalizadas cargadas con tramadol. Demostraron que las NPs con lactoferrina en la superficie se acumulaban en el cerebro en cantidades más altas que las NPs con Tf, y demostraron que el efecto nociceptivo de las NPs funcionalizadas era más alto que el de las no funcionalizadas. Además, la duración del efecto terapéutico de las NPs conjugadas fue superior en todo momento en comparación con las NPs no conjugadas. Por otro lado, la conjugación con lactoferrina resulta más efectiva que con

trasferrina, posiblemente debido a la baja concentración de lactoferrina en plasma, evitando la inhibición competitiva de las NPs conjugadas con la lactoferrina fisiológica. Las NPs funcionalizadas con ambas proteínas están siendo desarrolladas por numerosos investigadores para el tratamiento de diferentes enfermedades (Kumari and Kondapi 2017). Se espera que este tipo de nanosistemas mejore el acceso de los fármacos al SNC y que puedan ser utilizados para llevar al cerebro las sustancias terapéuticas que no son capaces de atravesar la BHE por sí solas.

Finalmente, la albúmina de suero bovino catiónico (CBA) es una proteína capaz de interactuar con las membranas de la barrera hematoencefálica, facilitando el transporte de nanovehículos a través de la misma gracias a la endocitosis adsorptiva (Cabezón et al. 2015). Las nanoplataformas PLGA conjugadas con CBA exhibieron una transcitosis rápida en comparación con las NPs no funcionalizadas cuando se usan para el tratamiento de tumores cerebrales (Kesharwani et al. 2016)(W. Lu et al. 2006).

1.3.3.4 **Polímeros**

Se han empleado algunos polímeros para reducir la naturaleza lipofílica de algunas NPs. Uno de los polímeros más estudiados es el polisorbato 80, también conocido como Tween® 80, un tensioactivo no iónico hidrófilo que puede atravesar la BHE y transportar NPs al lado luminal mediante diversos mecanismos (Prabhakar et al. 2013). Varios estudios *in vivo* han demostrado la capacidad de las NPs de PLGA modificadas con Tween® 80 para cruzar la BHE. Las NPs se desarrollaron para numerosas

enfermedades como el cáncer de cerebro (A. Jain et al. 2015), los trastornos neurodegenerativos (Jose et al. 2014) y la depresión (Yusuf et al. 2016). En todos los casos, las NPs recubiertas con el polímero pudieron cruzar la BHE de manera más eficaz que las no recubiertas.

Poloxamer 188 (Pluronic® F-68, un copolímero tribloque no iónico) es otro de los polímeros empleados para funcionalizar NPs que puede mejorar la permeabilidad de los medicamentos, ya que es un inhibidor de la glicoproteína P (Apte 2010).

En un estudio para comparar la efectividad de Tween® 80 y Pluronic® F68 en el recubrimiento de NPs poliméricas para mejorar el acceso al SNC, los investigadores desarrollaron nanosistemas recubiertos con cada uno de estos polímeros para transportar dos fármacos, loperamida y doxorubicina (Gelperina et al. 2010). Como ambos fármacos son sustratos de la glicoproteína P, se espera que no alcancen niveles terapéuticos en el cerebro en su forma libre. Los resultados mostraron que cuando los fármacos se encapsulaban en NPs de PLGA, ejercían efectos terapéuticos en el SNC. Sin embargo, los resultados fueron diferentes para las NPs de PLGA recubiertas con Tween® 80 y Pluronic® F68, siendo la primera más efectiva que la última, mostrando un mayor efecto analgésico para la loperamida y un mayor efecto antitumoral en el caso de la doxorubicina.

Para evitar la opsonización de las NPs y aumentar su tiempo de circulación sanguínea, el método tradicional utilizado es recubrir la superficie de las NPs con polietilenglicol (PEG) en un

proceso llamado PEGilación. Este polímero hidrófilo y no iónico tiene numerosas ventajas, que incluyen baja toxicidad (excelente biocompatibilidad) y baja inmunogenicidad. Además, la PEGilación aumenta la hidrofiliidad de las NPs, haciéndolas menos reconocibles por el sistema reticuloendotelial y, por consiguiente, el tiempo de circulación de los nanosistemas (Martin-Banderas et al. 2013). Sin embargo, la PEGilación tiene algunas limitaciones porque las cadenas de PEG pueden adoptar diferentes configuraciones en la superficie de las NPs dependiendo de su densidad (Amoozgar and Yeo 2012). Cuando la densidad de moléculas de PEG en la superficie es baja, adopta la denominada "configuración de setas", con un amplio rango de acción. Por el contrario, la alta densidad de moléculas de polímero produce la denominada "configuración de cepillo", con un rango de movimiento restringido (Owens and Peppas 2006). Actualmente, el poli-glicerol hiperramificado (HPG) está reemplazando al PEG porque tiene muchas ventajas. Específicamente, el HPG es más hidrófilo que el PEG y la estructura hiperramificada disminuye la adsorción porque cubre la superficie de las NPs mejor que las cadenas de PEG (Yeh et al. 2008). Finalmente, se pueden unir múltiples ligandos a HPG debido a sus numerosos grupos hidroxilo (la presencia de grupos hidroxilo es significativamente más alta que en PEG) (Y. Deng et al. 2014). Puede lograrse una liberación controlada del fármaco con un reemplazo parcial de grupos hidroxilo por grupos apolares (Carroll et al. 2010)(Bickel, Yoshikawa, and Pardridge 2001).

En cuanto a la carga eléctrica superficial, las moléculas con carga positiva pueden unirse a cargas negativas de lectinas extracelulares o a la membrana de células endoteliales; las moléculas policatiónicas normalmente cruzan la BHE por endocitosis mediada por adsorción, un sistema de transporte no específico basado en interacciones de carga. El quitosano trimetilado es un tipo especial de quitosano, una molécula cuaternizada, hidrófila y no tóxica con carga positiva en condiciones fisiológicas. Debido a su carga positiva en el organismo, este ligando catiónico es un excelente agente para el “direccionamiento” cerebral de fármacos por endocitosis mediada por adsorción (Z. H. Wang et al. 2010).

1.3.3.5 Doble funcionalización

En los últimos años, numerosos investigadores han implantado una nueva tendencia que consiste en la funcionalización dual de las NPs para mejorar su efecto terapéutico. El objetivo de la doble funcionalización es, de inicio, mejorar el paso a través de la BHE y, seguidamente, trasladar los nanosistemas a las células.

Como se describió previamente, ANG-2 (peso molecular de 2,4 KDa) es un ligando específico para los receptores de lipoproteínas que pueden cruzar la BHE a través de endocitosis mediada por receptor (Demeule et al. 2007). Al respecto, Huile et al. desarrollaron un nuevo nanosistema de PLGA doblemente empleando ANG-2 para facilitar el transporte a través de la BHE y EGFP-EGF1 para dirigir las NPs a las células neurogliales

(involucradas en numerosas enfermedades del SNC). EGFP-EGF1 es una proteína de fusión análoga del Factor VII de la cascada de coagulación, capaz de unirse a factores tisulares evitando la formación de trombos (Zhang et al. 2016).

Los estudios *in vitro* demostraron que la funcionalización dual es más efectiva porque mejora el acceso en dos pasos: primero, la funcionalización con Angiopep-2 mejora la penetración a través de la barrera y, en segundo lugar, la funcionalización con EGFP-EGF1 permite una mejor entrada en las células neurogliales (Huile et al. 2011). Asimismo, estos autores diseñaron otra nanoplateforma para el tratamiento del glioma valiéndose de esta misma táctica. Emplearon un péptido pequeño llamado TGN (molécula péptidica de 12 aminoácidos con la secuencia TGNYKALHPHNG) para aumentar la llegada al cerebro de NPs y el aptámero AS1411, que permitió (como se describe previamente) un mayor efecto antitumoral uniéndose a nucleolina, una fosfoproteína del nucleolo implicada en la síntesis y maduración de ribosomas y altamente expresada en células de glioma (Gao et al. 2012). Para proporcionar un mejor tratamiento del glioma, Kuo et al. (Kuo and Chen 2015) desarrollaron otro sistema de funcionalización dual mediante el uso de lactoferrina (como primer ataque) y ácido fólico, cuyo receptor está sobreexpresado en células cancerosas.

Como último ejemplo, Loureiro et al, expusieron un sistema de doble funcionalización para el tratamiento de Alzheimer basado en el uso del anticuerpo OX26, capaz de unirse al receptor de Tf presente en la barrera, y DE2B4, un anticuerpo contra el péptido

A β (J. A. Loureiro et al. 2016) aportando un novedoso sistemas para el tratamiento de esta enfermedad.

1.3.4 *Nose-to-brain*

Como se ha citado con anterioridad, la principal limitación que existe en el tratamiento de las enfermedades neurológicas es la presencia de la BHE, que restringe el acceso de la mayoría de las moléculas terapéuticas al SNC, imposibilitando el tratamiento de numerosos desórdenes que afectan al cerebro.

En este sentido, mediante una administración vía intranasal, la ruta *nose-to-brain* es considerada como una posible estrategia de administración de fármacos que permite la liberación de activos de manera rápida y eficaz en el SNC.

El interés de esta vía de administración reside en la alta vascularización y porosidad de su epitelio, la amplia superficie disponible para una pronta absorción, un rápido inicio de la acción con una mayor permeabilidad a un mayor número de compuestos que la mucosa intestinal. Todo esto debido fundamentalmente a la falta de enzimas pancreáticas y gástricas, el pH neutro del moco y la posibilidad de evitar tanto el metabolismo de primer paso como la BHE (Pardeshi and Belgamwar 2013).

Por todo ello, es considerada como una alternativa real para la administración de numerosos agentes terapéuticos de acción sistémica con baja disponibilidad y/o con un inicio de la acción no deseable, y podría explotarse como una vía no invasiva muy prometedora de administración en el SNC para sustancias que no

atraviesan la BHE (Djupesland, Messina, and Mahmoud 2014). Sin embargo, el aclaramiento mucociliar provoca que la absorción y el tiempo de residencia del fármaco sean escasos, inconvenientes que pueden ser solventados con el empleo de nanosistemas de administración de fármacos que protegen al fármaco de la degradación dentro de la cavidad (Gartziandia et al. 2016).

Desarrollada por Frey en 1989, la administración intranasal es rápida (Hanson, Frey, and II 2008) y los fármacos alcanzan el cerebro en una cantidad significativa a través de los nervios trigémino y olfatorio evitando así la barrera hematoencefálica.

En líneas generales, la nariz se encarga de preparar el aire que se inhala para que llegue de manera adecuada a las vías respiratorias, filtrándolo, calentándolo y humedeciéndolo (Illum 2003). Además, la secreción de mucosa aporta inmunidad frente a bacterias y virus y está compuesta esencialmente por agua (95%) además de mucina, sales, proteínas y lípidos en menor proporción. Proporciona un leve pH ácido (pH 5.5-6.5), y de manera adicional, cumple otras funciones como la protección enzimática y física, la retención de agua o posibilitar el aporte de calor, entre otros (Alagusundaram et al. 2010).

De forma resumida, la cavidad nasal está dividida en dos mitades independientes longitudinalmente por el tabique nasal y se extiende desde las fosas nasales hasta la nasofaringe (aproximadamente 12-14 cm), ocupando una superficie alrededor de 150 cm² y con un volumen total de 15-20 mL (Ghori et al. 2015). Principalmente, la cavidad está compuesta de tres regiones:

vestíbulo nasal, región olfativa y región respiratoria. En humanos, el vestíbulo tiene una superficie de 0,6 cm², seguida de la región olfativa que ocupa 15 cm², un 10% de la superficie nasal mientras que en roedores representa alrededor del 30%.

El vestíbulo es la zona más externa de la nariz. En esta región, la absorción de fármacos es muy escasa debido a la existencia de vibrisas que actúan como filtros y la presencia de un recubrimiento epitelial escamoso y queratinizado (Pires et al. 2009).

El resto de la cavidad nasal comprende la región respiratoria cuyas paredes se encuentran plegadas subdividiéndose en tres cornetes: superior, medio e inferior (Illum 2004). Dicha región se considera el sitio principal de absorción de fármacos hacia la circulación sistémica y está constituida por la lámina propia y la membrana basal que soportan el epitelio, cambiante a medida que se profundiza en la cavidad. Inicialmente, un epitelio escamoso se torna a epitelio de transición y, por último se convierte en epitelio pseudoestratificado (o respiratorio) formado por cuatro tipos diferentes de células: células no ciliadas, ciliadas, caliciformes y basales. Las células ciliadas y no ciliadas poseen microvellosidades que aumentan considerablemente la superficie de absorción y las ciliadas están recubiertas por cilios que, con su movimiento transportan el moco hacia la faringe (Illum 2000).

La región olfativa, localizada en la parte más alta de la cavidad nasal, es la única zona del sistema nervioso central

expuesta al exterior (Charlton et al. 2007). Las células olfatorias del neuroepitelio comienzan en el bulbo olfatorio del sistema nervioso central y se extienden hasta el epitelio olfativo lo que supone un contacto directo del exterior y el cerebro, permitiendo el transporte de fármacos a través del nervio trigémino y olfatorio (Wu, Hu, and Jiang 2008).

El mecanismo de llegada de los fármacos al cerebro a través de la nariz todavía no está completamente dilucidado y sigue siendo investigado; sin embargo, se sabe que tanto el nervio olfatorio como las vías nerviosas del trigémino estarían involucradas y que podría producirse por vía intracelular o extracelular (Lochhead and Thorne 2012)(Figura 6).

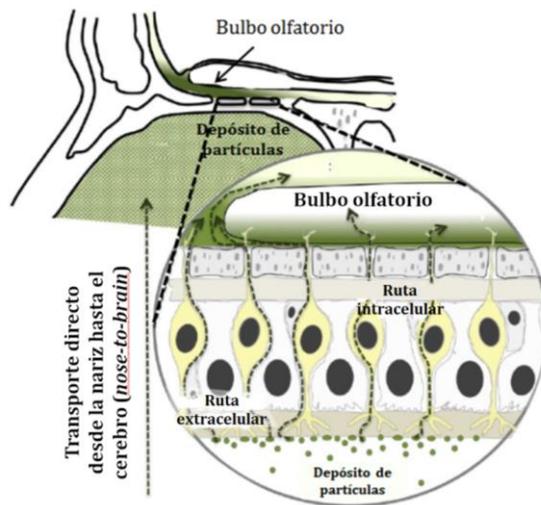


Figura 6. Representación esquemática de las rutas de acceso al sistema nervioso central por vía intranasal (*Nose-to-brain*) (Stützle et al. 2015)

Parece que la administración intranasal es una combinación de diferentes rutas (Stützle et al. 2015). De manera generalizada, tras una inspiración profunda de las NPs a través un dispositivo

adecuado, las partículas pueden seguir tres caminos diferentes: (I) entrada directa en la circulación sistémica desde la cavidad nasal, (II) entrada en el bulbo olfatorio a través de las neuronas y (III) llegada directa al cerebro vía nervio trigémino (Kumar, Pandey, and Jain 2016). Por lo tanto, el transporte directo de los fármacos a lo largo de los nervios olfatorio y trigémino se considera cada vez más una ruta no invasiva prometedora.

Varios tipos de moléculas (moléculas pequeñas y grandes) y de células han alcanzado el cerebro con éxito a través de esta vía intranasal (Lochhead and Thorne 2012). Cabe mencionar la insulina (Tiedemann et al. 2017)(Ramos-Rodriguez et al. 2017)(Brabazon et al. 2017)(Bell and Fadool 2017), neurotrofinas (como el factor de crecimiento nervioso)(Chou et al. 2017)(Malerba et al. 2011)(Vaka et al. 2013)(Herran et al. 2014), eritropoyetina (A. Merelli, Czornyj, and Lazarowski 2015)(Amalia Merelli, Czornyj, and Lazarowski 2013)(Rodríguez Cruz et al. 2016), benzodiazepinas (Botner and Sintov 2011)(Inokuchi et al. 2015) y células madre (Danielyan et al. 2011).

Sin duda, el rápido progreso de la medicina es prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que proporciona un nuevo enfoque para el control de la liberación de activos viejos y nuevos. De hecho, la combinación de la nanotecnología y la administración intranasal se está volviendo más atractiva en los últimos años (Goldsmith, Abramovitz, and Peer 2014)(Shah, Yadav, and Amiji 2013)(Samaridou and Alonso 2018).

Es conveniente enfatizar la utilidad de las NPs de PLGA dirigidas al cerebro vía intranasal como una de las nanoformulaciones más prometedoras.

Recientemente, Bonaccorso et al. (Bonaccorso et al. 2017) compararon la capacidad de las NPs de PLGA y quitosano para llegar al cerebro tras una administración intranasal en ratas. Para ello, las NPs se marcaron con rodamina y su ubicación fue determinada por microscopía de fluorescencia. Los experimentos revelaron que ambas NPs, con diámetro similar pero una carga superficial opuesta, llegaron al cerebro y persistieron en el mismo durante 48 h. Las NPs de PLGA con carga negativa llegaron al cerebro a través de la vía olfativa, mientras que las vías nerviosas del trigémino fueron las involucradas en el caso de las NPs de quitosano cargadas positivamente.

En algunos casos, con la administración intranasal se obtienen efectos iguales a los resultados alcanzados tras una administración por vía intravenosa. Por ejemplo, Sekerdag et al. (Sekerdag et al. 2017) diseñaron una nanopartícula híbrida de lípido-PLGA cargada con ácido farnesil-tiosalicílico para el tratamiento del glioma. Después de un tratamiento por un período de 5 días por administración intravenosa o intranasal a las ratas Wistar, observaron que las dos rutas de administración produjeron una reducción importante y similar del tumor. Estos resultados apoyan la utilidad potencial de la administración intranasal como un novedoso método no invasivo en el tratamiento de glioma.

A veces, moléculas prometedoras para el tratamiento de una cierta enfermedad resultan ser inútiles y fallan de manera decepcionante. Este fue el caso del tarenfubril, un compuesto con grandes expectativas de modular la actividad de la enzima gamma-secretasa, clave en la formación del péptido beta amiloide, implicada en la enfermedad de Alzheimer. Probablemente, la escasa capacidad de penetración del fármaco condujo al fracaso de su empleo para el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa. Con el resurgir de la nanomedicina, el tarenfubril ha vuelto a emplearse recientemente, encapsulado en NPs de PLGA o NPs sólidas lipídicas. Para ambas formulaciones, el diámetro de los nanosistemas era inferior a 200 nm, lo que facilita el transporte transcelular a través de los axones olfativos (Muntimadugu et al. 2016). Los investigadores del estudio descubrieron que ambas se dirigían al cerebro de manera exitosa, siguiendo la ruta olfatoria tras una administración intranasal, aunque las formuladas con PLGA fueron más efectivas tanto para el direccionamiento hacia el SNC como para la cantidad de fármaco vehiculizado.

La administración de agentes neuroprotectores al cerebro también está tomando una consideración relevante. Xiao et al. (Xiao et al. 2016) desarrollaron una formulación de timoquinona, encapsulada en NPs de PLGA-quitosano para evaluar su eficacia en un modelo de isquemia en roedores después de ser administradas vía intranasal. La timoquinona es un producto natural derivado de la especie *Nigella sativa* que exhibe propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas pero que presenta una biodisponibilidad muy

reducida. Los autores demostraron una reducción significativa de la isquemia y una mejora del perfil farmacocinético del fármaco en el cerebro. Los ensayos bioquímicos también mostraron una reducción de la peroxidación lipídica, un incremento de glutatión, catalasa y superóxido dismutasa en el cerebro, lo que sugiere el potencial de las NPs de PLGA-quitosano para ser utilizadas como vehículo para la liberación de fármacos en el cerebro.

Otros investigadores estudiaron la posibilidad de emplear las NPs administradas vía intranasal como transportadores de sustancias terapéuticas con actividad antiepiléptica. En este sentido Sharma et al. (Sharma et al. 2016) encapsularon el midazolam en NPs de PLGA radiomarcadas con Tc-99m para evaluar la biodistribución de las mismas tras ser administradas vía intranasal e intravenosa a ratas Sprague-Dawley. Las imágenes de gammacámara y la relación de captación en sangre/cerebro, indicaron un mayor direccionamiento cerebral de estos nanosistemas después de una administración intranasal.

Cabe señalar el empleo de NPs de PLGA funcionalizadas superficialmente para ser administradas por esta vía no invasiva. En este sentido, Bi et al, encapsularon rotigotina (un agonista dopaminérgico usado para el tratamiento del Parkinson) en NPs de PLGA PEGiladas y funcionalizadas con lactoferrina. Tanto las funcionalizadas como las no funcionalizadas mostraron una liberación sostenida del fármaco durante 48 h. Los estudios *in vivo*, demostraron que la llegada al cerebro de rotigotina tras una administración intranasal tuvo una distribución heterogénea, con una mayor concentración en el cuerpo estriado, la región

primordial afectada en el Parkinson. Sin embargo, la administración del fármaco fue mucho más efectiva cuando se emplearon las NPs funcionalizadas con lactoferrina (Bi 2016).

1.4 VENLAFAXINA (VLX) COMO FÁRMACO MODELO

Usada en este estudio como fármaco modelo, la VLX ((Clorhidrato de-1-[(2-dimetilamino)-1-(4-metoxifenil) etil] ciclohexanol)) es un fármaco de tercera generación para el tratamiento de la depresión y la ansiedad (Panahi and Alaei 2014) que se presenta como un sólido blanco de naturaleza cristalina, muy soluble en agua (S. Jain and Datta 2014). Es un antidepresivo de acción dual que inhibe selectivamente la recaptación neuronal de serotonina y norepinefrina (ISRN), aumentando los niveles de los neurotransmisores en el espacio sináptico (Madrakian et al. 2015).

La VLX sufre metabolismo hepático por la acción de la isoenzima CYP2D6 transformándose en O-desmetilvenlafaxina, ambos compuestos bicíclicos (Dziurkowska and Wesolowski 2013). Tras una administración oral, muestra numerosas limitaciones ya que presenta un inicio lento de acción, una biodisponibilidad pobre (40-45%)(Haque et al. 2014) y necesita ser administrada de manera frecuente para mantener los niveles terapéuticos, ya que también posee una corta vida media (4-5 h) (Pund, Rasve, and Borade 2013).

Es una de las sustancias terapéuticas más ampliamente usadas como fármaco antidepresivo; sin embargo, después de la administración oral, presenta efectos secundarios no deseables

como náuseas, estreñimiento, debilidad, somnolencia, insomnio, taquicardia, dolor de cabeza, fatiga y sequedad bucal (J. Tang et al. 2012). Como inconveniente añadido, se cree que el fármaco es un inductor de la glicoproteína P, lo que provoca el eflujo del mismo hacia el lado apical de la membrana hematoencefálica (Ehret et al. 2007)(O'Brien et al. 2012).

Aprobada en 1993 por la FDA como el primer ISRN para el tratamiento del trastorno depresivo mayor (TDM), en la actualidad está disponible en más de 90 países (Watanabe et al. 2018). La dosis diaria de VLX puede variar entre 75 y 375 mg en función del tipo de formulación administrada (Harrison, Ferrier, and Young 2004) y está comercializada como una mezcla racémica de las formas enantioméricas S - (+) y R- (-) en cantidades iguales (Dziurkowska and Wesolowski 2013).

En el mercado, está disponible bajo dos formulaciones de administración: formas de liberación inmediata (37.5, 50 y 75 mg) y sistemas de liberación controlada (75, 150 y 225 mg ("Venlafaxina" n.d.). Como se ha citado anteriormente, posee una vida media corta y debe ser administrada entre 2 y 3 veces al día para mantener las concentraciones en el intervalo terapéutico. Ello desemboca en el incumplimiento del tratamiento por parte del paciente y, por ello, la formulación de liberación controlada surge como una alternativa para aumentar la tolerancia del paciente y mejorar el beneficio/riesgo con respecto a las formas de liberación inmediata (H. A. Patel et al. 2011). Sin embargo, las presentaciones de liberación retardada siguen provocando numerosos efectos secundarios y por ello, numerosos autores han estudiado la

posibilidad de incorporarla en nuevos sistemas de administración (entre los que se incluyen sistemas nanométricos) que resuelvan los inconvenientes que presenta (Y. Zhou et al. 2015)(Aranaz et al. 2017)(J. Tang et al. 2011)(Panahi and Alaei 2014)(J. Tang et al. 2012).

En cuanto al impacto económico de la molécula, un amplio estudio realizado por los investigadores Baca y Rubio-Terrés demostraron que, comparados con otros IRSN y con antidepresivos tricíclicos (ATC), el coste del tratamiento con la VLX fue menor, hecho que se puede atribuir a la disminución de los costes por los fracasos terapéuticos (Baldomero 2006).

2 OBJETIVOS

En la actualidad la nanotecnología aplicada al ámbito farmacéutico se considera una ciencia emergente y próspera para el desarrollo de nuevos sistemas de administración que cubran las limitaciones de las formas de dosificación consideradas tradicionales, ya que esta disciplina innovadora posibilita modos de administración de moléculas activas muy novedosos a través del desarrollo de sistemas de tamaño nanométrico de manera muy controlada. En este contexto, la presente Tesis Doctoral está focalizada en el desarrollo de nanosistemas que permitan la administración controlada de fármacos para el tratamiento de enfermedades del SNC, circunstancia que implica un reto considerable debido a la enorme dificultad que presenta la mayoría de fármacos para acceder a este compartimiento del organismo.

De forma más concreta, la presente Tesis Doctoral, encuadrada en esta ciencia novedosa, tiene como **OBJETIVO GENERAL** el desarrollo de un sistema polimérico de tamaño nanométrico biodegradable y biocompatible, dirigido a posibilitar la liberación de fármacos en el SNC, hecho que se ve limitado principalmente por la presencia de la BHE. Para este trabajo se usa un antidepresivo de acción dual, la VLX, a modo de fármaco hidrófilo modelo.

Para cumplir con el objetivo general expuesto, se plantean los siguientes **OBJETIVOS PARCIALES**:

1. Optimizar un método de encapsulación de fármacos hidrófilos a través de estudios de caracterización tecnológica

de los sistemas elaborados. Para ello se pretende conseguir lo siguiente:

- 1.1 Asegurar un tamaño en torno a 200 nm en partículas con forma esférica, monodispersas y reproducibles, que posibilite la llegada de las partículas al cerebro.
- 1.2 Controlar valores de carga eléctrica superficial de las nanopartículas que aseguren su estabilidad y eviten su agregación.
- 1.3 Conseguir una eficacia elevada de encapsulación del fármaco a estudiar.
2. Desarrollar un método de funcionalización superficial eficiente de las nanopartículas, con objeto de dirigir las hacia un órgano/tejido específico.
3. Estandarizar las condiciones de la liofilización para garantizar la estabilidad e integridad de los nanosistemas.
4. Lograr un control temporal de la liberación del que mejore el comportamiento biofarmacéutico con respecto a las formas tradicionales de administración.
5. Garantizar la estabilidad de las NPs en un medio que simule el LCR.
6. Desarrollar estudios celulares *in vitro* usando células endoteliales de la barrera hematoencefálica para:
 - 6.1 Determinar la seguridad toxicológica de las partículas a través de un ensayo de viabilidad celular.
 - 6.2 Conseguir una interacción celular mejorada cuando se emplean partículas funcionalizadas con ligandos específicos a través de ensayos cuali- y cuantitativos.

- 6.3 Establecer y desarrollar un modelo celular monocapa *in vitro* de barrera hematoencefálica para estudiar la permeabilidad del fármaco y las nanopartículas.
7. Analizar el acceso de las partículas al SNC a través de estudios *in vivo* de biodistribución en el organismo tras una administración intravenosa y a través de la ruta *nose-to-brain* (tras una administración intranasal), de las NPs con ratones de la cepa C57/bl6.

3 HIPÓTESIS

El fracaso en el tratamiento de las enfermedades de tipo neurológico está motivado, principalmente por la incapacidad que presentan la mayor parte de las moléculas activas para atravesar la BHE. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de administración que posibiliten el acceso de los activos al sistema nervioso central.

La hipótesis inicial de este trabajo se sustenta en la capacidad de los sistemas nanométricos de atravesar la BHE, controlando de manera muy exhaustiva sus propiedades. Cabe esperar que, debido a su tamaño y propiedades físicas definidas, los sistemas nanométricos atraviesen la barrera y accedan a sitios inalcanzables para sistemas tradicionales. Adicionalmente, la funcionalización de las NPs con ligandos específicos podría traducirse en un aumento en la internalización de las mismas en el cerebro tras un proceso de endocitosis mediada por receptor. Así mismo, el empleo de la vía intranasal para la ruta (*nose to brain* de

administración de fármacos aportaría una nueva ventaja para el acceso cerebral, ya que las partículas accederían a través de los nervios olfatorio y/o trigémino evitando el cruce a través de la BHE.

Concretamente, en los estudios celulares *in vitro*, cabe esperar un aumento de la internalización celular cuando las partículas son funcionalizadas con un ligando específico de receptores presentes en las células endoteliales que conforman la BHE, comparadas con las NPs no funcionalizadas, debido a la expresión del receptor específico en las células endoteliales de la barrera.

En cuanto a los estudios *in vivo* y en base a la literatura científica publicada, tras una administración intravenosa cabe esperar que aquellas NPs funcionalizadas con ligandos específicos alcancen el SNC con mayor facilidad tras una endocitosis mediada por receptores específicos de la BHE comparadas con las no funcionalizadas. En cuanto a la vía intranasal, se espera un mayor acceso de nanopartículas con un diámetro inferior a 200 nm, límite de tamaño establecido para el acceso al sistema nervioso central a través de los nervios olfatorio y/o trigémino.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Reactivos

Para todos los ensayos realizados se han utilizado los siguientes compuestos:

Como polímeros para la matriz básica de las NPs; ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico), un copolímero del ácido láctico y glicólico (Resomer® 504H, PLGA 50:50) con terminación en ácido carboxílico fue obtenido de Evonik (Essen, Alemania) y PLGA funcionalizado con cadenas de polietilenglicol de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.).

VLX, empleada como fármaco modelo, la Tf para la funcionalización de las NPs, el reactivo N-Hidroxisuccinimida (NHS) así como los fluoróforos usados, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Nile Red (NR) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.); El otro ligando utilizado para la funcionalización superficial de las NPs, el TfRp fue obtenido de AnaSpec (California, EE.UU.). El kit para la cuantificación de proteínas (BCA) se obtuvo de ThermoScientific (Massachusetts, EE.UU.).

El tensioactivo usado, alcohol polivinílico (PVA), el reactivo EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, los disolventes (calidad HPLC), acetato de etilo, y dimetilsulfóxido (DMSO) y sales empleadas para la preparación de la fase móvil del HPLC (Fosfato monopotásico y fosfato dipotásico) fueron adquiridos en Panreac

Química (Barcelona, España) y el acetonitrilo con calidad HPLC se obtuvo de VWR.

El agua utilizada en los experimentos fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Merck Millipore, Massachusetts, EE.UU.).

Cultivos celulares

Para los experimentos celulares, las células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (línea celular hCMEC/D3) fueron amablemente donadas por el grupo de investigación del Dr. Sarmiento (Instituto de Investigaçao e Innovaçao em Saúde, i3s, Universidade do Porto, Portugal). El medio de cultivo basal (EBM-2) se obtuvo de Lonza (Basilea, Suiza) y fue suplementado con suero fetal bovino inactivado (FBS) adquirido de Biowest (Missouri, EE.UU.), penicilina/estreptomicina, hidrocortisona, ácido ascórbico, HEPES y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) que se obtuvieron de Sigma-Aldrich y concentrado lipídico químicamente definido (CD lipid concentrate) de Gibco, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE.UU.).

Triton® x-100®, Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (reactivo MTT) y paraformaldehído (PFA) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). La solución de colágeno tipo I de la cola de rata (Gibco) y el colorante fluorescente de ADN, Hoechst® 33342 (Invitrogen) se adquirieron de Thermo Scientific (Massachusetts, EE.UU.).

Animales

En los ensayos experimentales *in vivo* para estudiar la llegada de las partículas al cerebro tras administración intravenosa desarrollados en la Universidad de Verona (Italia) se usaron ratones adultos C57bl/6 machos adultos (3-6 meses) derivados de la colonia de cría de las instalaciones de animales de la Facultad de Medicina de la propia universidad. Como anestésico se empleó 2,2,2-tribromoetanol.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Verona (CIRSAL) y se realizaron siguiendo los "Principios de cuidado de animales de laboratorio" (publicación NIH No. 86-23) con el fin de minimizar el número de animales utilizados y para evitar su sufrimiento. Además, los experimentos se llevaron a cabo bajo la autorización ética del Ministerio de Salud italiano, en estricto cumplimiento de las directivas del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/CEE) y las directrices ARRIVE.

Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar (temperatura y humedad) y un ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h y acceso libre a alimentos y agua.

Para los estudios en animales desarrollados en la Universidad de Sevilla (estudios de biodistribución *in vivo* tras administración intranasal), se emplearon ratones de la cepa C57BL/6J. Ketamidol (ketamina, 100 mg/mL)(Laboratorios Richter Pharma, Wels, Austria) y Sedín (hidrocloruro de

medetomidina, 1mg/mL)(Laboratorios Calier, Barcelona, España) fueron empleados como anestésicos.

Los experimentos desarrollados fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Experimental de la Universidad de Sevilla. El proyecto autorizado por la Junta de Andalucía con número 20/03/2017/046, cumplió los requisitos para la investigación con animales experimentales de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea (2012/707/UE) y con el artículo 41.1 del RD 53/2013 de la normativa española para el uso de animales de laboratorio.

Ratones C57bl/6 de 3-4 semanas de vida (machos y hembras) con un peso comprendido entre 18-20 g. Los animales fueron tratados humanamente y se alojaron en jaulas específicas en el animalario de la Facultad de Farmacia con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y acceso libre a alimentos y agua a una temperatura constante de $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparación de las NPs

La elección de un método de preparación de NPs depende principalmente de la solubilidad del fármaco a encapsular y de la aplicación final (M. Li, Rouaud, and Poncelet 2008).

La técnica de evaporación del disolvente de una emulsión ofrece gran versatilidad a la hora de incorporar el activo, ya que permite encapsular activos tanto hidrófilos como lipófilos. Sin

embargo, para fármacos hidrófilos que se pretenden encapsular en una matriz lipófila, esta técnica no resulta tan eficiente ya que pueden producirse pérdidas de la sustancia activa disuelta en la fase acuosa externa por difusión (Iqbal et al. 2015). Para solventar este problema, se emplean emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$), en la que el fármaco hidrófilo va disuelto en una fase acuosa interna (W_1) (Ibraheem et al. 2014).

Cuando se trata de fármacos poco solubles en agua o insolubles, generalmente se emplea una emulsión simple de fase externa acuosa O/W.

De manera general, para la preparación de partículas por esta técnica empleando matrices poliméricas lipofílicas, es necesaria la preparación previa de varias disoluciones: una solución acuosa W_1 , que contiene tensioactivo y en la que irá disuelto el fármaco para las NPs cargadas, una solución orgánica del polímero y, finalmente, una segunda solución acuosa de emulsionante (W_2). Brevemente, la solución acuosa W_1 se homogeneiza con la solución orgánica para formar una primera emulsión de fase externa oleosa (W_1/O) y ésta emulsión primaria se adiciona a la fase W_2 para dar lugar a una emulsión final múltiple ($W_1/O/W_2$) (R. Liu et al. 2005) (Ver figura 7). Para la formación de ambas emulsiones, es primordial el aporte de energía.

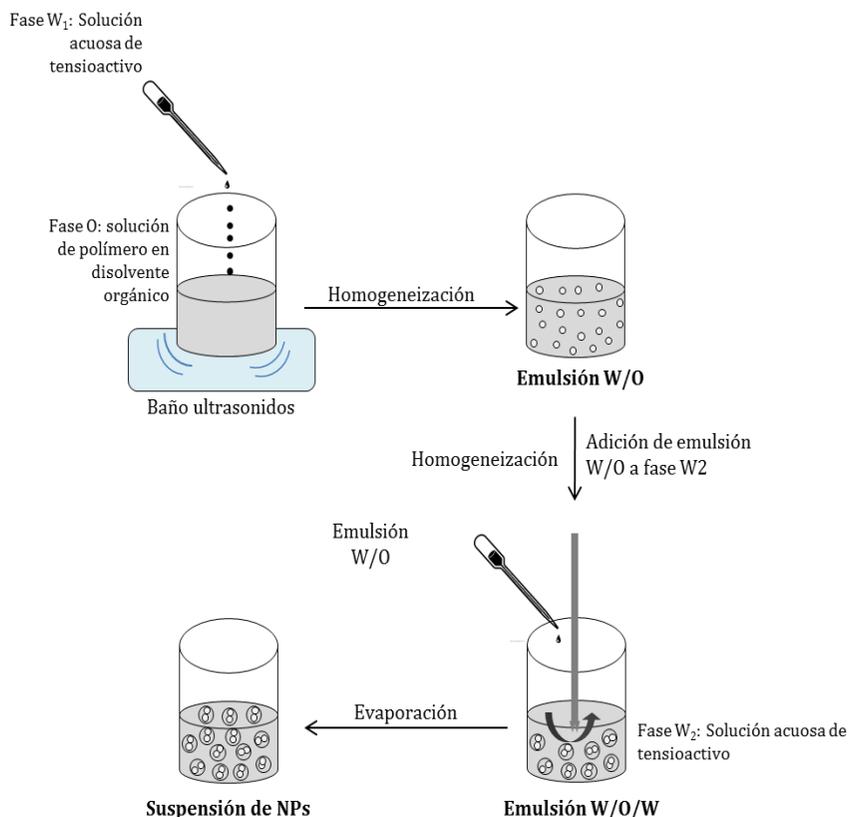


Figura 7. Principales etapas del método de evaporación del disolvente de una emulsión.

Esta técnica ha sido previamente empleada por nuestro grupo de investigación (Martín-Banderas et al. 2013) para la elaboración de NPs de gemcitabina. Algunas modificaciones se han llevado a cabo durante el proceso con objeto de conseguir NPs con unas características fisicoquímicas (tamaño, propiedades superficiales, etc.) óptimas para alcanzar el objetivo planteado.

En este trabajo, la producción de las partículas por el método de evaporación del disolvente de una doble emulsión se llevó a cabo en dos pasos principales:

- (1) Adición gota a gota de 100 μ L de una solución acuosa de PVA al 0.5% p/v (fase W_1) a 2 mL de una solución orgánica de PLGA en acetato de etilo a una concentración de 4% p/v (fase O) en agitación constante y dejando sonicar durante 1 minuto. La fase W_1 será la que contenga el fármaco en las NPs cargadas. En el presente trabajo, se ensayan diferentes concentraciones de fármaco (5%, 10%, 15%, 20% y 25% p/v).
- (2) La emulsión resultante del paso anterior es añadida de manera inmediata a 10 mL de una segunda disolución acuosa de PVA al 0.5% p/v (fase W_2) en constante agitación (24.000 rpm), empleando un homogeneizador de alta velocidad, Polytron® PT 2500E (Polytron, Montreal, Canadá). Una vez formada la emulsión múltiple, se mantiene 1 minuto más en agitación.

Seguidamente, la suspensión de partículas se dejó en bajo agitación magnética durante 2 h a temperatura ambiente en campana de extracción hasta la completa evaporación del disolvente orgánico.

A continuación, las NPs se recogieron por ultracentrifugación (Centrífuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 15557 rcf durante 30 min, a 4°C. Tras dos lavados, las NPs se resuspendieron en una solución de trealosa al 5% p/v, empleada como agente crioprotector.

Finalmente, la suspensión de NPs se congeló y fueron liofilizadas para usarlas posteriormente (-80 \pm 0.5°C y 0.054 mBar;

Cryodos-50, Telstar Industrial S.L., Tarrasa, España). Todas las formulaciones se prepararon por triplicado para asegurar la reproducibilidad de las mismas.

4.2.2 Modificación superficial de las NPs de PLGA

El objetivo de la funcionalización superficial de las NPs es el direccionamiento de las mismas hacia un órgano específico (en este caso, el cerebro), funcionalizándolas con ligandos específicos para receptores que se expresan en órganos, tejidos o células diana.

Para acrecentar la internalización de las NPs en las células endoteliales de la BHE, dos biomoléculas diferentes de naturaleza peptídica (ligandos específicos del receptor de Tf), se conjugaron en la superficie de las partículas: Tf o TfRp. Como ya se ha citado con anterioridad, trabajos de investigación de numerosos autores avalan la capacidad de ambos ligandos para mejorar la capacidad de las NPs para atravesar la barrera (Chang et al. 2009)(Cui et al. 2013)(W. Guo et al. 2013)(Yan et al. 2013)(Gomes et al. 2017).

La funcionalización de las NPs de PLGA se llevó a cabo siguiendo el método de la carbodiimida, aprovechando los grupos carboxilos terminales del PLGA para la formación de un enlace amida con el grupo amino de las moléculas peptídicas (Das, Dilnawaz, and Sahoo 2011) con algunas modificaciones (ver figura 8).

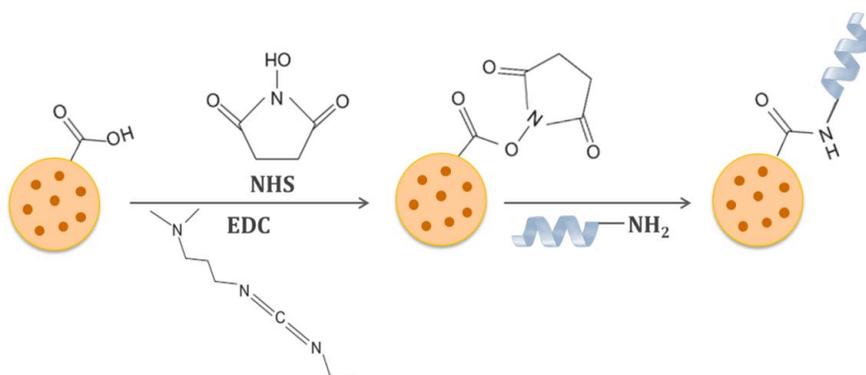


Figura 8. Esquema de las reacciones que comprenden la funcionalización de NPs a través del método carbodiimida.

La conjugación se lleva a cabo en dos pasos: el primer paso incluye la activación de los ácidos carboxílicos de la superficie de las NPs poliméricas. Para ello, 20 mg de NPs se dispersaron en 1 mL de agua Milli-Q, seguidamente, gota a gota se añadieron 500 μL de EDC (1mg/mL) y 500 μL de NHS (1mg/mL) a la suspensión de NPs, manteniendo en agitación constante durante 4 h a temperatura ambiente y en atmósfera inerte. Para eliminar el exceso de EDC y NHS, la suspensión de NPs se recogieron por ultracentrifugación (Centrífuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 15557 rcf durante 30 minutos a 4°C.

En la siguiente etapa, las NPs activadas se redispersaron en 2 mL de agua Milli-Q y se añadieron 200 μL de una solución acuosa de Tf (1 mg/mL). La suspensión se mantuvo en agitación constante durante toda la noche.

Tras este tiempo, la cantidad de Tf no unida a las NPs se eliminó por ultracentrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente. La cantidad de ligando no unida se analizó

posteriormente para comprobar la eficacia de conjugación (ver apartado 4.2.8).

El mismo protocolo fue empleado para la funcionalización de las NPs poliméricas con TfRp.

Paralelamente, se realizó un estudio de modificación superficial sin emplear el método de la carbodiimida, incubando la suspensión de NPs (2 mg/mL) únicamente con la solución de los ligandos (sin EDC ni NHS) con el fin de comprobar que los ligandos se unían covalentemente en lugar de quedar adsorbidos en la superficie de las partículas.

4.2.3 Preparación de NPS fluorescentes para estudios *in vitro* de captación celular.

Para conseguir la visualización de las partículas en los ensayos de captación celular, se usó NR como fluoróforo, siguiendo un protocolo similar al desarrollado en el apartado 4.2.1 con algunas modificaciones.

De manera breve, 100 μ L de una solución de NR en DMSO (1 mM) se disolvieron en 2 mL de una solución de PLGA en acetato de etilo. La solución formada se añadió gota a gota a 10 mL de una solución de PVA (0.5% p/v) en agitación intensa constante (24.000 rpm) empleando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron® PT 2500 E)(Polytron, Montreal, Canadá). La suspensión de NPs se dejó en agitación magnética constante hasta la completa evaporación del disolvente orgánico. Tras esto, se siguieron los

mismos pasos que para la preparación y modificación superficial de las NPs cargadas con VLX (Apartados 4.2.1 y 4.2.2).

4.2.4 Preparación de las NPs fluorescentes para estudios de permeabilidad

La evaluación de la permeabilidad de las NPs a través de un modelo *in vitro* de BHE se llevó a cabo usando partículas preparadas con PLGA previamente conjugado con FITC.

Para la formación del conjugado PLGA-FITC se empleó el método de carbodiimida (Yin et al. 2007) con ligeras modificaciones, estableciendo una unión covalente entre polímero y fluorocromo.

El primer paso implica la activación de los grupos carboxilos del PLGA, para esto, a un 1 mL de una solución de PLGA (20% p/v) en diclorometano (DCM), se añadieron gota a gota 2 mL de una solución de DCM que contenía EDC (1.02% p/v) y NHS (0.8% p/v), incubándose durante 2 h a temperatura ambiente.

Después, se añadió gota a gota 200 μ L de una solución de FITC 0,1 M en DCM: piridina (1:1). La mezcla se agitó durante 2 h en la oscuridad y, posteriormente, se incubó durante la noche a 4^o C. Para obtener el PLGA marcado, se usaron 30 mL de metanol, añadidos gota a gota en frío, provocando la precipitación del polímero. Finalmente, el conjugado FITC-PLGA se lavó con metanol para eliminar la fluoresceína no conjugada y, posteriormente con agua Mili-Q para eliminar los residuos de metanol. El polímero marcado se congeló, liofilizó y almacenó en la oscuridad a 4 ^oC.

Para calcular la cantidad de FITC unido al polímero, se construyó una curva de calibración disolviendo FITC en NaOH 1M (0 - 2 $\mu\text{g/mL}$) utilizando un lector de microplacas (lector de microplacas multimodal Synergy HT, Biotek, Vermont, EE.UU.), midiendo a 495 nm (longitud de onda de excitación) y 520 nm (longitud de onda de emisión). El polímero se disolvió en el mismo disolvente y se midió la intensidad de fluorescencia.

Posteriormente, se prepararon y funcionalizaron las NPs fluorescentes siguiendo los mismos protocolos empleados para la NPs de PLGA sin FITC (ambos protocolos descritos en las secciones 3.2.1 y 3.2.2, respectivamente).

4.2.5 Preparación de NPs fluorescentes con FITC encapsulado para estudios de biodistribución

Uno de las estrategias más usadas para evitar el reconocimiento y posterior eliminación de las NPs por el sistema retículo-endotelial (SRE) tras ser administradas es la PEGilación de su superficie. La PEGilación se define como la modificación superficial de los materiales con polietilenglicol (PEG) a través de un enlace covalente (Turecek et al. 2016). Esta técnica cambia las propiedades de las partículas, lo que se traduce, de manera general, en un aumento de la hidrofilia y una disminución de la inmunogenicidad (Veronese and Mero 2008). Por lo tanto, para el ensayo *in vivo* de biodistribución se incluyen NPs PEGiladas empleando PLGA-PEG comercial como polímero. El fluoróforo (FITC), en este caso, es encapsulado para evitar interferencias superficiales con el PEG.

Las NPs se preparan siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1, incluyendo el fluoróforo en la fase orgánica a una concentración de 0.5 mg/mL. Adicionalmente, aquellas partículas preparadas con PLGA, fueron funcionalizadas con Tf o TfRp siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.2.

4.2.6 Estudios de caracterización fisicoquímica de las NPs

Después de la preparación, las NPs fueron caracterizadas por su tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta y morfología.

4.2.6.1 Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El diámetro medio y la distribución de tamaños de los diferentes nanosistemas (NPs blancas, blancas funcionalizadas con Tf y TfRp, cargadas y cargadas funcionalizadas con Tf o TfRp) se midieron a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por una técnica de dispersión dinámica de luz (o espectroscopía de correlación de fotones) usando el equipo Zetasizer ZS90 (Malver Instruments, UK). El movimiento Browniano de las partículas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades, analizando estas fluctuaciones, se obtiene la velocidad del movimiento browniano y, por tanto, el tamaño de partícula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein.

Las muestras se prepararon diluyendo 100 μL de la suspensión de NPs recién preparada en 900 μL de agua Milli-Q, a temperatura ambiente. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para estudiar el tamaño de las NPs fluorescentes cargadas con NR, las NPs fluorescentes del conjugado FITC-PLGA para la evaluación de la permeabilidad y para las empleadas en los estudios de biodistribución (con FITC encapsulado).

4.2.6.2 Determinación de la carga eléctrica superficial de las NPs

El potencial zeta de las partículas es una medida de la carga eléctrica superficial de las mismas y, por tanto, es un parámetro indicativo de las posibles interacciones entre partículas y, por consiguiente, de la estabilidad de la suspensión. Viene determinado, principalmente, por la naturaleza de su superficie y el medio de dispersión y es un valor fundamental para el control de la estabilidad de los nanosistemas ya que, es a escala nanométrica, donde las interacciones entre partículas pueden alcanzar grandes magnitudes. Además da idea del éxito de modificación tras los procesos de funcionalización.

El potencial zeta de las NPs se determinó por el efecto Doppler en Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, UK). Esta técnica consiste en aplica un voltaje a través de dos electrodos situados en los extremos de una celda especial, que contiene la suspensión de NPs. Las partículas cargadas serán atraídas por el electrodo con carga opuesta y, midiendo la velocidad de migración, se puede determinar su movilidad electroforética y así su carga superficial (Tucker et al. 2015).

Las medidas se llevaron a cabo por triplicado. Se analizó la influencia de la presencia de PVA en la suspensión de NPs ya que afecta a la carga superficial de las mismas, interviniendo con los grupos carboxilos terminales del polímero (Zambaux et al. 1998). Por tanto, para determinar el valor real del potencial zeta, las NPs se lavaron dos veces por ultracentrifugación (4°C, 15557 rcf, 30 min). La preparación de las muestras se realizó tomando una alícuota de 20 µL de la suspensión concentrada de NPs y se diluyó en 980 µL de agua Milli-Q.

Se estudió también la influencia de la carga de fármaco y la conjugación de biomoléculas en la superficie.

4.2.6.3 Determinación de la morfología

El estudio de la morfología y aspecto de las NPs se llevó a cabo por análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido en un microscopio FEI TENEQ. Previamente, las partículas se cubrieron con una cubierta de Pd / Pt de 8-9 nm bajo vacío (Leica EM SCD500).

4.2.7 Determinación de la eficiencia de encapsulación y carga de fármaco

Con objeto de determinar el contenido de fármaco vehiculizado en la formulación final de las NPs, se empleó un método de HPLC descrito por Haque et al., (Haque et al. 2012) con ligeras modificaciones.

4.2.7.1 Condiciones cromatográficas

Concretamente, la separación cromatográfica se llevó a cabo empleando una columna LiChroCART® 250-4 (LiChrospher®, 5 µm, 250 mm, RP-18, HPLC Cartridge, Merck Millipore, Massachusetts, EE.UU.). El análisis RP-HPLC se realizó con un sistema Hitachi LaChrom® serie D-7000, equipado con una bomba cuaternaria L-7100, un espectrofotómetro de diodo UV-vis, serie L-7455 y un inyector automático L-7200. Para el análisis de datos y los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso del software HSM D-7000 LaChrom® de Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemania).

En cuanto a las condiciones cromatográficas, el volumen de inyección se fijó en 20 µL y una fase móvil compuesta de dos solventes: (A) acetonitrilo y (B) tampón fosfatos 20 mM (pH 3), en una proporción 75:25 a un flujo constante de 1 mL/min. La columna se mantuvo a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en un horno (L-2350, LaChrom Elite®) y las medidas se realizaron a una longitud de onda de 225 nm.

4.2.7.2 Preparación de estándares y muestras

El contenido de principio activo en las NPs se determinó de manera indirecta, es decir, midiendo la cantidad de VLX no encapsulada en el sobrenadante de las NPs preparadas, comparándolas con la cantidad inicial usada en su preparación.

Para ello, se estableció una recta de calibrado en un rango de concentraciones entre 0 – 400 µg/mL ($R^2 = 0.999$) y todas las diluciones fueron filtradas con un filtro de jeringa de 0.22 µm de

tamaño de poro (Millex® GV, Millipore, Barcelona, España) antes de su inyección. La disolución del activo se hizo en agua Milli-Q.

Para la cuantificación de las muestras, los sobrenadantes de naturaleza acuosa recogidos tras la ultracentrifugación, se filtraron empleando los mismos filtros usados para las muestras estándar y se inyectaron directamente en el sistema de HPLC.

El contenido de fármaco se expresó como eficacia de encapsulación (EE%) (Ecuación 1) y carga de fármaco (%) (Ecuación 2) y se calculó siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$EE\% = \left(\frac{\text{Contenido VLX en NPs}}{\text{Contenido teórico de VLX en NPs}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Carga de fármaco (\%p/p)} = \left(\frac{\text{masa de VLX en NPs}}{\text{masa de NPs recogida}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

4.2.8 Determinación de la eficacia de funcionalización

Con objeto de evaluar la eficacia de conjugación de las biomoléculas, se empleó un método colorimétrico basado en la absorbancia. Desarrollado por primera en 1985 (Smith et al. 1985), la sal sódica ácido bicinconínico (BCA), soluble en agua es un reactivo empleado en este sistema de detección proteica. El ensayo se basa en la reacción de Biuret y da lugar a un complejo púrpura intenso debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno de los enlaces peptídicos. La reacción, por tanto, ocurre en un ambiente alcalino con presencia de iones Cu^{2+} con una longitud de onda máxima de absorción de 562 nm. La estabilidad

del cromóforo aporta sencillez, rapidez y sensibilidad, mostrando gran tolerancia a compuestos que interfieren en otros métodos de cuantificación (Brown, Jarvis, and Hyland 1989).

Para el cálculo cantidad de ligando peptídico unido a la superficie de las NPs, se estableció una recta de calibrado en un intervalo de concentraciones entre 0-250 $\mu\text{g/mL}$ para ambas biomoléculas ($R^2 = 0,999$). La cuantificación se llevó a cabo de manera indirecta, midiendo la cantidad de ligando no unido covalentemente a la partícula. La eficacia del proceso también se expresa en μg de ligando unido por gramos de NPs (Das, Dilnawaz, and Sahoo 2011).

4.2.9 Estudio de la influencia de la congelación en las NPs. Optimización de las condiciones de liofilización.

La liofilización es un proceso que comprende tres etapas diferenciadas: la primera etapa consiste en la congelación de la suspensión acuosa de NPs, durante esta etapa la suspensión se enfría y comienzan a formarse los cristales de agua generando tensiones que pueden conducir a su pérdida de estabilidad. Seguidamente, el paso de secado primario, implica la sublimación del hielo del producto congelado. Tras la completa sublimación, se forman poros que se corresponden con los sitios ocupados por el hielo anteriormente. Finalmente, el agua absorbida por el producto es eliminada en un secado secundario (X. (Charlie) Tang and Pikal 2004). Una vez liofilizadas, (a) las NPs deben preservar las características iniciales, (b) los tamaños y la distribución de tamaños deben ser similares a los del producto previo sin liofilizar,

(c) la resuspensión debe ser aceptable con un tiempo corto de reconstitución y (d) la actividad farmacológica del activo debe permanecer inalterada. Se trata de una técnica lenta y costosa, ampliamente usada para mejorar la estabilidad de diversos activos farmacéuticos (Abdelwahed et al. 2006).

La congelación es un proceso muy agresivo para las NPs por tanto, es de vital importancia el empleo de un crioprotector para asegurar la calidad final del producto, ya que el polímero, tras sufrir un proceso de congelación tiende a formar un gel difícil de resuspender (Abdelwahed et al. 2006). Los crioprotectores más comúnmente usados son: alcoholes de bajo peso molecular como el polietilenglicol o azúcares como manitol, trealosa o sacarosa (Almalik et al. 2017).

En el presente trabajo, se evaluó la influencia de las diferentes proporciones de trealosa:NPs, estudiándose el efecto en agua, y 1:1.5, 1:3, 1:9, 1:15 de trealosa:NPs respectivamente, que se añadieron directamente a una suspensión de NPs blancas sin funcionalizar tras los lavados por ultracentrifugación, antes de congelarlas.

El tamaño de las NPs se midió tras un proceso completo de liofilización, resuspendiéndolas en agua Milli-Q. También se evaluó el efecto del crioprotector midiendo el tamaño de las NPs después de descongelarlas, sin liofilizar.

4.2.10 Estudios de liberación *in vitro*

Conocer la liberación *in vitro* del activo desde los nanosistemas es imprescindible para controlar el porcentaje liberado en función del tiempo.

El estudio se llevó a cabo mediante un método de diálisis empleando tampón fosfato (PBS) a pH 7.4 ± 0.1 como medio de liberación a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Previamente, las bolsas fueron hidratadas con agua durante 12 h (antes de su uso), tras esto, 5 mL de cada suspensión de NPs (VLX-PLGA, Tf-VLX-PLGA y TfRp-VLX-PLGA) en PBS a razón de 5 mg partículas/mL (equivalente aproximadamente a 490 μg de fármaco) se introdujeron en la bolsa de diálisis (2 KDa, tubos de membrana de diálisis Spectrum®Spectra/Por® 6, California, EE.UU.) fijadas en los extremos con pinzas y se colocaron en el interior de un Erlenmeyer cónico con 100 mL de tampón. Las muestras se agitaron a 200 rpm durante todo el ensayo y, a los tiempo pre-fijados (0.5, 2, 4, 8, 12, 24 h) se retiraron alícuotas de 0.5 mL de muestra del medio de liberación, suplidos con un volumen igual de PBS a la misma temperatura para garantizar las condiciones *sink*. El ensayo se realizó por triplicado.

Finalmente las muestras se filtraron y se inyectaron (20 μL) en el sistema de HPLC con las condiciones descritas en el apartado 4.2.7.1 para evaluar el porcentaje de activo liberado.

En este experimento, se estudió la posible influencia de la presencia de los ligandos en la superficie de las NPs funcionalizadas con respecto a las NPs simples.

4.2.11 Estabilidad de las formulaciones de NPs en líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial

Para desarrollar estudios *in vivo*, es necesario valorar la estabilidad de las partículas en los medios principales en los que se van a encontrar en el organismo. Por tanto, se desarrolló un estudio para evaluar la perdurabilidad de las NPs en LCR, uno de los principales líquidos del SNC.

Para ello, se preparó un LCR artificial siguiendo la formulación empleada por Gartzandia et al. Brevemente, en 1 L de agua Mili-Q se disolvió: 6.15 g NaCl, 0.216 g KCl, 0.447 g MgCl₂, 0.255 g CaCl₂, 6.009 g Na₂CO₃, 0.057 g Na₂HPO₄, 0.613 g D-glucosa, 0.2 g de ácido ascórbico y 0.3 g de albúmina sérica bovina (BSA) y el pH se ajustó a 7.35 (Gartzandia et al. 2016).

Por tanto, 1 mg de cada formulación de NPs (PLGA-, VLX-PLGA-, Tf-PLGA-, TfRp-PLGA-, Tf-VLX-PLGA-, TfRp-VLX-PLGA-NPs) se dispersaron en 5 mL del fluido artificial y la suspensión se mantuvo en agitación magnética durante 24 h a 37°C. Antes de comenzar el ensayo, se midió el tamaño y la distribución de tamaños (PDI) de las partículas usando un Zetasizer Malvern ZS90 (Malvern Instruments, UK), tras el tiempo de incubación, se volvió a medir el tamaño y PDI de las partículas.

4.2.12 Estudios celulares *in vitro*

4.2.12.1 Cultivos celulares

Las células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (línea celular hCMEC/D3) derivan de los microvasos del lóbulo temporal humanos, aislándolos del tejido extirpado, con alto nivel de expresión del transportador de glucosa (GLUT1) y el receptor de Tf (Weksler, Romero, and Couraud 2013). Las células fueron cultivadas en medio basal de crecimiento endotelial (EBM-2) suplementado con FBS (5% v/v), penicilina-estreptomina (1% v/v), ácido ascórbico (5 µg/mL), hidrocortisona (1.4 µM), concentrado lipídico químicamente definido (CD Lipid concentrated) (1/100 v/v), HEPES (10 mM) y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Este último suplemento se añadió en el último momento, a la hora de usar el medio. El cultivo celular se mantuvo a 37°C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ (Incubadora de CO₂AutoFlow UN-4750 Water Jacket; Nuair, EE.UU.). El medio fue reemplazado cada dos días y las células fueron subcultivadas después de alcanzar, aproximadamente, un 80% de confluencia (Gomes et al. 2017).

4.2.12.2 Estudios *in vitro* de toxicidad celular

Para evaluar la viabilidad de las células expuestas al contacto con las NPs se realizó el ensayo de reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), un ensayo colorimétrico fácil y cómodo que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la

capacidad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir un compuesto amarillo e hidrófilo, la sal de bromuro de tetrazolio (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio), a un compuesto insoluble (formazán), de color púrpura. Cuando las células captan la sal de bromuro de tetrazolio (MTT) se rompen y los cristales de formazán se solubilizan con DMSO, dando como resultado una solución de color morado, cuya intensidad dependerá del grado de viabilidad celular (Kong et al. 2011).

El ensayo detecta células vivas y debe hacerse en la oscuridad, ya que el reactivo MTT es sensible a la luz (Mosmann 1983).

La viabilidad celular se evaluó por este ensayo, poniendo en contacto las células con los diferentes nanosistemas y la VLX libre durante 24 h a distintas concentraciones: 0.1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs, equivalentes a 0.014, 0.14, 1.4, 14 y 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VLX respectivamente. El fármaco libre se añadió bajo las mismas condiciones.

Las células hCMEC/D3 fueron sembradas con una densidad de 1×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Nunclon®; ThermoScientific, Waltham, EE.UU.) e incubadas durante 24 h (37°C) para permitir la adhesión de las células. El medio se retiró completamente y las células se lavaron dos veces con 200 μL de PBS (pH 7.4). Después, las células se incubaron con las diferentes concentraciones de NPs y fármaco libre resuspendidas en medio de cultivo durante 24 h. Tras este tiempo, las suspensiones se

retiraron y las células se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS. Seguidamente, se añadieron 200 μ L de una solución de MTT (0.5 mg/mL en medio de cultivo) a cada pocillo durante 4 h, en la oscuridad. Finalmente, la solución de MTT fue descartada y los cristales de formazán fueron disueltos con 200 μ L de DMSO, agitando en oscuridad durante 10 min, a temperatura ambiente para facilitar la disolución de los cristales.

La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek, Vermont, EE.UU.) a 590 nm y la viabilidad celular se calculó siguiendo la siguiente ecuación (3):

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{valor experimental} - \text{control positivo}}{\text{control negativo} - \text{control positivo}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Las células incubadas solo con medio basal EBM-2 se empleó como control negativo (todas las células se mantienen viables) y una solución de Triton[®] X-100 como control positivo (todas las células mueren).

4.2.12.3 Estudios *in vitro* de internalización celular

Una de las ventajas de los nanosistemas transportadores de fármacos es su capacidad para internalizarse en lugares no accesibles para otras formas farmacéuticas tradicionales debido a su tamaño y su éxito depende en gran medida de su capacidad de interacción con las células u órganos diana. En el caso que nos ocupa, es de vital importancia evaluar la penetración de las partículas en las células endoteliales que forman la BHE para alcanzar el cerebro ya que, de ello, dependerá en gran medida su efecto terapéutico. Sin embargo, no siempre buenos resultados *in*

vitro se traducen en resultados *in vivo* de calidad pero pueden proporcionar algunas evidencias preliminares del potencial de las formulaciones nanométricas.

En este estudio, se empleó la línea celular hCMEC/D3 y se evaluó la captación de las partículas (NPs sin modificar y modificadas superficialmente con el Tf o TfRp) por parte de las mismas.

La internalización de las partículas en las células se determinó por análisis cualitativo y cuantitativo. Para visualizar las NPs en los ensayos de internalización celular *in vitro* se prepararon partículas fluorescentes con NR como fluoróforo (protocolo descrito en el apartado 4.2.3).

4.2.12.3.1 *Análisis cualitativo por microscopía confocal*

Para el análisis cualitativo, las células hCMEC fueron sembradas en cover-slips (1×10^5 células/cover-slip). Previamente, los cover-slips (12 mm) se situaron en un placa de 24 pocillos (Nunclon®; ThermoScientific, Waltham, EE.UU.), precubiertas con colágeno tipo I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante toda la noche para lograr la adhesión de las células. Después de esto, las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas con una suspensión de NPs (no funcionalizadas y funcionalizadas con Tf o TfRp) cargadas con NR (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio sin FBS) durante 30 min a 37°C. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS con el fin de eliminar las NPs no internalizadas y los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst® 33342 durante 10 min. A continuación, las células se volvieron a lavar dos veces con PBS para eliminar el

exceso de Hoechst® 33342 y se fijaron con PFA (4% p/v en PBS) durante 20 min. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y se montaron en un portaobjetos con PBS:glicerol (20:80) para ser observadas en el microscopio confocal de barrido láser (CLSM)(Zeiss LSM 410, LSM Tech, Etters, EE.UU.) con el *software* (Image Browser ZEN confocal Zeiss) para la formación de imágenes. Las células sin NPs fueron utilizadas como control.

4.2.12.3.2 *Análisis cuantitativo por citometría de flujo*

Para confirmar cuantitativamente los resultados obtenidos en los ensayos cualitativos, la captación celular se estudió por citometría de flujo. Para ello, previamente las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (Nunclon®; Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) hasta alcanzar un 80% de confluencia (aproximadamente 2.5 x 10⁶ células). Entonces, el medio se retiró y las células se incubaron con la suspensión de NPs cargadas con NR (funcionalizadas con Tf o TfRp y no funcionalizadas) (50 µg/mL en medio sin FBS) durante 30 min.

Pasado el tiempo de incubación, la suspensión fue retirada y las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar las partículas no internalizadas de la suspensión de NPs. Las células se levantaron con tripsina-EDTA (1 mL) durante 3 min. Después, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 4% p/v en PBS durante 15 min. Por último, para eliminar el PFA, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación y la suspensión celular resuspendida se añadió a tubos de citometría. La cantidad de NPs fluorescentes en el interior de las células fue medida por

citometría de flujo (FC 500 Cytomics MPL; Beckman Coulter Inc., Brea, EE.UU.) y los datos se analizaron con el *software* MXP.

4.2.12.4 Estudios de permeabilidad a través de un modelo de BHE *in vitro*

4.2.12.4.1 Modelos de BHE *in vitro*

Los modelos de BHE *in vitro* surgen con la idea de reducir el empleo de animales para evaluar la permeabilidad de la misma y facilitar los estudios *in vitro* de transporte de fármacos y la fisiopatología de las células que componen la barrera (Helms et al. 2016). Sin embargo, la meta es desarrollar un modelo con unas características que reproduzcan de la manera más ajustada posible la situación *in vivo* ya que no existe un modelo de barrera perfecto que posea las mismas características que los modelo *in vivo* (Czupalla, Liebner, and Devraj 2014).

La Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER) es una medida de la impedancia de la barrera a las sustancias que pretenden alcanzar el cerebro, nos informa de la robustez de la membrana y puede medirse colocando un electrodo en el lado apical (sangre) y el otro en la parte basolateral (cerebro).

De manera general, se emplean líneas celulares inmortales para suplir el uso de células cerebrales primarias humanas (difícilmente accesibles) que pueden obtenerse de diferentes especies. Las líneas inmortales, entre las que se incluye la línea celular humana hCMEC/D3 utilizada en este estudio, forman monocapas de células con valores de TEER comprendidos entre 20-200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, muy inferior a los valores de TEER *in vivo* (>1000

$\Omega \cdot \text{cm}^2$) (Eigenmann et al. 2013). No obstante, pueden multiplicarse ilimitadamente manteniendo sus características y aportan mayor reproducibilidad comparadas con las células primarias (Appelt-Menzel et al. 2017)

Hay diferentes modelos de barrera *in vitro* entre los que destacan:

a) Modelos endoteliales: estos modelos son diseños simples que emplean células endoteliales cerebrales cultivadas en un inserto con una membrana microporosa (Transwell®) que permite el intercambio entre ambos lados. Dentro de los modelos endoteliales, hay disponibles numerosas variedades de los mismos. Dentro de los modelos endoteliales, se encuentran los modelos monocultivo, cocultivo y cocultivo triple (Figura 9).

En los modelos citados de cocultivos, se pueden incluir neuronas ya que aumentan la función barrera, interviniendo en la localización de proteínas de las uniones estrechas (Lippmann et al. 2011).

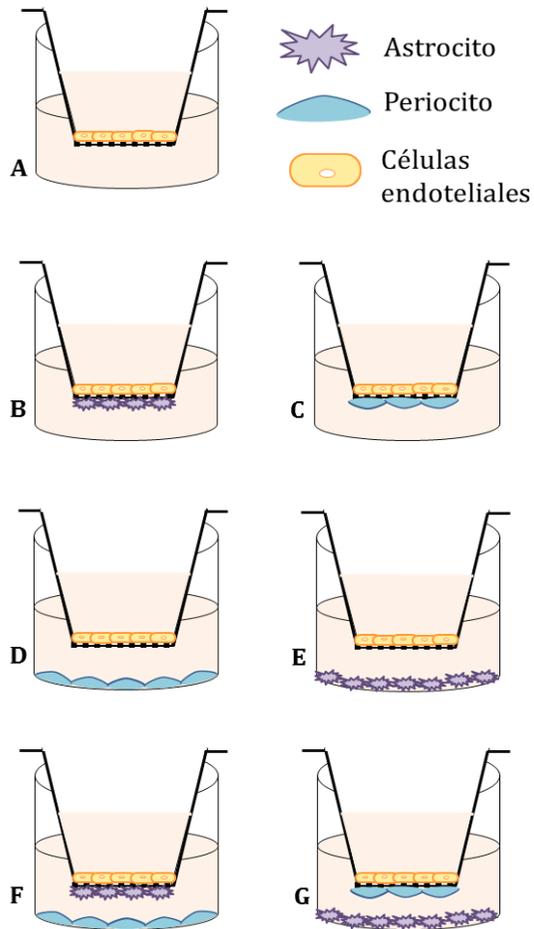


Figura 9. Principales estructuras de modelos celulares de barrera. (A) Modelo monocultivo; (B-C) Modelos cocultivo con contacto; (D-E) Modelos cocultivo sin contacto y (F-G) Modelos de cocultivo triple.

b) Modelos microfluídicos: el tamaño de los modelos microfluídicos permite reducir el número de células empleadas. Las células de la unidad neurovascular se cultivan también en membranas microporosas pero, a diferencia de los modelos endoteliales, éstas están colocadas entre dos microcanales que permite el flujo dinámico imitando la influencia del flujo sanguíneo (Bonakdar, Graybill, and Davalos 2017) (Bang et al. 2017).

c) Modelos 3D: la monocapa de los anteriores modelos no representa fielmente la estructura tridimensional de la barrera in vivo y, por ello, se han desarrollado nuevos modelos que simulan un corte histológico de la barrera en una plataforma microfluídica, cultivando las células en forma de tubo rodeado de pericitos y astrocitos(Cho et al. 2015)(Ruck, Bittner, and Meuth 2015).

4.2.12.4.2 Estudios de permeabilidad

La cuantificación de la permeabilidad de las NPs se estudió a través de un modelo *in vitro* de BHE (tipo monocapa). Para este propósito, las células hCMEC se sembraron con una densidad de 2.5×10^4 células/pocillo en el lado apical de una placa de 12 pocillos utilizando un inserto de 1.12 cm^2 ($0.4 \mu\text{m}$ de tamaño de poro) (Figura 10). Previamente, los insertos se recubrieron con colágeno tipo I ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ en ácido acético $0,02 \text{ M}$) para permitir la unión de las células a la membrana microporosa. El medio de cultivo (0.5 mL en el lado apical y 1.5 mL en el lado basolateral) se reemplazó cada 2 días durante 8 días.

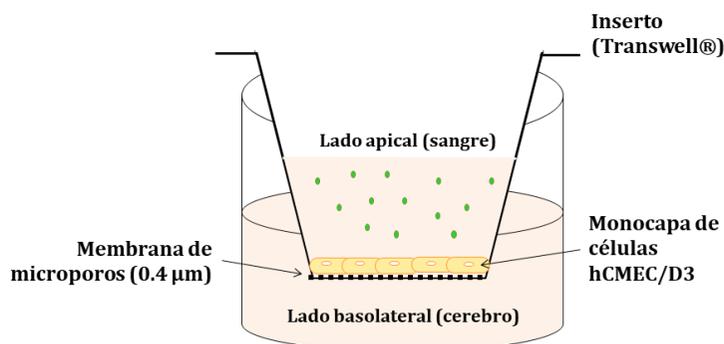


Figura 10. Representación esquemática del modelo *in vitro* de BHE empleado en los ensayos de permeabilidad (tipo monocapa).

La robustez de la monocapa celular se estudió midiendo su TEER a 37°C, utilizando un voltímetro acoplado a un electrodo (Volt-Ohm Epitelial Millicell ERS-2. Merck Millipore, Massachusetts, EE.UU.). La medida de la TEER se reconoce como uno de los parámetros que nos permiten determinar la integridad de la barrera (Nikandish et al. 2016).

Las células se incubaron a 37°C en condiciones de humedad con CO₂ al 5% durante 8 días y la TEER se midió cada dos días para confirmar la funcionalidad de las uniones estrechas. Al cabo de 8 días, tras comprobar que las células presentan propiedades de barrera ajustadas, las NPs fluorescentes (3 mg/mL) (no funcionalizadas y funcionalizadas con Tf o TfRp) resuspendidas en 0.5 mL de medio sin FBS se añadieron al lado apical del inserto. Las muestras se incubaron durante 1, 6, 8, 12 y 24 h a 37°C. A cada tiempo establecido, se midió la intensidad de la fluorescencia de la muestra del pocillo correspondiente retirando el inserto, usando un lector de microplacas (lector de microplacas multimodal Synergy HT, Biotek, Vermont, EE.UU.) a 495 y 520 nm. Los valores de TEER se midieron antes y después del ensayo para asegurar que la integridad de la barrera no se ve afectada por la incubación con NPs.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para evaluar la permeabilidad del fármaco (VLX), adicionando NPs cargadas sin funcionalizar y cargadas funcionalizadas con Tf o TfRp a una concentración de 3 mg/mL, lo que se corresponde con 330 µg/mL de principio activo. La permeabilidad del fármaco se analizó mediante un sistema doble de cromatografía líquida de alta presión

y espectrometría de masas (UHPLC-MS/MC) empleando un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 RS acoplado a un espectrómetro de masas Qexactive quadruple-orbitraphybrid (Thermo Scientific). El análisis cromatográfico realizó con una columna Acquity BEH C18 de 1,7 μm (2,1x100 mm) (Waters) utilizando un programa de gradiente de cuatro pasos con una solución acuosa de acetato de amonio (2 mM) (solución A) y acetonitrilo (solución B) como fase móvil a un caudal de 0,5 mL/min (Tabla 1) durante 15 min. La inyección de volumen de muestra fue 10 μL a 40°C. Los parámetros de la espectrometría de masas se ajustaron a 3.5 kV de voltaje de pulverización, 320°C de temperatura capilar y 400°C de temperatura del calentador de sonda. La recta de calibrado se estableció en el rango de 0-250 ng/mL.

| Pasos | Solución A | Solución B | Tiempo (min) | Velocidad de flujo (mL/min) |
|-------|------------|------------|--------------|-----------------------------|
| 1 | 5% | - | 0 - 1 | 0.5 |
| 2 | - | 100% | 1 - 12 | 0.5 |
| 3 | - | 100% | 12 - 13 | 0.5 |
| 4 | - | 5% | 13 - 15 | 0.5 |

Tabla 1. Método de gradiente de la fase móvil para la determinación de VLX por cromatografía líquida-espectrometría de masas.

4.2.13 Estudios *in vivo* en animales de experimentación

Con objeto de corroborar los resultados obtenidos en los experimentos celulares *in vitro*, es determinante estudiar el comportamiento y la biodistribución de las formulaciones *in vivo* empleando animales de experimentación.

4.2.13.1 Evaluación de la llegada de las NPs al cerebro tras administración intravenosa

Los ensayos *in vivo* llevados a cabo tras una administración intravenosa fueron llevados a cabo en colaboración con la Dra. Marina Bentivoglio de la Universidad de Verona. La evaluación de la capacidad de llegada al cerebro se realizó por dos técnicas distintas: microscopía confocal y citometría de flujo.

Inicialmente, los ratones tratados con las diferentes formulaciones de NPs (FITC-PLGA-, Tf-FITC-PLGA- y TfRp-FITC-PLGA-NPs) fueron inyectados en la vena de la cola con 200 μ L de una suspensión de cada una de las formulaciones en PBS a una concentración de 65 mg/kg o 130 mg/kg. Adicionalmente, se probó la llegada tras una administración crónica durante 7 días a razón de 65 mg/kg de NPs. Paralelamente, los ratones control fueron inyectados con idéntico volumen de PBS.

4.2.13.1.1 Microscopía confocal

En el momento de sacrificio (4 h después de la inyección o 7 días después de tratamiento crónico), los ratones se anestesiaron profundamente mediante inyección intraperitoneal (250 mg/kg) y se perfundieron transcardíacamente con PBS 0.01M (pH 7.4),

seguido de PFA al 4% en PBS. El cerebro y el bazo (como órganos control) fueron extraídos y se almacenaron durante al menos dos días en sacarosa (usado como crioprotector) al 30% en PBS a 4º C. Transcurrido este tiempo, se usó un micrótopo de congelación para cortar los tejidos en secciones de 40 µm.

En cuanto a los cerebros, se montaron tres secciones por animal, correspondientes a los niveles anterior, medio y posterior con un medio de montaje que contenía P-fenilendiamina (como neutralizador de radicales libres).

Los portaobjetos se observaron con un microscopio confocal Leica SP5 (Leica, Mannheim, Alemania) usando un objetivo de inmersión en glicerol 63X (N.A. 1.3) en combinación con un zoom de 2.4X (tamaño de píxel de 100 nm). Las imágenes en serie de planos Z (0,46 µm) se capturaron con el *software* LAS con una resolución de 1024 por 1024 píxeles.

4.2.13.1.2 *Análisis citofluorimétrico*

En el momento del sacrificio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los órganos (cerebro y bazo) se diseccionaron rápidamente y se homogeneizaron en PBS usando un mezclador de mano. Después de la centrifugación para eliminar los restos, los sobrenadantes se filtraron a través de diferentes filtros de células (40 µm para muestras de cerebro, 70 µm para las del bazo). El filtrado se analizó por citometría de flujo empleando un citómetro FACS Canto I (Becton Dickinson, San Jose, California, EE.UU.), adquiriéndose entre 2×10^4 y 4×10^4 eventos. Los datos de

citometría de flujo se trataron usando el software FlowJo (TreeStar, Ashland, Oregon, EE.UU.).

4.2.13.2 **Evaluación de la biodistribución de las NPs en el organismo vía *nose-to-brain* tras administración intranasal**

Adicionalmente, en base a los resultados obtenidos tras la administración intravenosa, se llevaron a cabo ensayos de biodistribución empleando la ruta *nose-to-brain*, una vía prometedora para mejorar el acceso numerosos activos terapéuticos al SNC.

Para ello, se evaluaron cuatro formulaciones de NPs fluorescentes (FITC-PLGA-, FITC-PLGA-PEG, Tf-FITC-PLGA- y TfRp-FITC-PLGA-NPs), encapsulando FITC como fluoróforo en estas formulaciones de NPs. Las partículas poliméricas se caracterizaron por su tamaño, Pdl y potencial zeta.

Para el ensayo, todas las formulaciones se administraron a través de la ruta *nose-to-brain* empleando la administración intranasal usando una micropipeta, administrando un volumen total de 15 μ L (7.5 μ L en cada fosa nasal) de la suspensión de las partículas en estudio. Las NPs se resuspendieron en suero fisiológico estéril (aproximadamente 30 mg/kg) y se administraron a razón de 2.5 μ L con intervalos de 3 minutos entre cada administración, en fosas nasales alternas.

Antes de la administración, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (15% v/v) y medetomidina (10% v/v). Veinte animales fueron

divididos en cinco grupos (4 animales por grupo). Los grupos 1, 2, 3 y 4 se trataron con las partículas fluorescentes (FITC-PLGA-, FITC-PLGA-PEG, Tf-FITC-PLGA- y TfRp-FITC-PLGA-, respectivamente). Un quinto grupo se utilizó como grupo control, tratándose con PBS en las mismas condiciones. Tras 30 minutos, a los ratones se les realizó una perfusión con PBS estéril para limpiar los órganos y tejidos de sangre y, reducir así las posibles interferencias en el citómetro con las células sanguíneas. Después corazón, cerebro, riñones, pulmones, bazo e hígado fueron recogidos y conservados congelados en una solución de sacarosa al 30%, usado como crioprotector.

Adicionalmente, se añadió un grupo de animales con el fin de evaluar la fluorescencia total proveniente de las NPs que llegaría al cerebro en caso de que todas las NPs alcanzaran el tejido. Para ello, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (15% v/v) y medetomidina (10% v/v) y perfundidos con PBS estéril. Tras esto, se extrajeron los cerebros y se inyectaron con la dosis total de cada tipo de partículas (FITC-PLGA-, FITC-PLGA-PEG, Tf-FITC-PLGA- y TfRp-FITC-PLGA NPs) administrada en los ensayos de *nose-to-brain*, con el fin de comprobar la fluorescencia de la muestra total.

Para el análisis, los tejidos se homogeneizaron en 1 mL de PBS empleando un homogeneizador Precellys 24® (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Francia) y el homogeneizado se filtró con filtros celulares de 70µm (BD Falcon, Corning, Nueva York, EE.UU.). Todas las muestras se analizaron

mediante citometría de flujo (Cytomics FC 500 MPL; Beckman Coulter, EE. UU.).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios de caracterización de las NPs preparadas

La síntesis de NPs se llevó a cabo por el método de evaporación del disolvente de una emulsión siguiendo los pasos descritos en la sección 2.2.1. de Materiales y Métodos y fueron caracterizadas por su tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, morfología, eficacia de encapsulación y carga de fármaco. La emulsión obtenida no presentó inestabilidad ni formación de agregados durante el tiempo de evaporación de disolvente. Tras la conjugación con ambos ligandos, se estudió la eficacia de conjugación y las NPs se volvieron a caracterizar por tamaño, distribución de tamaños y potencial zeta para evaluar la influencia de la conjugación superficial.

5.1.1 Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El tamaño y la distribución de tamaños de las NPs se determinaron por dispersión láser. Los resultados obtenidos se expresan como el valor del tamaño medio (diámetro hidrodinámico) y su desviación estándar (DE).

Varias velocidades de homogeneización fueron testadas en el homogenizador de alta velocidad Polytron® para evaluar la influencia de la misma en el tamaño de las NPs. Finalmente, la velocidad se estableció en 24.000 rpm para todas las formulaciones al no observarse diferencias cuando se aumentaba la velocidad hasta 30.000 rpm (datos no mostrados).

Tras el análisis de las muestras, las NPs mostraron un diámetro hidrodinámico no superior a 230 nm y un PDI inferior a 0.2 en todas las formulaciones, indicando que los sistemas elaborados son ampliamente monodispersos (PDI < 0.2)(Stetefeld, McKenna, and Patel 2016) (Tabla 2).

| Formulación | Diámetro medio ± DE (nm) | PDI ± DE |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|
| PLGA NPs | 192.1 ± 6.7 | 0.128 ± 0.033 |
| Tf- PLGA NPs | 228.8 ± 1.3 | 0.104 ± 0.029 |
| TfRp-PLGA NPs | 222.6 ± 1.2 | 0.078 ± 0.053 |
| VLX+PLGA NPs | 194.3 ± 3.7 | 0.106 ± 0.018 |
| VLX+Tf-PLGA NPs | 218.6 ± 0.5 | 0.078 ± 0.008 |
| VLX+TfRp-PLGA | 216.3 ± 2.7 | 0.067 ± 0.025 |

Tabla 2. Tamaño medio y distribución de tamaño de NPs blancas y cargadas (funcionalizadas y no funcionalizadas) (n=9; DE = desviación estándar; PDI: índice de polidispersión).

Según los datos de la tabla, el tamaño medio de las NPs de PLGA blancas fue de 192.1 ± 6.7 nm y su PDI fue 0.128 ± 0.033 , lo que se traduce en una alta homogeneidad de la población.

También se estudió la influencia de la carga de fármaco y la presencia de ligandos en la superficie de las partículas en el tamaño de las partículas.

Las NPs cargadas con VLX mostraron un tamaño medio de 194.3 ± 3.7 nm y una distribución de tamaños media de 0.106 ± 0.018 .

Gráficamente, los resultados pueden observarse en las figuras 11 y 12.

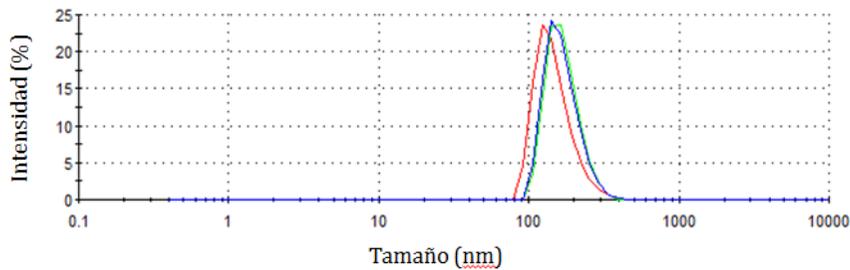


Figura 11. Histogramas de los tamaños de las formulaciones de NPs blancas, funcionalizadas y sin funcionalizar (rojo: NPs blancas; verde: NPs funcionalizadas con Tf; azul: NPs funcionalizadas con TfRp)

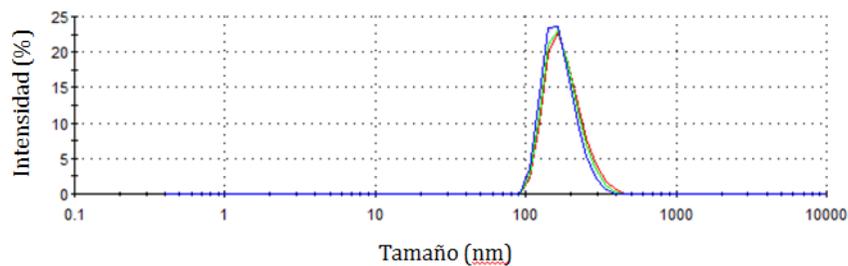


Figura 12. Histogramas de los tamaños de las formulaciones de NPs cargadas con fármaco, funcionalizadas y sin funcionalizar (rojo: NPs no funcionalizadas; verde: NPs funcionalizadas con Tf; azul: NPs funcionalizadas con TfRp)

Para lograr alcanzar el cerebro tras atravesar la BHE, la superficie de las NPs se funcionalizó con dos ligandos específicos del receptor de Tf. De acuerdo con la literatura publicada, las NPs conjugadas exhibieron un ligero incremento de tamaño medio (11-13%) comparada con las NPs no funcionalizadas. Dicho incremento puede explicarse por la presencia de las biomoléculas en la superficie (Ulbrich et al. 2009)(Pitek et al. 2012).

Para las NPs preparadas para la visualización de los ensayos celulares *in vitro*, se encapsuló NR como fluoróforo. La misma tendencia que para las partículas preparadas con el activo se observa con este tipo de partículas, exhibiendo un ligero aumento de tamaño cuando se modificaban superficialmente (Tabla 3).

| Formulación | Diámetro medio ± DE (nm) | PdI ± DE |
|------------------|-----------------------------|---------------|
| NR+PLGA NPs | 215.6 ± 2.2 | 0.048 ± 0.022 |
| NR+Tf-PLGA NPs | 234.9 ± 1.5 | 0.078 ± 0.053 |
| NR+TfRp-PLGA NPs | 228.8 ± 4.8 | 0.092 ± 0.071 |

Tabla 3. Tamaño medio y distribución de tamaño de NPs de NR (funcionalizadas y no funcionalizadas) (n=9; DE = desviación estándar; Pdl: índice de polidispersión).

Para los ensayos de permeabilidad *in vitro* de las NPs, se prepararon NPs fluorescentes empleando FITC como fluoróforo. Para ello, el polímero se conjugó con el fluoróforo tal y como se describe en el apartado 4.2.4. Como paso previo a la preparación de las partículas y con el fin de evaluar el rendimiento de asociación entre el polímero y FITC, se construyó una curva de calibración (0-2 µg / mL) ($R^2 = 0,998$). Después del proceso de conjugación, se obtuvo un rendimiento de asociación del 2.390%, lo que supone 0,956 µg de FITC por mg de polímero.

Las NPs de FITC-PLGA se prepararon mediante DE-SEV siguiendo el mismo procedimiento que para las nanopartículas cargadas con fármaco (sin incluir el activo) y se funcionalizaron empleando el método de carbodiimida (desarrollado en el apartado 4.2.2). Los tamaños obtenidos tras la preparación se muestran en la tabla 4.

| Formulación | Diámetro medio ± DE (nm) | PdI ± DE |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------|
| cFITC-PLGA NPs | 203.6 ± 1.9 | 0.068 ± 0.018 |
| Tf-cFITC-PLGA NPs | 210.3 ± 1.2 | 0.040 ± 0.033 |
| TfRp-cFITC-PLGA NPs | 207.3 ± 0.8 | 0.034 ± 0.023 |

Tabla 4. Tamaño y distribución de tamaños de las partículas fluorescentes de cFITC-PLGA (funcionalizadas y no funcionalizadas) (n = 9; DE: desviación estándar; PdI: índice de polidispersión; cFITC: FITC conjugado).

Igual que ocurre con las formulaciones no fluorescentes, las NPs aumentan de tamaño ligeramente (2-4%) cuando son superficialmente modificadas con los ligandos específicos.

Por último, para los ensayos de biodistribución *in vivo*, además de las NPs de PLGA (funcionalizadas con ambos ligandos y sin funcionalizar), se prepararon partículas fluorescentes PEGiladas con FITC, usando el polímero PLGA-PEG. En este caso, el fluoróforo fue encapsulado (no conjugado) para evitar interferencias en la superficie con las cadenas de PEG. También presentes en la superficie.

Los resultados se muestran en la tabla 5.

| Formulación | Diámetro medio ± DE (nm) | PdI ± DE |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|
| FITC+PLGA NPs | 189.5 ± 3.8 | 0.025 ± 0.023 |
| FITC+Tf-PLGA NPs | 205.4 ± 1.3 | 0.025 ± 0.023 |
| FITC+TfRpPLGA NPs | 202.4 ± 3.9 | 0.058 ± 0.015 |
| FITC+PLGA-PEG NPs | 231.2 ± 3.2 | 0.154 ± 0.007 |

Tabla 5. Tamaño y distribución de tamaños de las partículas fluorescentes de FITC encapsulado (funcionalizadas y no funcionalizadas) (n = 9; DE: desviación estándar; PdI: índice de polidispersión).

Todas las formulaciones de NPs preparadas para este ensayo mostraron una estrecha distribución de tamaños, lo que indica el alto grado de homogeneidad de las NPs preparadas. Las NPs fluorescentes sin funcionalizar mostraron un tamaño inferior a 200 nm que, tras la funcionalización, aumentaron ligeramente de tamaño (6-8%). Sin embargo, las NPs PEGiladas exhibieron un tamaño mayor, por encima de 230 nm de diámetro.

Tras el análisis de estos resultados, se puede resumir que, siguiendo los protocolos desarrollados en los correspondientes apartados de Materiales y Métodos, todas las formulaciones elaboradas muestran índice de polidispersión inferior a 0.2 lo que indica un alto grado de homogeneidad. Las formulaciones de NPs sin modificación superficial destinada a los ensayos de biodistribución *in vivo* así como las cargadas con VLX mostraron tamaños inferiores a 200 nm, por lo que se consideran adecuadas para este tipo de administración ya que, según la literatura publicada (Tong, Qin, and Sun 2017), partículas con tamaño inferior a 200 nm son capaces de alcanzar el sistema nervioso central de manera más eficiente.

5.1.2 Determinación de la carga eléctrica superficial de las NPs

El potencial zeta de las partículas está relacionado con la carga eléctrica superficial de las mismas. El valor de dicho parámetro puede influir en sus propiedades fisicoquímicas, entre las que destaca la estabilidad del sistema o la interacción con otros compuestos cargados. Por lo tanto, junto con tamaño y distribución

de tamaño, es fundamental conocerlo y controlarlo ya que puede repercutir en factores relacionados con la biodistribución y la internalización celular.

En este apartado, se estudió la influencia de los residuos de PVA, empleado como tensioactivo en las fases acuosas de la emulsión, así como los efectos de la presencia de ligandos en la superficie.

En relación a la influencia de la cantidad de PVA en la suspensión, dicho compuesto afecta a los grupos carboxilos terminales del polímero, dando lugar a valores erróneos de potencial zeta. Por tanto, el potencial zeta fue medido en las NPs nativas (blancas y cargadas) tras la completa evaporación del disolvente, tras un solo lavado y tras dos lavados.

En primer lugar, comparando las partículas cargadas con fármaco y no cargadas, la presencia del activo encapsulado no influyó en los valores de potencial zeta de manera significativa (Tabla 6).

En relación a la variación de carga eléctrica superficial tras la modificación superficial de las NPs, las partículas funcionalizadas mostraron valores de potencial zeta menos negativos. Dicha observación fue manifestada por otros autores, atribuyendo dicha tendencia a la ocupación parcial de los grupos carboxilos por los ligandos específicos (Luo et al. 2017)(Ulbrich et al. 2009)(Pitek et al. 2012). En cuanto al tipo de ligando empleado, no se observaron diferencias entre las NPs funcionalizadas con Tf y las conjugadas con TfRp (Tabla 6).

| Formulación | Potencial zeta ± DE (mV) |
|--------------------|---------------------------------|
| PLGA NPs | -25.4±0.7 |
| Tf- PLGA NPs | -20.6±0.5 |
| TfRp-PLGA NPs | -21.1±1.3 |
| VLX+PLGA NPs | -26.5±0.5 |
| VLX+Tf-PLGA NPs | -19.5±0.2 |
| VLX+TfRp-PLGA NPS | -19.6±0.3 |

Tabla 6. Potencial zeta obtenido para las diferentes formulaciones (NPs cargadas y blancas, funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar) (n=9; D.E.: desviación estándar).

Por otro lado, se sabe que un potencial zeta neutro es indicativo de una baja estabilidad del sistema coloidal, debido a la atracción entre las partículas con distinto signo. Adicionalmente, los valores de potencial zeta dan idea de la presencia de los grupos carboxilos terminales del polímero. Sin embargo, como se ha citado anteriormente (apartado 4.2.6.2.), dichos grupos funcionales resultan enmascarados con la presencia de PVA y es indispensable su disponibilidad para lograr una conjugación superficial eficaz.

Tras la evaporación del disolvente, las partículas mostraron un potencial zeta en torno a -10 mV. Los valores no cambiaron bruscamente tras el primer lavado mientras que, después del segundo lavado con agua, las partículas mostraron un potencial zeta en torno a -25 mV (Fig. 13).

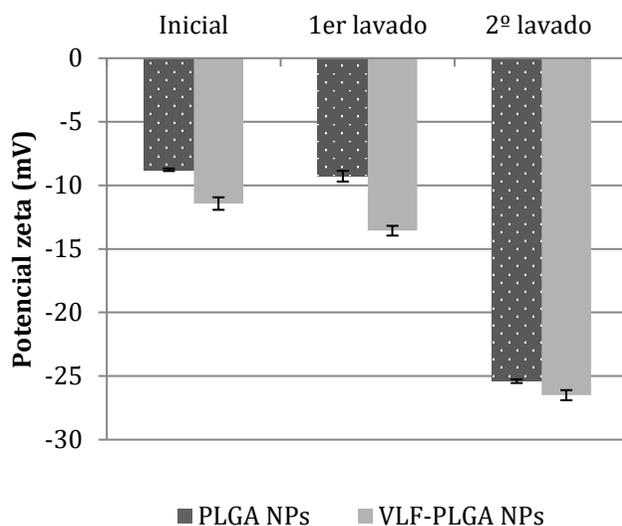


Figura 13. Valores de potencial zeta de NPs de PLGA blancas y cargadas con fármaco obtenidos para las NPs recién preparadas, tras un primer lavado por ultracentrifugación y tras un segundo lavado.

Para las NPs fluorescentes cargadas con NR, se obtuvieron valores similares de carga superficial, exhibiendo un descenso de la carga eléctrica superficial tras la modificación de la superficie (Tabla 7).

| Formulación | Potencial zeta \pm DS (mV) |
|------------------|------------------------------|
| NR+PLGA NPs | -19.1 \pm 0.1 |
| NR+Tf-PLGA NPs | -13.1 \pm 0.3 |
| NR+TfRp-PLGA NPs | -11.9 \pm 0.2 |

Tabla 7. Valores de potencial zeta obtenido para las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes empleando NR como fluoróforo (funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar) (n=9; D.E.: desviación estándar)

En cuanto a las NPs fluorescentes preparadas con el conjugado PLGA-FITC para los estudios de permeabilidad los valores de potencial zeta se tornaron más cercanos a la neutralidad

que podría explicarse por una ocupación parcial de los grupos carboxilos previamente, tras la conjugación con el fluoróforo.

| Formulación | Potencial zeta \pm DS (mV) |
|---------------------|--|
| cFITC-PLGA NPs | -19.2 \pm 0.4 |
| Tf-cFITC-PLGA NPs | -17.8 \pm 0.2 |
| TfRp-cFITC-PLGA NPs | -14.7 \pm 0.5 |

Tabla 8. Valores de carga superficial obtenido para las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes de FITC-PLGA (funcionalizadas con los ligandos y sin funcionalizar) (n=9; D.E.: desviación estándar; cFITC: FITC conjugado).

Tal y como sucede en los casos anteriores, tras la conjugación, el potencial zeta es menos negativo, debido a la unión de los ligandos específicos en la superficie.

Finalmente, los valores de potencial zeta mostrados por las NPs preparadas para los ensayos de biodistribución *in vivo*, incluidas las NPs PEGiladas se resumen en la tabla 9.

| Formulación | Potencial zeta \pm DS (mV) |
|--------------------|--|
| FITC-PLGA NPs | -22.3 \pm 0.4 |
| Tf-FITC-PLGA NPs | -11.2 \pm 0.8 |
| TfRp-FITC-PLGA NPs | -14.5 \pm 0.4 |
| FITC-PLGA-PEG NPs | -31.3 \pm 0.8 |

Tabla 9. Valores de carga superficial obtenido para las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes con FITC encapsulado (funcionalizadas con ambos ligandos y sin funcionalizar) (n=9; DE.: desviación estándar).

Por lo tanto, de forma resumida, en función de los resultados obtenidos, los valores de carga superficial obtenidos tras dos lavados resultan adecuados para garantizar la estabilidad del sistema y asegurar la liberación de los grupos carboxilos necesarios para la formación del enlace amida con los ligandos, influenciados por la presencia de PVA. Además, como tendencia general, el potencial zeta se torna menos negativo cuando la superficie de las partículas es modificada con los ligandos específicos, justificado por la ocupación parcial de los grupos carboxilo.

5.1.3 Estudio de la morfología

La determinación de las características morfológicas de las NPs se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las imágenes revelaron partículas dispuestas individualmente, con forma esférica y una distribución homogénea

5.1.4 Determinación del contenido en fármaco (VLX)

Para alcanzar concentraciones terapéuticas que resulten en un tratamiento eficaz es necesario el control de la cantidad de fármaco vehiculizado en las NPs ya que, un alto contenido en principio activo conlleva el empleo de menor cantidad de NPs.

La elección del método de encapsulación depende principalmente de la solubilidad de la molécula. Generalmente, se admite que para fármacos insolubles o con muy baja solubilidad en agua se pueden emplear métodos como la evaporación del disolvente de una emulsión simple o la nanoprecipitación. Dichas

técnicas no son válidas para agentes hidrosolubles ya que pueden difundir a la fase externa, traduciéndose en una baja encapsulación (Iqbal et al. 2015). Las emulsiones múltiples, concretamente las emulsiones múltiples de agua en aceite (A/O/A), surgen como una alternativa para la encapsulación de fármacos hidrófilos.

Como se ha citado anteriormente, la eficacia de encapsulación se midió de manera indirecta, es decir, cuantificando la cantidad de activo no encapsulado en el sobrenadante tras la preparación de las partículas. Para ello, se utilizó un método de HPLC estableciendo una recta de calibrado con un intervalo de concentraciones entre 0 – 400 $\mu\text{g/mL}$ de fármaco ($R^2 = 0.999$), con 7.5 y 8.5 $\mu\text{g/mL}$ como límites de detección y cuantificación, respectivamente.

Para estudiar la eficacia de encapsulación, se emplearon diferentes concentraciones de fármaco (5%, 10%, 15%, 20% y 25% p/v) disueltas en la fase acuosa interna siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.

En términos de eficacia de encapsulación (EE%), los resultados muestran que la EE (%) para aquellas formulaciones preparadas con una concentración de principio activo del 25% ofrecieron la mayor eficacia (aproximadamente 50%) (ver figura 14).

Con respecto a la carga de fármaco (%), como se observa en la figura 14, se produce un aumento de la carga de fármaco a medida que aumenta la concentración inicial del mismo.

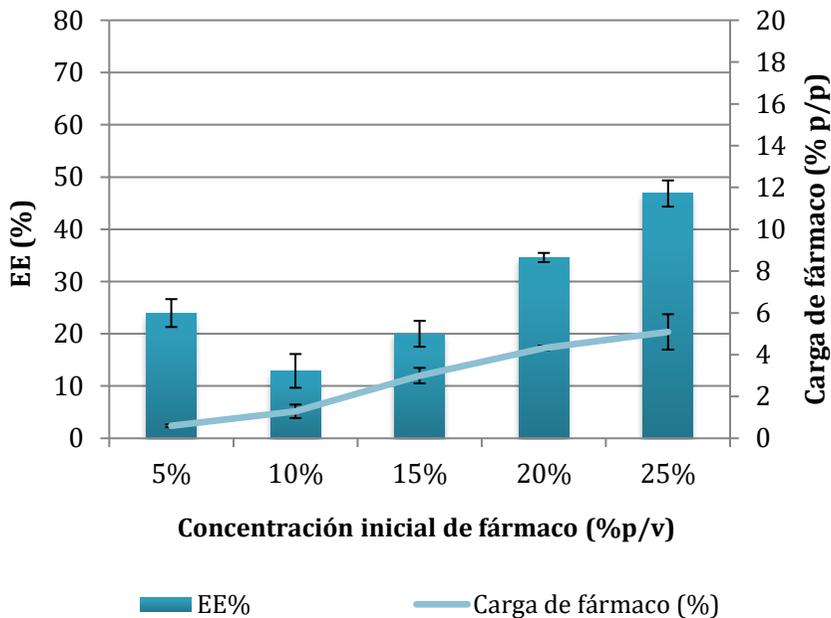


Figura 14. Valores de eficacia de encapsulación (EE%) y carga de fármaco obtenidos para partículas preparadas con diferente concentración inicial de fármaco (n=9; barras de error = desviación estándar).

En función de los resultados obtenidos hasta el momento, se seleccionó aquella formulación preparada con la mayor concentración de activo para continuar con los estudios posteriores.

Ambos parámetros también se evaluaron tras el proceso de funcionalización superficial para determinar si se producía una liberación del fármaco durante el tiempo de incubación. Tras el análisis de HPLC, las muestras no mostraron una liberación de fármaco a concentraciones detectables por el equipo.

5.1.5 Análisis de la eficacia de funcionalización

Una modificación superficial efectiva es un requisito indispensable para lograr una interacción ligando-receptor

adecuada. Por tanto, para evaluar la cantidad de ligando unida a la superficie de las partículas, se empleó un método colorimétrico basado en la absorbancia que permite detectar moléculas proteicas en función de su concentración en el medio para evaluar la efectividad de la unión covalente entre polímero cuando la superficie de las partículas sufría la activación de sus grupos funcionales. De manera adicional, se estudió la modificación superficial sin la previa activación de los grupos carboxilo, con el fin de comprobar que los ligando se unían covalentemente en lugar de quedar adsorbidos en la superficie.

La cantidad de ligando conjugado superficialmente se determinó mediante el método de BCA (desarrollado en el apartado 4.2.8) de manera indirecta, es decir, midiendo la presencia de ligando libre no unido en el sobrenadante de la suspensión de partículas tras la incubación con el ligando.

En las partículas modificadas con Tf, se conjugó aproximadamente 7.5-8 μg de Tf por mg de partícula, lo que equivale a una eficacia de conjugación (EC%) de 75 – 80% mientras que para las modificadas con TfRp este valor fue de 7 μg de péptido por mg de NPs (alrededor del 70% de eficacia). Dichos valores no difirieron entre las formulaciones cargadas con fármaco y las no cargadas.

En cuanto a las partículas fluorescentes con NR empleadas en los estudios celulares *in vitro*, la cantidad media de Tf y TfRp conjugado se confirmó con el mismo método que para las NPs no fluorescentes. En este caso, se detectó alrededor de 6.5 μg de Tf y

5.5 μg de péptido por mg de nanopartícula. Dichos valores suponen, de manera aproximada, un 67% y 56% de eficacia de conjugación, respectivamente.

Para las partículas fluorescentes preparadas con el conjugado PLGA-FITC, tras la conjugación con Tf se obtuvo una eficacia de conjugación en torno al 85%, que se corresponde con, aproximadamente 8.5 μg de ligandos por mg de nanopartícula. Para aquellas partículas funcionalizadas con TfRp, se obtuvo alrededor de 8 μg de ligando por mg de nanopartícula, obteniéndose resultados similares cuando el FITC fue encapsulado.

Finalmente, cuando la modificación superficial se probó sin la previa activación de la superficie de las nanopartículas, la eficacia de encapsulación resultó baja (inferior al 30%) y no reproducible comparada con la mostrada por las partículas activadas previamente.

Por tanto, a raíz de los resultados obtenidos, se concluye que para todas las formulaciones, se logran, altas eficacias en el proceso de funcionalización (por encima de 60%, de manera general).

5.1.6 Estudio de la influencia de la congelación en las NPs. Optimización de las condiciones de liofilización

Dado que tanto la congelación como la liofilización son procesos agresivos para la estabilidad de las partículas, es necesario establecer las condiciones óptimas para ambos procesos y mantener la integridad morfológica de las formulaciones. En este caso, es de vital importancia mantener tamaños muy similares a los

mostrados por las NPs frescas debido a que el acceso de las mismas al cerebro está limitado por su tamaño. Para lograrlo, es necesario la adición de un crioprotector que conserve la formulación intacta y, para ello, se llevó a cabo un estudio cuya finalidad fue determinar la concentración óptima del mismo en disolución, evaluándose la estabilidad de las partículas tras la congelación y/o liofilización ($-80\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 0.057 mBar, Cryodos-50, Telstar Industrial, Terrasa, España).

La trealosa es uno de los crioprotectores más empleados para la conservación de las partículas y el elegido para este estudio. La proporción de trealosa:NPs empleadas en el estudio fueron 1:1.5, 1:3, 1:9 y 1:5, para la resuspensión de las formulaciones previa a los procesos de congelación-liofilización. La trealosa se adicionó en solución acuosa y, adicionalmente se ensayó el efecto cuando las partículas eran resuspendidas en agua (sin crioprotector).

En la figura 15 se muestra el efecto de la adición de diferentes concentraciones de trealosa en el tamaño y la distribución de tamaños de las NPs tras un proceso de congelación.

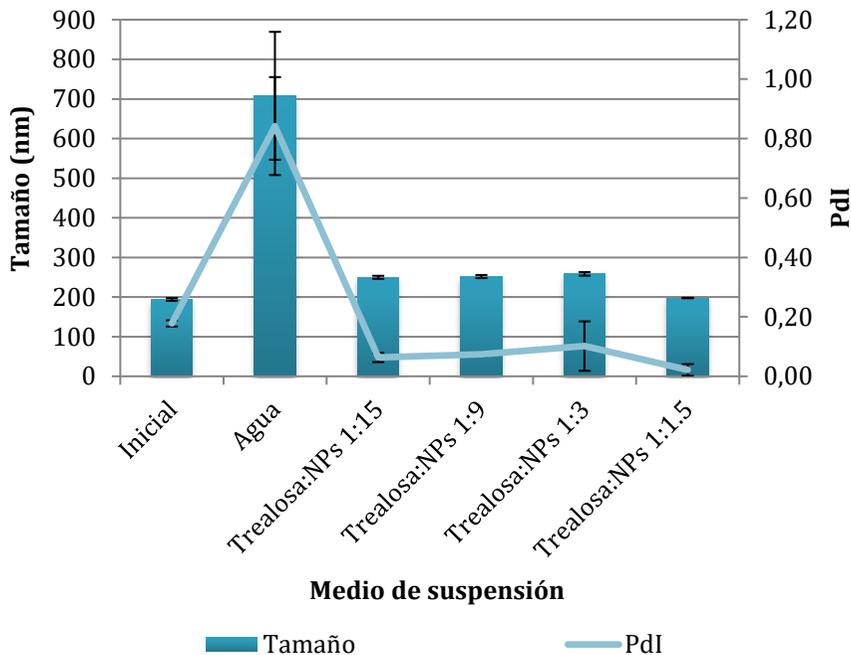


Figura 15. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de trealosa en el tamaño y dispersión de las partículas tras un proceso de congelación.

Como se observa en la figura 15, sólo aquellas partículas congeladas en una proporción trealosa:NPs mantuvieron tanto un tamaño como una distribución de tamaños prácticamente iguales a las NPs frescas. Las NPs resuspendidas en el resto proporciones trealosa:NPs aumentaron ligeramente su tamaño y, en determinados casos (trehalosa:NPs 1:3) el PDI aumentó de manera significativa lo que indica que, aunque el tamaño no aumente destacadamente, se trata de una muestra polidispersas con carácter heterogéneo. Las muestras resuspendidas en agua aumentaron su tamaño de manera significativa, así como su índice de polidispersión, resaltando la necesidad de la inclusión de un crioprotector en el medio de suspensión de las NPs para conservar los tamaños de las formulaciones.

De manera ilustrativa, la figura 16 muestra los histogramas de los tamaños y distribución de tamaños obtenidos para las NPs antes de la congelación, tras la congelación sin crioprotector y después del proceso con diferentes concentraciones de crioprotector. Como se puede observar, sólo las partículas congeladas con una proporción de trealosa:NPs de 1:1.5, mantienen un tamaño prácticamente igual al que presentaban antes de la congelación.

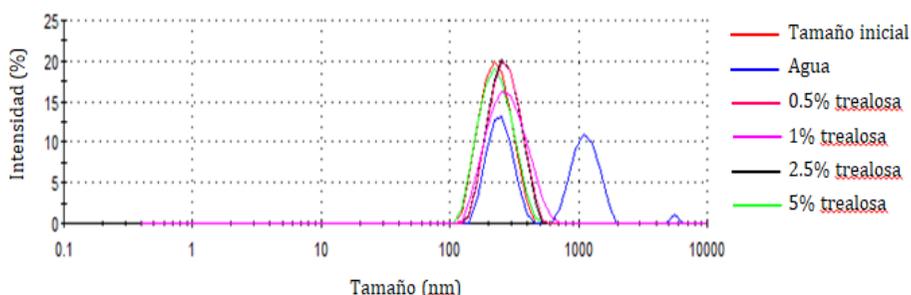


Figura 16. Histogramas de tamaños para las NPs después de un proceso de congelación resuspendidas en diferentes medios.

Para estudiar la influencia de la adición de crioprotector a las formulaciones sobre el proceso de liofilización, se llevó a cabo el mismo estudio, representado en la figura 17.

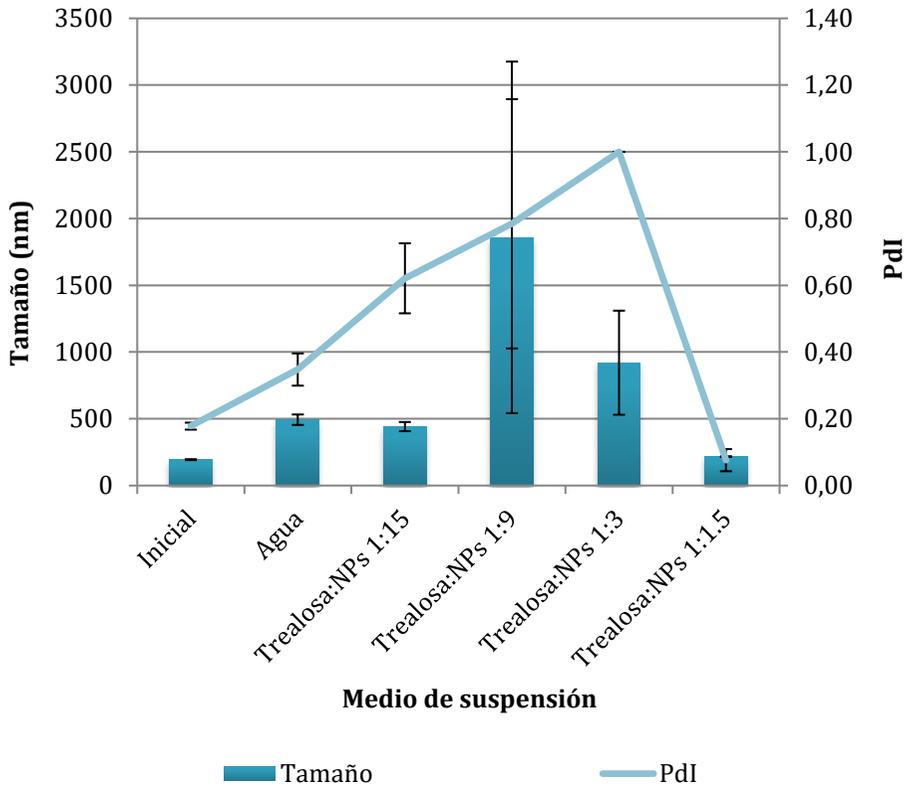


Figura 17. Influencia de la adición de diferentes concentraciones de trealosa en el tamaño medio de las partículas tras un proceso de liofilización.

En este caso, y de forma similar al estudio del efecto de la congelación, aquellas partículas liofilizadas con una proporción de trealosa:NPs 1:1.5 mantuvieron un tamaño muy similar al de las partículas frescas. El resto de formulaciones exhibieron un aumento de tamaño, con valores altos de polidispersión que se traducen en un aumento de la heterogeneidad de la muestra.

Tal y como se expone en el caso anterior, la figura 18 ilustra los resultados del estudio a través de los histogramas obtenidos tras el proceso de liofilización para todas las condiciones, y como se aprecia, el histograma perteneciente a las NPs liofilizadas con una proporción de trealosa:NPs de 1:1.5 coincide con el

correspondiente previo a la liofilización. Para ambos ensayos, el estudio de la influencia de crioprotector se midió con un Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments).

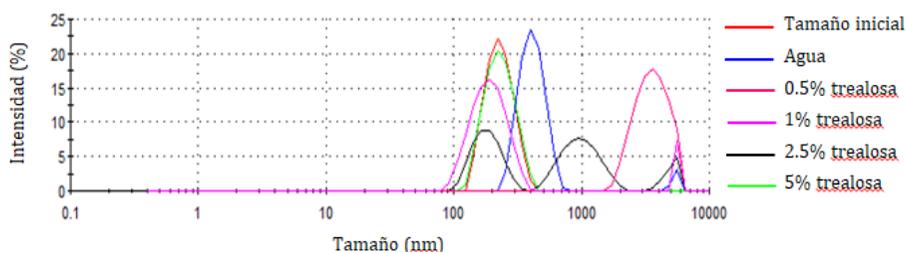


Figura 18. Histogramas de tamaños para las NPs después de un proceso de liofilización resuspendidas en diferentes medios.

Por tanto, según los resultados obtenidos, se establece que la proporción óptima de trealosa:NPs para mantener la integridad morfológica de las NPs es de 1:1.5.

5.1.7 Estudio de liberación *in vitro*

Los principales mecanismos de liberación de fármacos desde partículas poliméricas son: (a) erosión de la superficie de la matriz polimérica, (b) rotura de los enlaces entre monómeros y (c) difusión del fármaco encapsulado o en la superficie de la partícula a través de poros o a través de la matriz polimérica. Generalmente, cuando se trata de polímeros hidrófobos, la liberación está gobernada principalmente por la erosión, no obstante, la liberación del fármaco suele darse por una combinación de los tres mecanismos (Kamaly et al. 2016).

De acuerdo con Fredenberg et al. (Fredenberg et al. 2011), numerosos factores como las interacciones entre moléculas de activo y fármaco-polímero o la absorción de agua, pueden influir

en la velocidad de liberación y el comportamiento cinético de los fármacos encapsulados en partículas poliméricas de PLGA.

Los perfiles de liberación de VLX encapsulada en NPs (5,5% de carga de fármaco) poliméricas de PLGA están representados en la figura 19.

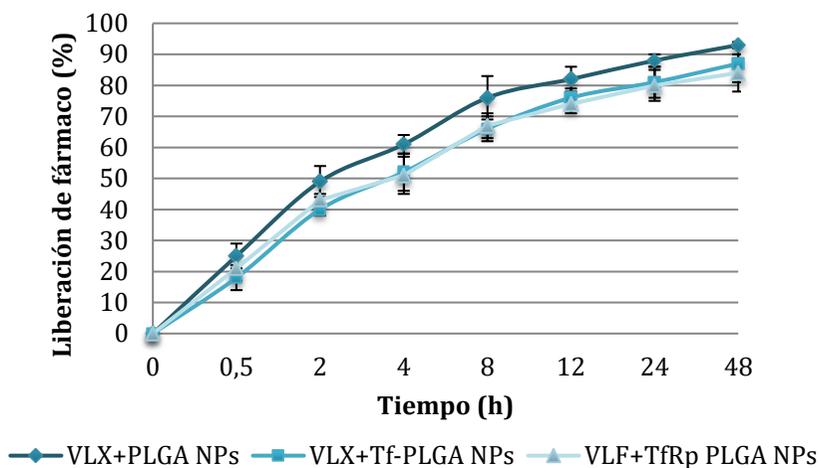


Figura 19. Perfiles de liberación *in vitro* para NPs no modificadas y modificadas superficialmente (n=3; barras de error:DE).

Tras 30 minutos, las NPs cargadas con VLX muestran una liberación marcada (sobre el 23%) a pH fisiológico (pH 7.4) lo que puede ser atribuido al carácter hidrofílico del activo. La liberación continúa de forma gradual hasta las 48 h. Al final del estudio, el porcentaje de fármaco liberado es, superior al 90%, mientras que para las NPs funcionalizadas el % de fármaco liberado fue inferior al 85% transcurridas las 48 h.

Tomando las NPs no funcionalizadas como referencia, la presencia de ligandos en la superficie de las partículas puede conllevar un descenso en la tasa de liberación cuando se comparan con partículas no modificadas superficialmente (Zhu, Zhang, and Yu

2017). Así, para cada tiempo establecido, se observa una disminución de la liberación, que puede estar asociada a la presencia de una “barrera adicional” formada por los ligandos de la superficie.

5.1.8 Estabilidad de las NPs en líquido cefalorraquídeo

Los sistemas nanotransportadores de fármacos de tipo polimérico son excelentes plataformas para la liberación controlada del activo. Dicha liberación puede extenderse horas, días o semanas (Berrocoso et al. 2017) en función del tipo de polímero empleado por ello, es de vital importancia estudiar la estabilidad de las partículas en los fluidos biológicos a lo largo del tiempo.

En este trabajo, la estabilidad se evaluó en el fluido de mayor presencia en el sistema nervioso central, el líquido cefalorraquídeo durante 24 h con el fin de garantizar tamaños e índices de polidispersión similares tras el tiempo de incubación cuando las NPs sean empleadas para los ensayos *in vivo*. El estudio se llevó a cabo a 37 °C y, como se resume en la Fig. 20, todas las formulaciones estudiadas mostraron alta estabilidad con tamaños e índices de polidispersión semejantes a los observados antes de las 24 h de incubación, demostrando que las partículas pueden emplearse con garantía en aplicaciones *in vivo*.

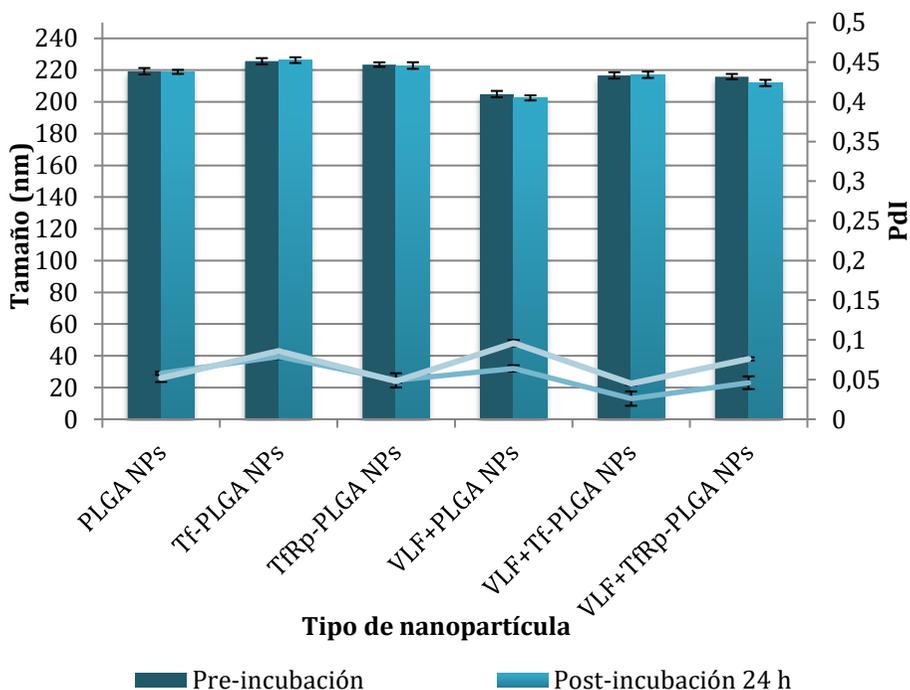


Figura 20. Tamaño y PDI de las partículas antes y después de la incubación en LCR durante 24 h (n = 3; barras de error =DE).

5.1.9 Estudios *in vitro* de toxicidad celular

A pesar de la aprobación por parte de la FDA para el uso del polímero biodegradable empleado para la elaboración de las NPs y la comercialización de muchos productos farmacológicos con base de PLGA resulta trascendental evaluar la toxicidad de las NPs para confirmar la inocuidad de todos los compuestos que forman parte de la formulación y descartar su empleo si resultaran tóxicos para las células. Para ello, se evaluó la citotoxicidad a través de un ensayo colorimétrico desarrollado en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos.

Dado que el objetivo que se quiere alcanzar es la llegada de las NPs al cerebro, en el ensayo se emplearon células endoteliales

humanas de la BHE (hCMEC/D3), que posteriormente se usaran como base para la construcción de un modelo *in vitro* de barrera para estudiar la permeabilidad a través de la misma.

En el estudio se evaluó la actividad metabólica celular cuando las células endoteliales eran incubadas con diferentes formulaciones de partículas, incluyendo NPs cargadas con fármaco funcionalizadas y sin funcionalizar, así como aquellas formulaciones sin fármaco (conjugadas superficialmente y sin conjugar) en un rango de concentraciones comprendido entre 0.1 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dichas concentraciones de partículas se corresponden con valores entre 0.0125 – 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fármaco para las partículas cargadas. Como control positivo, es decir, en el que todas las células murieran, se empleó Triton[®] X-100, este detergente resulta tóxico para las células ya que su grupo polar interfiere con el enlace de hidrógeno presente en la bicapa lipídica, produciendo una disrupción de la membrana (Koley and Bard 2010). Para validar el estudio, se empleó además un control negativo, usando únicamente medio de cultivo en contacto con las células. Los resultados quedan resumidos en la figura 21.

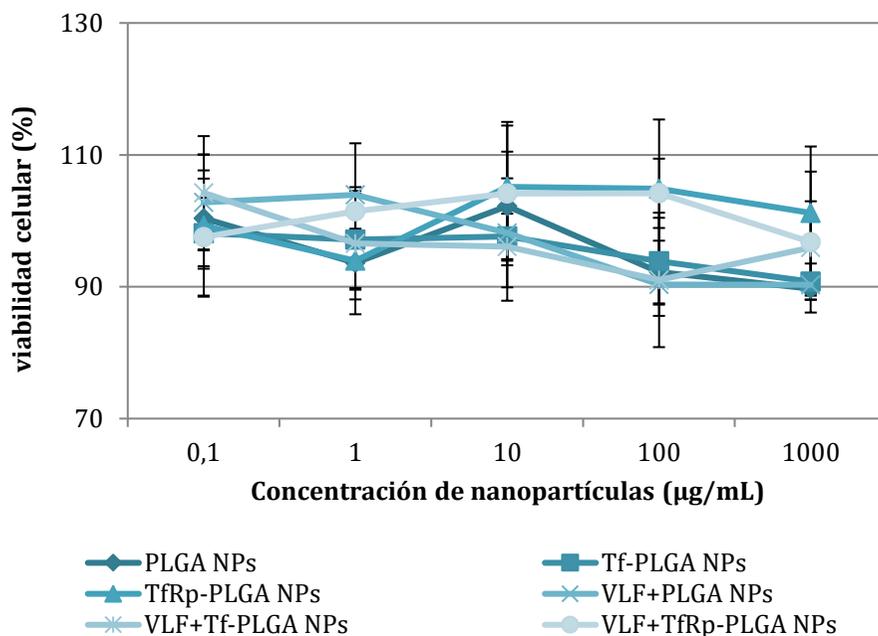


Figura 21. Viabilidad celular en células hCMEC/D3 tras la incubación con NPs de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con VLX, a diferentes concentraciones durante 24 h.

Tras 24 h de incubación con las partículas, el porcentaje de células vivas fue superior al 85% en todas las formulaciones testadas, mostrando valores de viabilidad comprendidos entre 85% - 100%, lo que demuestra que las partículas blancas sin funcionalizar exhiben una viabilidad similar a las partículas cargadas y funcionalizadas, evidenciando la baja toxicidad de las formulaciones a las concentraciones ensayadas.

5.1.10 Estudios *in vitro* de internalización celular

El éxito de la farmacoterapia actual depende, en gran medida, de la llegada del fármaco a la célula, tejido u órgano diana para ejercer la acción correspondiente. En los sistemas de administración tradicionales, una vez el fármaco llega a sangre, se

distribuye por todo el cuerpo para alcanzar el lugar de acción, sin embargo, a menudo activos farmacológicos con efectos beneficiosos en determinados órganos pueden resultar perjudiciales para el resto. Como ejemplo de mejora en los sistemas de administración, se presenta la doxorubicina, un efectivo agente anticanceroso con marcado efecto cardiotoxico (Ichikawa et al. 2014) debido a la acumulación de hierro en las mitocondrias de los cardiomiocitos. Comercializada desde 1996, fue el primer fármaco comercializado en forma de liposomas de tamaño nanométrico. Aunque ofrece numerosas ventajas con respecto a la formulación tradicional, no presenta un direccionamiento activo (Anselmo and Mitragotri 2014) y, por ello, se sigue investigando con nanosistemas funcionalizados capaces de contribuir a la mejora en la farmacoterapia tumoral y la disminución de los efectos adversos del activo (Chanphai, Thomas, and Tajmir-Riahi 2018)(Xia et al. 2018). Así, dirigir los nanosistemas de manera activa al sitio de acción es fundamental para favorecer el efecto farmacológico y disminuir los efectos secundarios.

Los efectos terapéuticos de las partículas como nanosistemas transportadores de fármacos depende en gran medida de su internalización y posterior retención en las células deseadas y, aunque los procesos *in vivo* pueden diferir de los procesos *in vitro* de manera sustancial, los ensayos *in vitro* pueden aportar evidencias preliminares de las ventajas que suponen el uso de estos sistemas como vehículos de fármacos. En el presente trabajo, las partículas fueron funcionalizadas con dos ligandos específicos contra el receptor de Tf para estudiar la captación de las

NPs por las células endoteliales y promocionar su paso a través de la BHE, usando células humanas endoteliales de la BHE (hCMEC/d3). De manera concreta, se estudiaron las posibles diferencias en la captación celular de las NPs fluorescentes sin modificar y modificadas con los dos ligandos específicos (Tf o TfRp).

En primer lugar, la captación celular de las NPs se evaluó a través de microscopía confocal (estudio cualitativo). La citometría de flujo se estableció como ensayo cuantitativo para confirmar los resultados obtenidos en el estudio cualitativo. Las figuras 21 y 22 muestran los resultados obtenidos en ambos experimentos.

Como puede observarse en la figura 22, todas las formulaciones son capaces de interactuar con las células endoteliales de la BHE ya que, células sin tratamiento con NPS usadas como control, no mostraron autofluorescencia. Sin embargo, la mayor intensidad de fluorescencia se observa en las células incubadas con las partículas funcionalizadas con el péptido. Este hecho puede atribuirse a la entrada masiva de NPs, lo que sugiere una mayor captación de este tipo de partículas por las hCMEC/D3. Resultados similares se pueden encontrar en la literatura publicada (Chang et al. 2009)(Gomes et al. 2017).

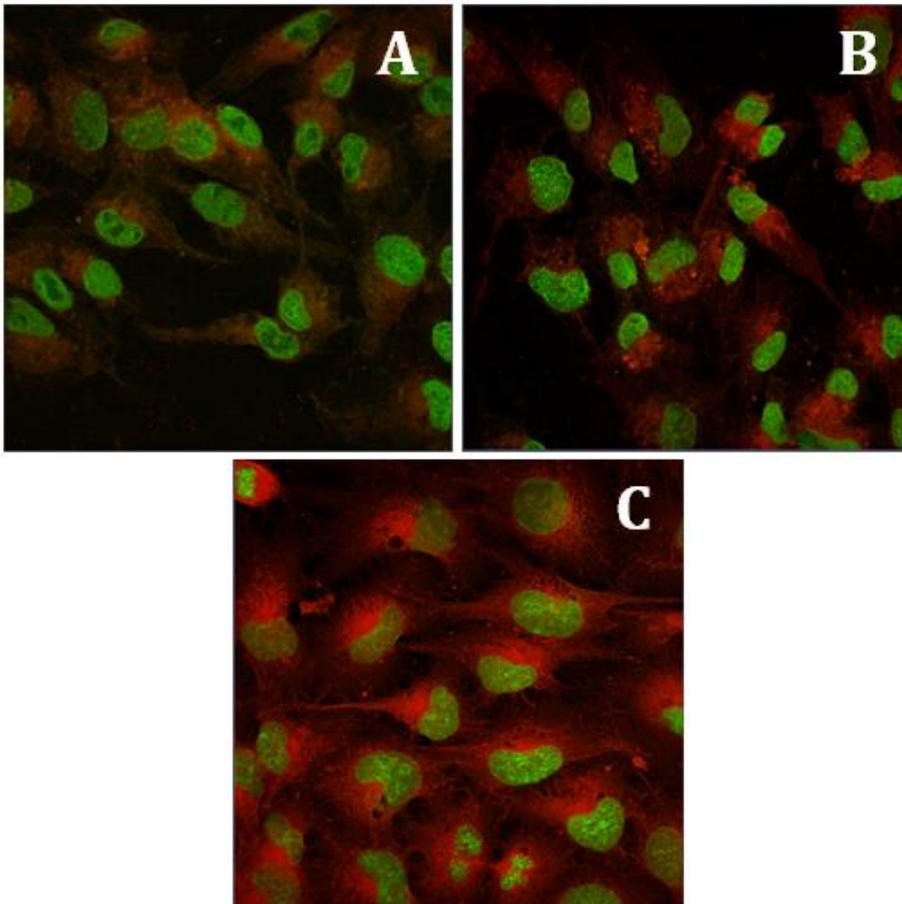


Figura 22. Estudio cualitativo de captación celular. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células hCMEC/D3 después de 30 minutos de incubación con diferentes formulaciones de NPs de PLGA cargadas con NR a 37 °C. (A) NPs no modificadas superficialmente; (B) NPs modificadas con Tf; (C) NPs modificadas con TfRp.

En base a los resultados, se puede concluir que la funcionalización de las partículas con el péptido proporciona una mayor captación celular tras la incubación con las células endoteliales.

Con el fin de confirmar el estudio visual y valorar de manera cuantitativa la captación celular, se empleó la citometría de flujo.

Para ello, 1 mL de los diferentes tipos de NPs (50 µg/mL) se incubaron durante 30 minutos con las células hCMEC y las células sin NPs fueron usadas como control negativo. Como ilustra la figura 23, la intensidad de fluorescencia es mayor para las NPs funcionalizadas (figuras 23C-23D) en comparación con las NPs sin funcionalizar, sin embargo, en concordancia con los estudios cualitativos, el valor más intenso de fluorescencia se alcanzó tras la incubación con NPs modificadas superficialmente con TfRp.

El aumento de la captación celular *in vitro* de NPs funcionalizadas con diferentes ligandos como proteínas, péptidos, anticuerpos, aptámeros o polímeros ha sido previamente informado por otros investigadores (Hu et al. 2011)(Huang et al. 2017)(Carroll et al. 2010)(Tosi et al. 2007)(Monaco et al. 2017)(J. Guo et al. 2011).

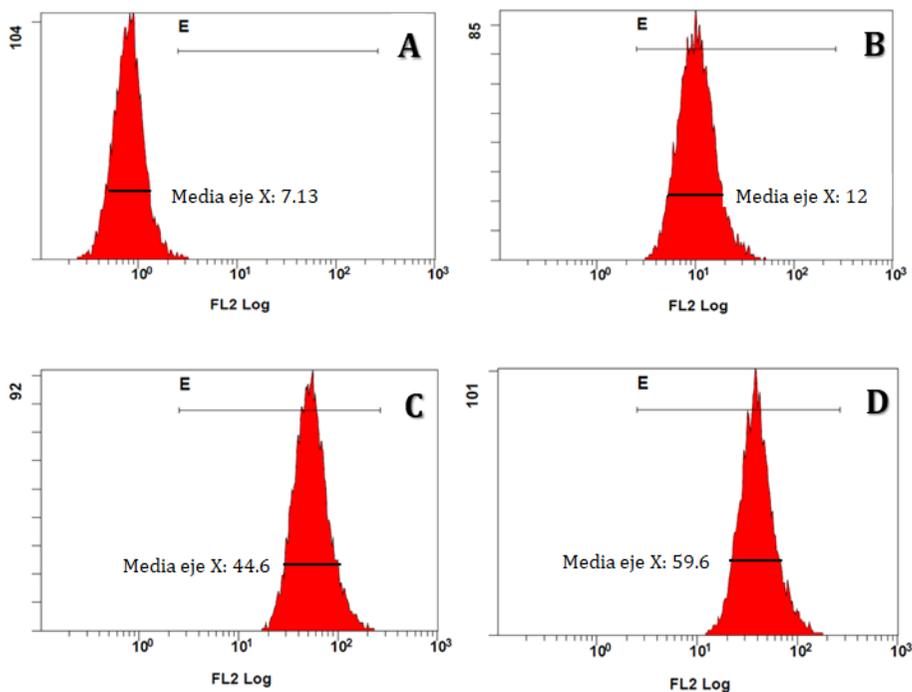


Figura 23. Histogramas obtenidos tras el estudio cuantitativo de la fluorescencia por citometría de flujo en las células hCMEC/D3 tras 30 minutos de incubación con diferentes formulaciones de NPs cargadas con NR. (A) Control (células sin NPs); (B) NPs de PLGA no modificadas superficialmente; (C) NPs de PLGA modificadas con Tf; (D) NPs de PLGA modificadas con TfRp.

Por tanto, como resumen de esta sección se puede concluir que ambos estudios respaldan la hipótesis de que la funcionalización con ligandos específicos para receptores localizados en el lugar de acción puede contribuir a mejorar la interacción célula-nanopartícula, promoviendo así la captación celular de las mismas por endocitosis mediada por receptor.

5.1.11 Estudios de permeabilidad a través de un modelo de barrera *in vitro*

La BHE es uno de los principales obstáculos que deben superar los activos farmacéuticos para acceder al SNC. Dicha

barrera protege al cerebro de la entrada de sustancias patógenas pero, al mismo tiempo limita el ingreso de numerosos fármacos. Por tanto, aunque la permeabilidad a través de la misma puede verse afectada por numerosas enfermedades como el infarto cerebral, la esclerosis múltiple, epilepsia o tumores cerebrales (Weiss et al. 2009), la presencia de la misma supone una dificultad para el tratamiento de los trastornos neurológicos.

Para evidenciar la llegada de las NPs y fármaco al cerebro a través de la BHE, se desarrolló un modelo de barrera *in vitro* de tipo monocultivo empleando las mismas células endoteliales empleadas para los ensayos de captación celular.

4.1.1.1 Modelo *in vitro* de BHE

Para determinar la integridad y la calidad de la BHE, se midió la resistencia transendotelial eléctrica (TEER) cada dos días, durante 8 días. Este parámetro es esencial para asegurar unas características apropiadas de barrera y evitar falsos positivos (Stab et al. 2016).

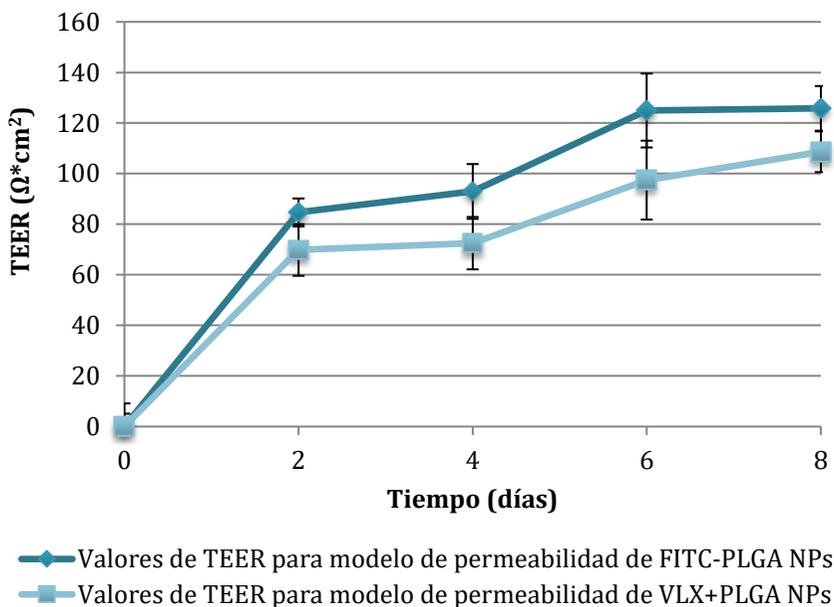


Figura 24. Valores de TEER de las células hCMEC/D3 cultivadas en insertos Transwell de 0.4 μm para ambos experimentos. (n=9) (barras de error:DE)

Tras la construcción de la barrera, el día del experimento (8^o día) los valores de TEER oscilaron entre 110-120 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Dichos valores resultan adecuados ya que, de acuerdo con la literatura publicada, estos valores son suficientes para estudiar la permeabilidad de los activos farmacéuticos ya que, valores de TEER por encima de 150 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ no interfieren en la permeabilidad del fármaco, no se traduce necesariamente en una disminución de la misma cuando se emplean modelos monocultivos (Wilhelm and Krizbai 2014).

Pasado el tiempo de incubación (en medio de cultivo) de las diferentes formulaciones de NPs en el modelo de barrera *in vitro*, la TEER se midió de nuevo para verificar que la barrera se mantiene intacta, mostrando la misma integridad y calidad que al inicio del experimento.

Los valores de TEER (pre- y post-incubación) para ambos experimentos están representados en la figura 25.

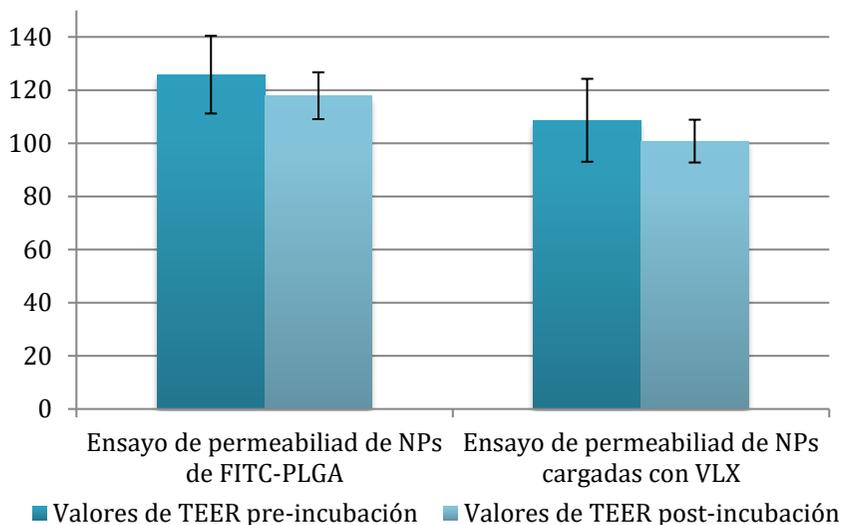


Figura 25. Valores de TEER para ambos experimentos de permeabilidad (NPs y fármaco) antes y después de la incubación con las NPs.

Como puede dilucidarse, a partir de la figura 25, la integridad de la barrera no se vio afectada tras el contacto con las diferentes formulaciones de NPs, por lo que se determina que la TEER se mantiene durante todo el experimento y los resultados de permeabilidad son fiables.

La principal ventaja de los modelos endoteliales de barrera de tipo monocultivo es la simplicidad (Wilhelm and Krizbai 2014), sin embargo, pueden mostrar valores bajos de TEER debido a la ausencia de pericitos, astrocitos y otros elementos de la unidad neurovascular. Para solventarlo, pueden emplearse modelos co-cultivos pero éstos presentan numerosas desventajas ya que no mantienen el ambiente neuronal de manera permanente y

manifiestan baja reproducibilidad, son más costoso y su caracterización es compleja (Kaisar et al. 2017). Por lo tanto, los modelos monocultivos resultan más adecuados y útiles para realizar evaluaciones preliminares de permeabilidad de fármacos a través de la BHE (Wolff et al. 2015).

Inicialmente, según el procedimiento descrito en la sección 3.2.12.3.2 se midió la intensidad de fluorescencia y se calculó el porcentaje de NPs en el lado basolateral (Figura 26). Para ello, se tomó como referencia de fluorescencia total la mostrada por la misma concentración de los diferentes tipos de partículas fluorescentes (3 mg/mL) añadida directamente al lado basolateral. Se asume que dicha concentración supone el 100% de fluorescencia si todas las NPs atravesaran la barrera. Los resultados se presentan como porcentaje de partículas en función del porcentaje de fluorescencia mostrado por la concentración total. La permeabilidad se evaluó tras 1, 6, 8, 12 y 24 h.

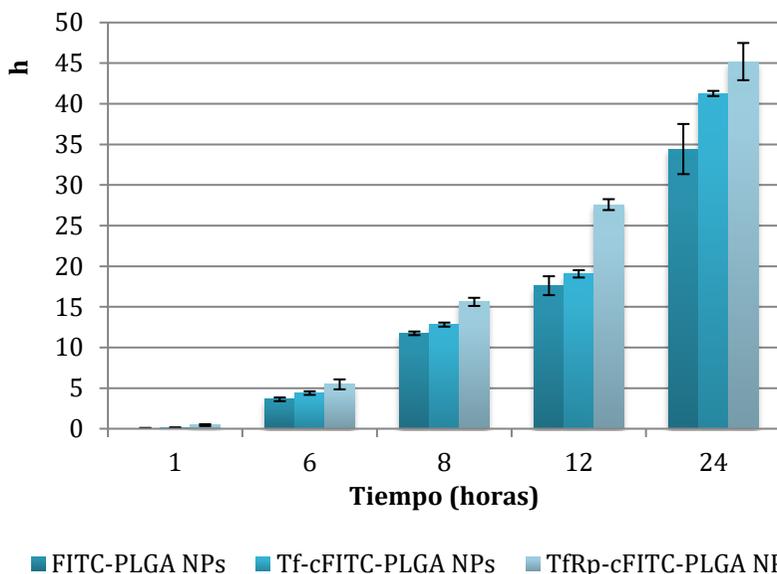


Figura 26. Porcentaje de NPs fluorescentes (funcionalizadas y no funcionalizadas) en el lado basolateral después de los tiempos predeterminados.

Tal y como se observa en el gráfico, las NPs funcionalizadas con el TfRp mostraron una capacidad mayor para atravesar la BHE. Tal y como se demostró en los ensayos *in vitro* de captación celular, las NPs funcionalizadas con TfRp fueron las que exhibieron la mayor capacidad de captación, lo que podría explicar esta mayor habilidad para atravesar la barrera. Para todas las formulaciones, el porcentaje de partículas fluorescentes aumentó a lo largo del tiempo en la parte basolateral. A las 24 h, aproximadamente el 45% de las NPs fluorescentes funcionalizadas con TfRp atravesaron la barrera del modelo.

Se realizó un análisis multifactorial para verificar el efecto sobre la permeabilidad de las NPs de ambos factores, tanto el tipo de formulación testada como el tiempo prefijado para leer la fluorescencia. Los resultados muestran un efecto significativo sobre

la permeabilidad cuando se emplean diferentes formulaciones, $F(3, 75) = 186.549$ y $p < 0.001$ y diferentes tiempos, $F(4, 75) = 3838.531$ y $p < 0.001$. Así mismo, se observó una interacción significativa entre ambos factores ($F(8, 75) = 34.078$), indicando que la influencia de la variable tiempo sobre la permeabilidad es diferente para las diferentes formulaciones ensayadas.

Para la evaluación de la permeabilidad del fármaco, el mismo protocolo fue llevado, aunque, en este caso, el ensayo se extendió hasta las 72 h con el fin de evaluar la posible inducción de la glicoproteína-P por parte del activo. Tras la incubación con las NPs cargadas con VLX sin funcionalizar y funcionalizadas y VLX libre (añadida en la misma concentración que la encapsulada en NPs), a los tiempos prefijados (1, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 h), se midió la concentración de fármaco en el lado basolateral. Para ese fin, se empleó un método doble de cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas (UHPLC-MS/MC), detallado en el apartado 4.2.12.4.2.

El comportamiento observado en el ensayo de permeabilidad es similar al que se determinó en el estudio de liberación. Aunque las partículas funcionalizadas con el péptido demostraron una mayor capacidad para alcanzar la parte basolateral, muestran la liberación más lenta de fármaco (Figura 27). De acuerdo con Zhu et al. (Zhu, Zhang, and Yu 2017), las NPs funcionalizadas mostraron una velocidad de liberación más lenta comparadas con las que no funcionalizadas.

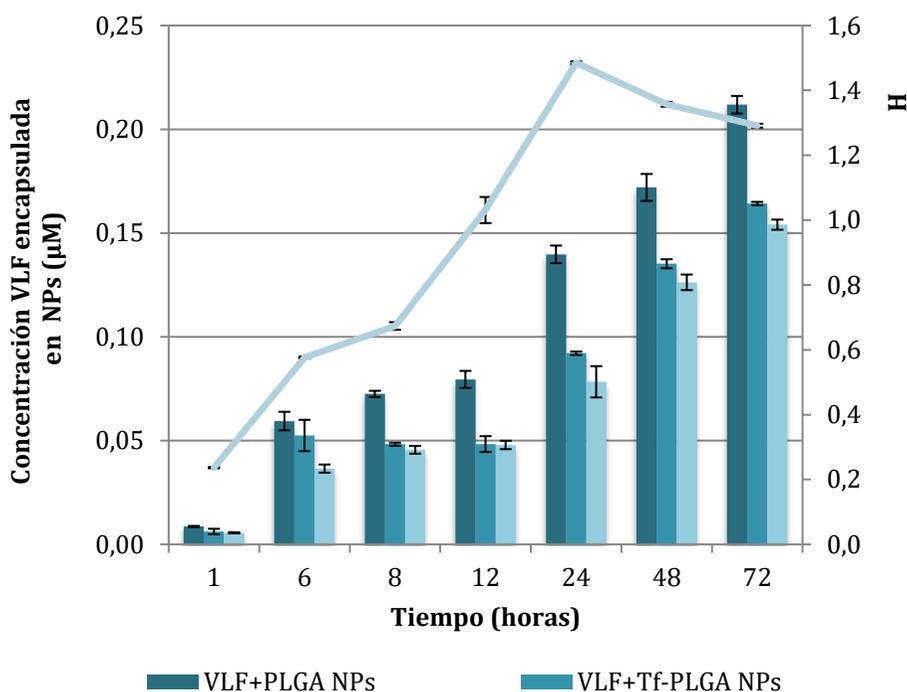


Figura 27. Concentraciones de fármaco en lado basolateral de diferentes formulaciones (VLX libre, NPs cargadas con VLX sin funcionalizar y funcionalizadas con Tf o TfRp).

A las 8 y 12 h, la liberación de fármaco a partir de las NPs funcionalizadas es similar para ambas formulaciones mientras que la mayor diferencia se encuentra a las 24 h.

Bachmeier et al (Bachmeier et al. 2011), demostraron que a determinadas concentraciones (1 - 50 µM), la VLX es un inductor de las bombas de eflujo como la glicoproteína-P. Un comportamiento semejante se demuestra en este estudio ya que, tras alcanzarse una concentración de fármaco libre superior a 1 µM en el lado basolateral (24 h), se observa un descenso en la concentración de activo en dicho compartimento (48 y 72 h). Dicho descenso puede estar motivado por la acción de la glicoproteína-P, que, tras ser inducida provoca la salida del activo en sentido basolateral-apical.

Sin embargo, cuando la VLX está encapsulada en NPs, la concentración en el lado basolateral no alcanza concentraciones que provoquen la inducción de la glicoproteína-P y la concentración de VLX sigue aumentando de manera gradual con el tiempo.

Tras el tiempo ensayo (24h para en ensayo de permeabilidad de las NPs y 72 h para el de la VLX), se comprobó que los valores de TEER permanecieron entre 105-11 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, lo que indica que la integridad de la barrera se mantuvo y no se vio afectada por la presencia de las partículas (ni fármaco).

4.1.1.2 Evaluación de la llegada de las NPs al sistema nervioso central tras administración intravenosa

La BHE es una de las barreras más restrictivas del organismo dificultando el acceso de numerosos activos terapéuticos al SNC. Tras los resultados en los estudios previos *in vitro* de modelo de barrera, aquellas partículas funcionalizadas con el péptido fueron las que mostraron una mayor capacidad para atravesar la barrera. Para confirmar estos resultados, se diseñó un ensayo *in vivo* que confirmara la llegada de las partículas funcionalizadas al cerebro tras una administración intravenosa.

Para ello, se administraron nanopartículas de FITC-PLGA no funcionalizadas y funcionalizadas con Tf y TfRp en ratones C57bl/6 (12-15 semanas de vida) vía intravenosa en la vena de la cola a una concentración de 65 o 130 mg/kg de NPs (equivalentes a 9 y 18 mg/kg de VLX, respectivamente) en una administración aguda y 65 mg/kg de NPs (9 mg VLX) y tras ser perfundidos (ver apartado 4.2.13.1), las secciones de cerebro y bazo se criaron usando un

microscopio confocal para la evaluación de la llegada al cerebro de los dos tipos de NPs funcionalizadas con los dos ligandos específicos en comparación con las NPs no funcionalizadas. Como control un grupo de animales fueron tratados con PBS.

Tras un cuidadoso cribado por microscopía confocal de la corteza cerebral, las estructuras subcorticales y diencefálicas analizadas, no se pudo demostrar la presencia de ningún tipo NPs en el parénquima cerebral (Figura 28).

Tal y como se puede observar en la figura 28, no existen diferencias en la fluorescencia del tejido cerebral entre aquellas muestras procedentes de ratones tratados con PBS (grupo control) (Figura 28A) y los tratados con diferentes tipos de NPs (Figura 28B-D). Los mismos resultados se obtuvieron tras la evaluación de la fluorescencia pasadas 4 h y tras una administración crónica a ambas concentraciones (datos no mostrados).

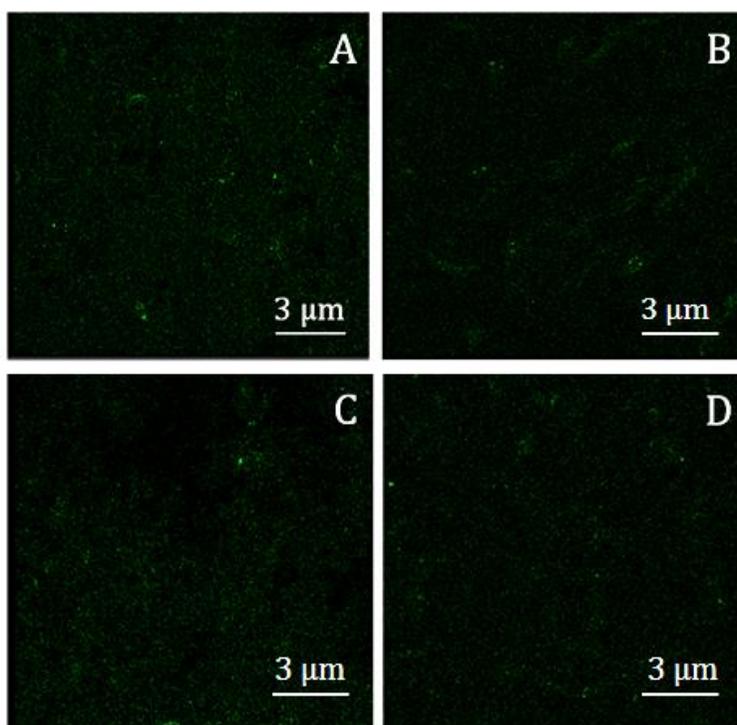


Figura 28. Imágenes de microscopía confocal de secciones de cerebro en ratones control (A) y tras 24 h de una administración aguda (130 mg/kg) de NPs fluorescentes no funcionalizadas (B), funcionalizadas con Tf (C) y funcionalizadas con TfRp (D). Escala: 3 μm .

A modo de ejemplo, se muestran imágenes de secciones del bazo tras 4 h de una administración intravenosa de NPs no funcionalizadas. Las imágenes fueron tomadas con objeto de comparar el grado de presencia de partículas en el bazo frente a las encontradas en el cerebro.

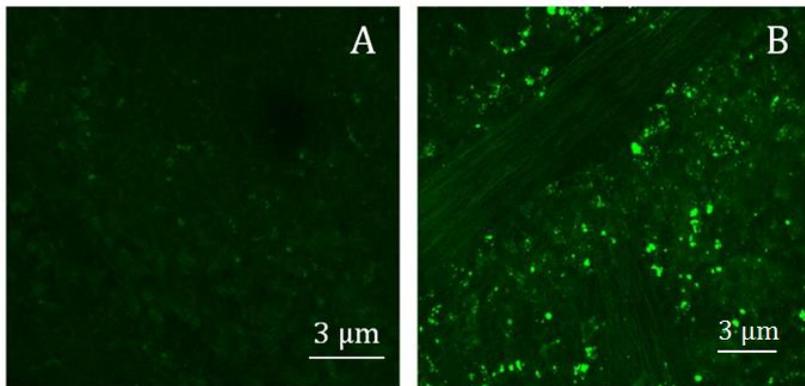


Figura 29. Imágenes de microscopía confocal de secciones de bazo en ratones control tratados con PBS (A) y tras 4 h de una administración aguda (65 mg/kg) de NPs fluorescentes no funcionalizadas (B). Escala: 3 µm.

Como se esperaba, se advirtió una diferencia notable de fluorescencia con respecto a los grupos de animales tratados con PBS únicamente, atribuida a la llegada de las NPs al bazo (Figura 29).

Dado que no se encontraron diferencias en el grado de fluorescencia mediante microscopía confocal en el parénquima cerebral de los animales control frente a los tratados, se realizó un examen adicional mediante citometría de flujo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a través de microscopía confocal y en los ensayos de permeabilidad *in vitro* y con el fin de reducir el empleo de animales, la fluorescencia fue analizada en muestras de cerebro tratados con NPs funcionalizadas con TfRp, comparada con la demostrada por los tejidos control.

En este estudio se ensayaron dos concentraciones diferentes de partículas correspondientes a 65 mg/kg y 130 mg/kg de VLX tras 4 y 24 h tras una administración intravenosa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

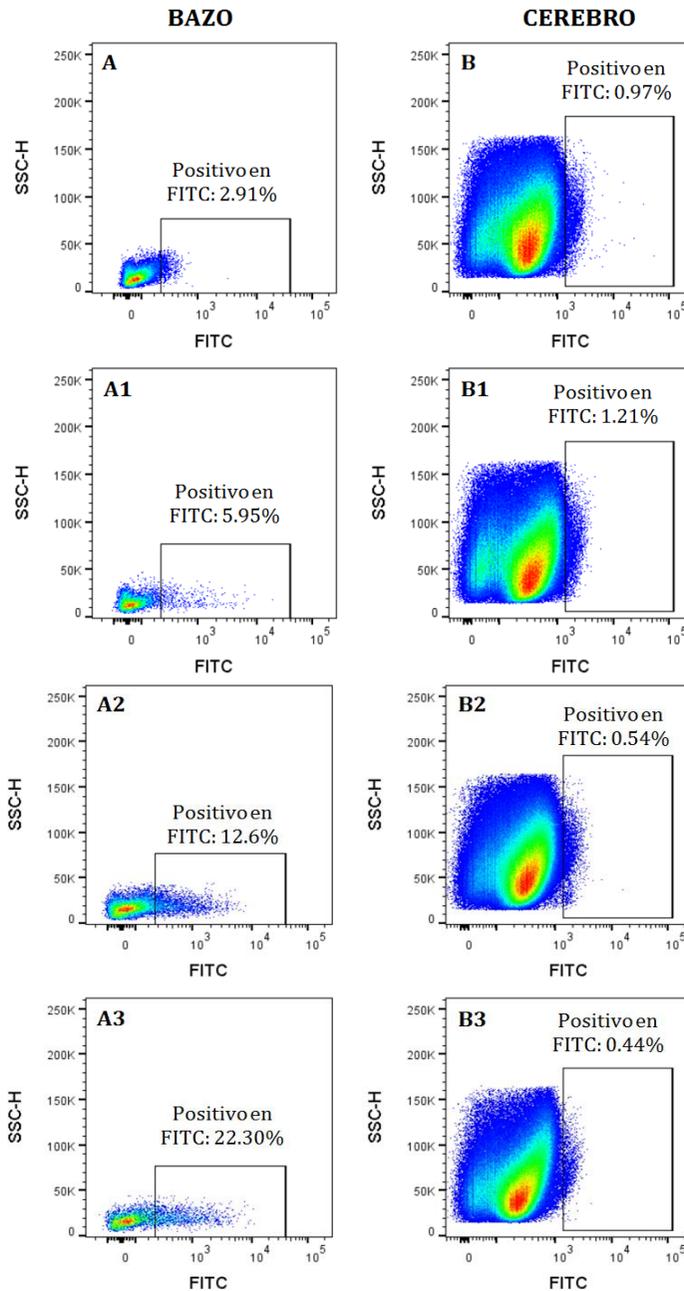


Figura 30. Comparación de histogramas de cerebro (izquierda) y bazo (derecha) obtenidos tras el análisis de citometría de flujo de tejidos control (A, B), tejidos tratados crónicamente con 65 mg/kg de partículas (A1, B1) tejidos con tratamiento agudo con 65 mg/kg de partículas (después de 4 h) (A2, B2) y tejidos con tratamiento agudo de 130 mg/kg (después de 4 h).

En primer lugar, para las muestras provenientes del bazo, se puede observar una fluorescencia basal del 2.91%, lo que puede atribuirse a la autofluorescencia del propio tejido. Tras la administración aguda de 65 mg/kg de partículas, se observa un aumento de la fluorescencia (12.6%), que, prácticamente se duplica cuando se dobla la dosis inicial administrada (22.3%). En cuanto a la administración crónica, aunque la fluorescencia aumenta ligeramente, este incremento no es tan acusado como el observado tras las administraciones agudas.

Respecto a las muestras de cerebro, no se observó ninguna diferencia con respecto al control en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que sugiere que la estrategia propuesta no resultó efectiva para vehicular el activo al SNC.

A la luz de los resultados obtenidos, se decide investigar la vía intranasal para la administración de las diferentes formulaciones propuestas.

4.1.1.3 Evaluación de la biodistribución de las NPs en el organismo tras administración intranasal

Como se ha citado con anterioridad, la BHE se considera uno de los principales obstáculos para el tratamiento de las enfermedades que afectan al sistema nervioso central, sin embargo, la administración intranasal se presenta como una ruta prometedora para eludir la barrera y se considera una excelente alternativa no invasiva para la administración de fármacos en el cerebro (Z. Liu et al. 2013). Por lo tanto, en este apartado se muestran los resultados obtenidos por citometría de flujo tras

administrar de los diferentes tipos de NPs (NPs de FITC-PLGA no funcionalizadas y funcionalizadas con Tf y TfRp, así como NPs de PLGA-PEG).

Para la evaluación de la biodistribución y según descrito en el punto 3.2.13.2 se emplearon animales C57bl/6 (6-8 semanas) a los que se les administró 15 μ L de las formulaciones mencionadas anteriormente (30 mg/kg). Tras 30 min, se recogió bazo, corazón, cerebro, pulmones, hígado y riñones que fueron analizados citofluorimétricamente tras su homogeneización.

Para eliminar la autofluorescencia de cada tejido, la fluorescencia de los órganos del grupo control se estableció como basal, ajustándola individualmente (según órgano) y se comparó con la fluorescencia emitida por los tejidos de los grupos tratados (grupos 1, 2, 3 y 4).

Los datos fueron normalizados en función del porcentaje total de fluorescencia mostrado por todos los órganos, expresándose como la relación de fluorescencia de cada tejido en relación con la suma de la fluorescencia de todos los tejidos analizados (Durán-Lobato et al. 2014). Los resultados se representan gráficamente en la figura 31.

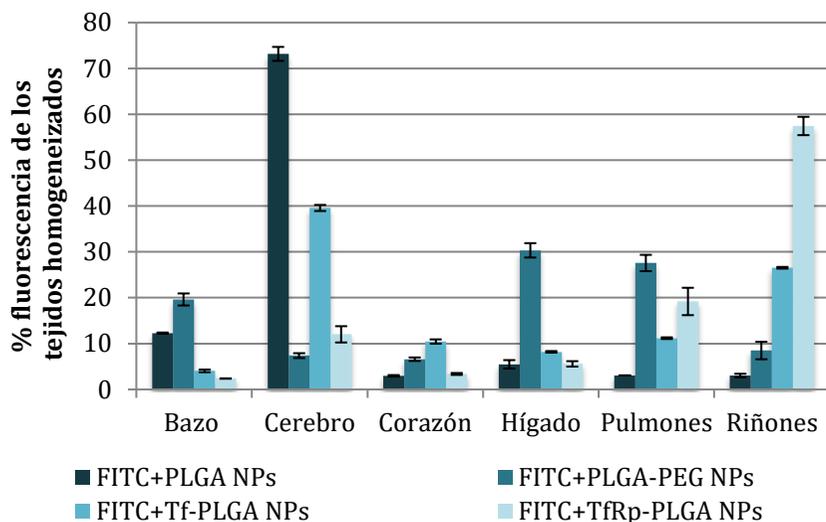


Figura 31. Representación gráfica del porcentaje de fluorescencia de cada órgano normalizado con respecto al total de fluorescencia de los órganos estudiados (n=4; barras de error: DE: barras de error).

En la figura 31, se refleja la biodistribución experimentada por las diferentes formulaciones de NPs fluorescentes. La presencia más notable de NPs en el cerebro se observa para aquella formulación de NPs poliméricas fluorescentes no funcionalizadas en su superficie, que presentaron un 70% frente un 40% de las de Tf y un 14% de las de péptido. En estudios desarrollados por otros autores, se presenta estudia la influencia de la densidad de ligando en la superficie de la NPs, Deng et al. observaron que, con altas densidades de ligando, la partículas presentaban mayor susceptibilidad a ser retenidas por receptores de Tf (H. Deng, Dutta, and Liu 2018). Concretamente, demostraron que las NPs con altas densidades de ligando ($> 1935/\mu\text{m}^2$) permanecen fuertemente unidas al receptor mientras que para las que poseen densidades menores, son capaces de liberarse del complejo ligando-receptor. Esta particularidad podría explicar la baja presencia de las NPs

funcionalizadas con Tf o TfRp en el cerebro, ya que, aunque la modificación superficial resultó efectiva, se obtuvieron densidades de ligando por encima de los $2500/\mu\text{m}^2$ y, debido a esto, pueden quedar retenidas en los receptores de Tf de las neuronas olfatorias.

Con respecto al resto de formulaciones, aquellas funcionalizadas con los ligandos específicos también parecen atravesar la barrera, aunque en menor medida. Se asume que, las partículas con un tamaño de partícula inferior a 200 nm, generalmente se transportan por endocitosis mediada por caveolas, mientras que aquellas con tamaños comprendidos entre 200-1000 nm, sufren endocitosis mediada por clatrina (SL et al. 2017)(Aderibigbe 2018).

Las NPs pegiladas, con un tamaño superior a 230 nm y una dispersión de tamaños de 0.154 ± 0.007 no consiguen atravesar la barrera, circunstancia que puede atribuirse a que el paso de partículas mayores de 200 nm a través de la vía *nose-to-brain* después una administración intranasal resulta infructuoso, ofreciendo un transporte intracelular y paracelular pobre (Katare et al. 2015)(Tong, Qin, and Sun 2017). Sin embargo, aparecen en mayor medida en hígado, pulmones y bazo.

Como control y con objeto de cuantificar el % de fluorescencia que mostraría el cerebro en función de la fluorescencia presentada si llegara el 100% de las partículas, se inyectó directamente la dosis total (15 μL de NPs equivalente a.. una dosis de 30 mg/kg) en los cerebros perfundidos tomando dicha fluorescencia como 100%. El ensayo se realizó con todas las formulaciones de partículas con objeto de comparar las diferentes intensidades de fluorescencia de cada una de ellas.

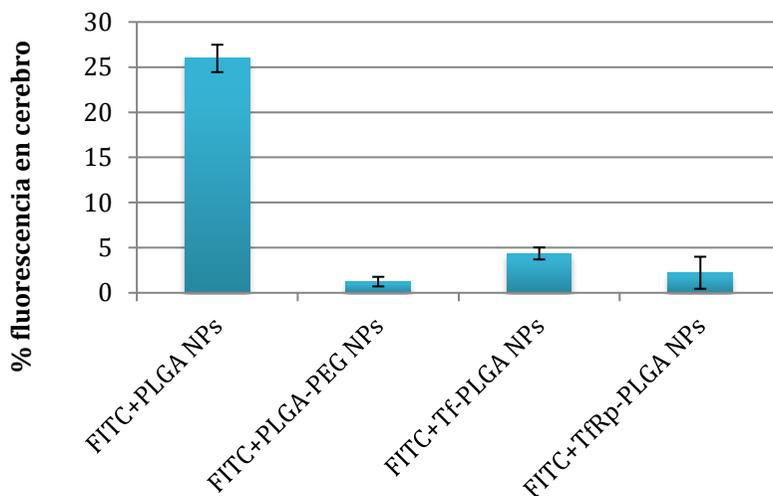


Figura 32. Porcentaje de fluorescencia mostrado por cada formulación de NPs en relación al porcentaje de fluorescencia tras una inyección directa de la dosis total.

En base a la gráfica 32, las NPs no funcionalizadas fueron las que se detectaron en mayor medida en el cerebro ya que, con respecto al 91.48% encontrado para la dosis total de partículas administradas, más de un 25% es localizado en el tejido cerebral. Dicho porcentaje se reduce para aquellas formulaciones modificadas superficialmente, que, aunque exhiben una intensidad de fluorescencia mayor, no alcanzan el cerebro tan eficientemente. Las NPs PEGiladas, apenas superan el 1% de fluorescencia en el cerebro en relación con la fluorescencia de la dosis total (85.76%) lo que sugiere la dificultad para alcanzar el tejido por parte de esta formulación, probablemente motivado, como se ha citado con anterioridad por el mayor diámetro que muestras (~230 nm).

A expensas de futuros estudios de comportamiento *in vivo*, y en vista de los resultados, obtenidos se puede concluir que, aunque los resultados *in vivo* no se corresponden con los resultados obtenidos *in vitro* (posiblemente provocado por la presencia de

otros factores en el ambiente *in vivo*), los resultados obtenidos demuestran que los sistemas elaborados presentan propiedades fisicoquímicas adecuadas, resultando aquellas NPs sin funcionalizar como una posible alternativa para la administración de fármacos al SNC. Además, la funcionalización superficial se llevó a cabo con éxito y puede emplearse en futuros trabajos, por ejemplo en la terapia anticancerosa.

6 CONCLUSIONS

The main objective of this research work has been to develop a polymeric biodegradable and biocompatible system in nanometric range in order to improve brain drug delivery in central nervous system, limited by the presence of the blood-brain barrier. For this purpose, a dual-action antidepressant used as a hydrophilic model drug and specific ligands against transferrin receptor for surface-functionalization were employed. To reach this goal, partial objectives were established and the conclusions are structured by following the same structure:

1. Particles were successfully prepared by double emulsion-solvent evaporation method, without aggregations.

1.1. Regarding particle size, for non-functionalized polymeric nanoparticles, sizes below 200 nm were obtained, except for pegylated nanoparticles, which exhibit a higher size (~230 nm). Generally, size increased when particles were functionalized with both ligands.

For all formulations, polydispersity index was less than 0.2, indicating a monodisperse particles population with high degree of homogeneity.

SEM images of polymeric nanoparticles presented spherical shape without any agglomeration.

1.2. After washing, nanoparticles exhibit zeta potential about -25 mV. This value is appropriate to ensure the NPs stability and avoid the aggregation. Zeta potential was closer to neutrality when nanoparticles were functionalized due to partial occupation of carboxylic groups.

1.3. Encapsulation efficiency values were maintained about 48%. After surface modification, there is no drug release at detectable concentrations by HPLC. Therefore, it may consider that the functionalization does not involve loss of drug.

For drug loading, this parameter increased when initial concentration was increased.

2. Carbodiimide strategy results in an effective surface-modification method.

2.1. For transferrin-functionalization, 7.5-8 μg per mg of nanoparticle was bounded, which means 75-80% of encapsulation efficiency and for anti-TfR peptide conjugation, 7 μg per mg of nanoparticle was detected (70% of encapsulation efficiency). These results were similar after functionalization of fluorescent particles.

3. Different concentrations of trealose as cryoprotectant were tested to conserve the integrity of nanoparticles after freezing and lyophilization process. It was conclude that the optimal proportion of trehaloseNPs to ensure the homogeneity and size was 1:1.5.

4. In drug release studies, plain nanoparticles exhibited a higher release rate than functionalized nanoparticles, probably due to the presence of ligands on the surface. All formulations showed a gradual release along 48 h, caused by degradation of polymer matrix.

5. After incubation with artificial cerebrospinal fluid, all formulations results highly stable, maintaining a very similar size.

6. Regarding *in vitro* cell experiments with endothelial brain capillary cells (hCMEC/D3):
 - 6.1. In terms of cytotoxicity, for all concentrations tested, all nanoparticle types manifested viability cell above 85%, indicating low toxicity of drug, ligands and other components used in formulations.
 - 6.2. Concerning uptake cell studies, for quanti- and qualitative assays, functionalized nanoparticles demonstrated higher ability to interact with cells than plain nanoparticles. Specifically, this interact was greater for peptide-functionalized nanoparticles.
 - 6.3. Developed blood-brain barrier resulted suitable for permeability tests, keeping and adequate TEER values after nanoparticles incubation and with reference to permeability studies:
 - 6.3.1. Drug permeability is higher from plain nanoparticles compared with conjugated nanoparticles and the concentration continues to increase during the assay time. For free drug, p-glycoprotein was induced when determined concentrations are reached ($\sim 1 \mu\text{M}$), decreasing the free drug concentration in basolateral side.
 - 6.3.2. Regarding particles permeability and according to cell uptake assays, surface modified-nanoparticles with peptide showed the highest ability to cross the blood-brain barrier compared with plain NPs.
7. *In vivo* studies revealed that, after intravenous administration, particles were not able to cross the BBB. When particles were

administered by nose-to-brain pathway employing intranasal administration, most of plain nanoparticles were detected in brain, probably, due to their size (below 200 nm). Although surface modifications of nanoparticles did not improve the access to the brain in this work, a small population of them appears in this tissue and it can be exploited in future targeting studies because transferrin receptor is expressed in numerous tissues and overexpressed in cancer cells. Inversely, PEGylated nanoparticles with higher size than PLGA-NPs did not reach the brain.

As a sort of a summary, it can conclude that in this work, the method employed for particle preparation to encapsulate a hydrophilic model drug was optimized, obtaining nanoparticles population with suitable physicochemical characteristics and different strategies to reach the brain was used. Although further experiments must be realized to confirm the results, through nose-to-brain employing intranasal administration it was achieved the access of plain particles to the brain

Additionally, a surface modification method was efficiently developed, which can be employed as strategy to cancer targeting therapy.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, Wassim, Ghania Degobert, Serge Stainmesse, and Hatem Fessi. 2006. "Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (15): 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2006.09.017>.
- Acharya, Sanjeev R., and Padmanabha R V Reddy. 2016. "Brain Targeted Delivery of Paclitaxel Using Endogenous Ligand." *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (3): 427–38. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.11.121>.
- Aderibigbe, Blessing Atim. 2018. "In Situ-Based Gels for Nose to Brain Delivery for the Treatment of Neurological Diseases." *Pharmaceutics* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020040>.
- Aisen, Philip. 2004. "Transferrin Receptor 1." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (11): 2137–43. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2004.02.007>.
- Alagusundaram, M, B Chengaiah, K Gnanaprakash, S Ramkanth, C Madhusudhana Chetty, and D Dhachinamoorthi. 2010. "Nasal Drug Delivery System -an Overview." *Article in International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences Int. J. Res. Pharm. Sci* 1 (4): 454–65.
- Alam, M. Intakhab, Sarwar Beg, Abdus Samad, Sanjula Baboota, Kanchan Kohli, Javed Ali, Alka Ahuja, and M. Akbar. 2010. "Strategy for Effective Brain Drug Delivery." *European Journal*

of Pharmaceutical Sciences 40 (5): 385–403.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.003>.

Almalik, Abdulaziz, Ibrahim Alradwan, Mohd Abul Kalam, and Aws Alshamsan. 2017. "Effect of Cryoprotection on Particle Size Stability and Preservation of Chitosan Nanoparticles with and without Hyaluronate or Alginate Coating." *Saudi Pharmaceutical Journal* 25 (6): 861–67.
<https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2016.12.008>.

Alyautdin, Renad, Igor Khalin, Mohd Ismail Nafeeza, Muhammad Huzaimi Haron, and Dmitry Kuznetsov. 2014. "Nanoscale Drug Delivery Systems and the Blood-Brain Barrier." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 795–811.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S52236>.

Amin, Md Lutful. 2013. "P-Glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery." *Drug Target Insights* 2013 (7): 27–34.
<https://doi.org/10.4137/DTI.S12519>.

Amoozgar, Zohreh, and Yoon Yeo. 2012. "Recent Advances in Stealth Coating of Nanoparticle Drug Delivery Systems." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 4 (2): 219–33.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1157>.

Anderson, Bradley D. 1996. "Prodrugs for Improved CNS Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 19 (2): 171–202.
[https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00106-H](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00106-H).

Anselmo, Aaron C, and Samir Mitragotri. 2014. "An Overview of

Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems.”
*Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled
Release Society* 190 (September): 15–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>.

Appelt-Menzel, Antje, Alevtina Cubukova, Katharina Günther, Frank Edenhofer, Jörg Piontek, Gerd Krause, Tanja Stüber, Heike Walles, Winfried Neuhaus, and Marco Metzger. 2017. “Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells.” *Stem Cell Reports* 8 (4): 894–906.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.021>.

Apte, S. 2010. “Selecting Surfactants for the Maximum Inhibition of the Activity of the Multidrug Resistance Efflux Pump Transporter , P-Glycoprotein : Conceptual Development .” *The Journal of Excipients and Food Chemicals* 1 (3): 51–59.

Aranaz, Inmaculada, Ines Paños, Carlos Peniche, Ángeles Heras, Niuris Acosta, Inmaculada Aranaz, Ines Paños, Carlos Peniche, Ángeles Heras, and Niuris Acosta. 2017. “Chitosan Spray-Dried Microparticles for Controlled Delivery of Venlafaxine Hydrochloride.” *Molecules* 22 (11): 1980.
<https://doi.org/10.3390/molecules22111980>.

Attwell, David, Anusha Mishra, Catherine N Hall, Fergus M O ’farrell, and Turgay Dalkara. n.d. “What Is a Pericyte?”
<https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>.

Azad, Tej D, James Pan, Ian D Connolly, Austin Remington, Christy

- M Wilson, and Gerald A Grant. 2015. "Therapeutic Strategies to Improve Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier." *Neurosurgical Focus* 38 (3): E9. <https://doi.org/10.3171/2014.12.FOCUS14758>.
- Bachmeier, Corbin J., David Beaulieu-Abdelahad, Nowell J. Ganey, Michael J. Mullan, and Gary M. Levin. 2011. "Induction of Drug Efflux Protein Expression by Venlafaxine but Not Desvenlafaxine." *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 32 (4): 233–44. <https://doi.org/10.1002/bdd.753>.
- Baldomero, E Baca. 2006. "Coste-Efectividad de Venlafaxina En El Tratamiento de La Depresión y de La Ansiedad . Revisión Bibliográfica" 34 (3): 193–201.
- Bang, Seokyoung, Seung-Ryeol Lee, Jihoon Ko, Kyungmin Son, Dongha Tahk, Jungho Ahn, Changkyun Im, and Noo Li Jeon. 2017. "A Low Permeability Microfluidic Blood-Brain Barrier Platform with Direct Contact between Perfusable Vascular Network and Astrocytes." *Scientific Reports* 7 (1): 8083. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07416-0>.
- Bao, Hanmei, Xu Jin, Ling Li, Feng Lv, and Tianjun Liu. 2012. "OX26 Modified Hyperbranched Polyglycerol-Conjugated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Evaluation of Its Brain Delivery Ability." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (8): 1891–1901. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4658-7>.
- Bari, Naimat Kalim, Mohammad Fazil, Md Quamrul Hassan, Md Rafi

- Haider, Bharti Gaba, Jasjeet K. Narang, Sanjula Baboota, and Javed Ali. 2015. "Brain Delivery of Bupirone Hydrochloride Chitosan Nanoparticles for the Treatment of General Anxiety Disorder." *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.041>.
- Batrakova, E.V., and A.V. Kabanov. 2013. "Cell-Mediated Drug Delivery to the Brain." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 23 (5): 419–33. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(13\)50061-X](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50061-X).
- Batrakova, Elena V, Howard E Gendelman, and Alexander V Kabanov. 2011. "Cell-Mediated Drug Delivery." *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (4): 415–33. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.559457>.
- Béduneau, Arnaud, Patrick Saulnier, and Jean Pierre Benoit. 2007. "Active Targeting of Brain Tumors Using Nanocarriers." *Biomaterials* 28 (33): 4947–67. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.011>.
- Bell, Genevieve A., and Debra Ann Fadool. 2017. "Awake, Long-Term Intranasal Insulin Treatment Does Not Affect Object Memory, Odor Discrimination, or Reversal Learning in Mice." *Physiology & Behavior* 174 (May): 104–13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.044>.
- Berrocso, Esther, Raquel Rey-Brea, Mercedes Fernández-Arévalo, Juan Antonio Micó, and Lucía Martín-Banderas. 2017. "Single Oral Dose of Cannabinoid Derivate Loaded PLGA Nanocarriers

Relieves Neuropathic Pain for Eleven Days.” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 13 (8): 2623–32. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2017.07.010>.

Bhaskar, Sonu, Furong Tian, Tobias Stoeger, Wolfgang Kreyling, Jesús M. de la Fuente, Valeria Grazú, Paul Borm, Giovani Estrada, Vasilis Ntziachristos, and Daniel Razansky. 2010. “Multifunctional Nanocarriers for Diagnostics, Drug Delivery and Targeted Treatment across Blood-Brain Barrier: Perspectives on Tracking and Neuroimaging.” *Particle and Fibre Toxicology* 7: 1–25. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-3>.

Bi, Chenchen. 2016. “Intranasal Delivery of Rotigotine to the Brain with Lactoferrin-Modified PEG-PLGA Nanoparticles for Parkinson’s Disease Treatment,” 6547–59. <https://doi.org/10.2147/IJN.S120939>.

Bickel, Ulrich, Takayoshi Yoshikawa, and William M. Pardridge. 2001. “Delivery of Peptides and Proteins through the Blood-Brain Barrier.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1–3): 247–79. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00139-3).

Blasi, Paolo, Stefano Giovagnoli, Aur??lie Schoubben, Maurizio Ricci, and Carlo Rossi. 2007. “Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (6): 454–77. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.011>.

Bodor, Nicholas, and Peter Buchwald. 1999. “Recent Advances in

the Brain Targeting of Neuropharmaceuticals by Chemical Delivery Systems.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 36 (2–3): 229–54. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00090-8).

Bonaccorso, A., T. Musumeci, M.F. Serapide, R. Pellitteri, I.F. Uchegbu, and G. Puglisi. 2017. “Nose to Brain Delivery in Rats: Effect of Surface Charge of Rhodamine B Labeled Nanocarriers on Brain Subregion Localization.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 154 (June): 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.035>.

Bonakdar, M., P. M. Graybill, and R. V. Davalos. 2017. “A Microfluidic Model of the Blood–brain Barrier to Study Permeabilization by Pulsed Electric Fields.” *RSC Advances* 7 (68): 42811–18. <https://doi.org/10.1039/C7RA07603G>.

Botner, Shafir, and Amnon C. Sintov. 2011. “Intranasal Delivery of Two Benzodiazepines, Midazolam and Diazepam, by a Microemulsion System.” *Pharmacology & Pharmacy* 02 (03): 180–88. <https://doi.org/10.4236/pp.2011.23026>.

Bouchard, P.R., R.M. Hutabarat, and K.M. Thompson. 2010. “Discovery and Development of Therapeutic Aptamers.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50 (1): 237–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105547>.

Brabazon, Fiona, Colin M Wilson, Shalini Jaiswal, John Reed, William H Frey, and Kimberly R Byrnes. 2017. “Intranasal Insulin Treatment of an Experimental Model of Moderate Traumatic Brain Injury.” *Journal of Cerebral Blood Flow &*

Metabolism 37 (9): 3203–18.
<https://doi.org/10.1177/0271678X16685106>.

Brasnjevic, Ivona, Harry W M Steinbusch, Christoph Schmitz, and Pilar Martinez-Martinez. 2009. “Delivery of Peptide and Protein Drugs over the Blood-Brain Barrier.” *Progress in Neurobiology* 87 (4): 212–51.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.12.002>.

Bregoli, Lisa, Dania Movia, James D. Gavigan-Imedio, Joanne Lysaght, John Reynolds, and Adriele Prina-Mello. 2016. “Nanomedicine Applied to Translational Oncology: A Future Perspective on Cancer Treatment.” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12 (1): 81–103.
<https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.08.006>.

Brown, R E, K L Jarvis, and K J Hyland. 1989. “Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances.” *Analytical Biochemistry* 180 (1): 136–39.

Buchwald, Peter, and Nicholas Bodor. 2016. “Brain-Targeting Chemical Delivery Systems and Their Cyclodextrin-Based Formulations in Light of the Contributions of Marcus E. Brewster.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (9): 2589–2600. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2016.04.007>.

Caban, S, E Aytakin, A Sahin, and Y Capan. 2014. “Nanosystems for Drug Delivery.” *OA Drug Design and Delivery* 2 (1): 1–7.

Cabezón, Itsaso, Gemma Manich, Raquel Martín-Venegas, Antoni Camins, Carme Pelegrí, and Jordi Vilaplana. 2015. “Trafficking

of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood-Brain Barrier.” *Molecular Pharmaceutics* 12 (11): 4137–45. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00597>.

Cabezas, Ricardo, Marcos Ávila, Janneth Gonzalez, Ramon Santos El-Bachá, Eliana Báez, Luis Miguel García-Segura, Juan Camilo, et al. 2014. “CELLULAR NEUROSCIENCE Astrocytic Modulation of Blood Brain Barrier: Perspectives on Parkinson’s Disease.” <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>.

Callaghan, Richard, Frederick Luk, and Mary Bebawy. 2014. “Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy?” *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (4): 623–31. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.056176>.

Calzolari, Alessia, Luigi Maria Larocca, Silvia Deaglio, Veronica Finisguerra, Alessandra Boe, Carla Raggi, Lucia Ricci-Vitani, et al. 2010. “Transferrin Receptor 2 Is Frequently and Highly Expressed in Glioblastomas.” *Translational Oncology* 3 (2): 123–34. <https://doi.org/10.1593/TLO.09274>.

Campos, Patrícia Mazureki, Maria Vitória Lopes Badra Bentley, and Vladimir P. Torchilin. 2016. “Nanopreparations for Skin Cancer Therapy.” In *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*, 1–28. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42863-7.00001-3>.

Carroll, Richard T, Deepak Bhatia, Werner Geldenhuys, Ruchi

- Bhatia, Nicholas Miladore, Anupam Bishayee, and Vijaykumar Sutariya. 2010. "Brain-Targeted Delivery of Tempol-Loaded Nanoparticles for Neurological Disorders." *Journal of Drug Targeting* 18 (October 2009): 665–74. <https://doi.org/10.3109/10611861003639796>.
- Cayero-Otero, Maria Dolores, Ana M. Espinosa-Oliva, Antonio J. Herrera, Irene Garcia-Dominguez, Mercedes Fernandez-Arevalo, Lucia Martin-Banderas, and Rocio M. de Pablos. 2018. "Potential Use Of Nanomedicine For The Anti-Inflammatory Treatment Of Neurodegenerative Diseases." *Current Pharmaceutical Design* 24 (April). <https://doi.org/10.2174/1381612824666180403113015>.
- Cetin, Meltem, Alptug Atila, Selma Sahin, and Imran Vural. 2013. "Preparation and Characterization of Metformin Hydrochloride Loaded-Eudragit®RSPO and Eudragit®RSPO/PLGA Nanoparticles." *Pharmaceutical Development and Technology* 18 (3): 570–76. <https://doi.org/10.3109/10837450.2011.604783>.
- Chan, Ken Y, Min J Jang, Bryan B Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu, Luis Sánchez-Guardado, et al. 2017. "Engineered AAVs for Efficient Noninvasive Gene Delivery to the Central and Peripheral Nervous Systems." *Nature Neuroscience* 20 (8): 1172–79. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>.
- Chang, Jiang, Youssef Jallouli, Maya Kroubi, Xu bo Yuan, Wei Feng, Chun sheng Kang, Pei yu Pu, and Didier Betbeder. 2009.

“Characterization of Endocytosis of Transferrin-Coated PLGA Nanoparticles by the Blood-Brain Barrier.” *International Journal of Pharmaceutics* 379 (2): 285–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.035>.

Chanphai, P., T.J. Thomas, and H.A. Tajmir-Riahi. 2018. “Design of Functionalized Folic Acid–chitosan Nanoparticles for Delivery of Tetracycline, Doxorubicin, and Tamoxifen.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, March, 1–7.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1445559>.

Charlton, S, N S Jones, S S Davis, and L Illum. 2007. “Distribution and Clearance of Bioadhesive Formulations from the Olfactory Region in Man: Effect of Polymer Type and Nasal Delivery Device.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 30 (3–4): 295–302.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.11.018>.

Chavan, Jyotsna D, and Johni D 'souza. n.d. “NEUROSURGICAL STRATEGY FOR DRUG DELIVERY TO BRAIN.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 4 (1).

Chen, Yan, and Lihong Liu. 2012. “Modern Methods for Delivery of Drugs across the Blood-Brain Barrier.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (7): 640–65.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>.

Chen, Yongmei, and Raymond A. Swanson. 2003. “Astrocytes and Brain Injury.” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23

(2): 137–49.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C>.

Cheng, Yifan, Olga Zak, Philip Aisen, Stephen C Harrison, and Thomas Walz. 2004. “Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex.” *Cell* 116 (4): 565–76.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00130-8).

Cho, Hansang, Ji Hae Seo, Keith H. K. Wong, Yasukazu Terasaki, Joseph Park, Kiwan Bong, Ken Arai, Eng H. Lo, and Daniel Irimia. 2015. “Three-Dimensional Blood-Brain Barrier Model for in Vitro Studies of Neurovascular Pathology.” *Scientific Reports* 5 (1): 15222. <https://doi.org/10.1038/srep15222>.

Chou, Ming-Li, Joe-Wei Wu, Flore Gouel, Aurélie Jonneaux, Kelly Timmerman, Ting-Yi Renn, Charlotte Laloux, et al. 2017. “Tailor-Made Purified Human Platelet Lysate Concentrated in Neurotrophins for Treatment of Parkinson’s Disease.” *Biomaterials* 142 (October): 77–89.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.018>.

Colin, Laura, and Adriana Gonzalez-villalva. 2012. “BLOOD -BRAIN BARRIER (BBB);” no. May 2014.

Cui, Yanna, Qingxing Xu, Pierce Kah Hoe Chow, Deping Wang, and Chi Hwa Wang. 2013. “Transferrin-Conjugated Magnetic Silica PLGA Nanoparticles Loaded with Doxorubicin and Paclitaxel for Brain Glioma Treatment.” *Biomaterials* 34 (33): 8511–20.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.075>.

Czupalla, Cathrin J., Stefan Liebner, and Kavi Devraj. 2014. “In Vitro

Models of the Blood–Brain Barrier.” In , 415–37. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_34.

Danhier, Fabienne, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and Véronique Prémat. 2012a. “PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications.” *Journal of Controlled Release* 161 (2): 505–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.

Danhier, Fabienne, Eduardo Ansorena, Joana M Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and Véronique Prémat. 2012b. “PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications.” <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.

Danielyan, Lusine, Richard Schäfer, Andreas von Ameln-Mayerhofer, Felix Bernhard, Stephan Verleysdonk, Marine Buadze, Ali Lourhmati, et al. 2011. “Therapeutic Efficacy of Intranasally Delivered Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Parkinson Disease.” *Rejuvenation Research* 14 (1): 3–16. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1130>.

Darmostuk, Mariia, Silvie Rimpelova, Helena Gbelcova, and Tomas Ruml. 2015. “Current Approaches in SELEX: An Update to Aptamer Selection Technology.” *Biotechnology Advances* 33 (6): 1141–61. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.008>.

Das, Manasi, Fahima Dilnawaz, and Sanjeeb K. Sahoo. 2011. “Targeted Nutlin-3a Loaded Nanoparticles Inhibiting P53-

- MDM2 Interaction: Novel Strategy for Breast Cancer Therapy." *Nanomedicine* 6 (3): 489–507. <https://doi.org/10.2217/NNM.10.102>.
- Demetzos, Costas, and Natassa Pippa. 2014. "Advanced Drug Delivery Nanosystems (ADDnSs): A Mini-Review." *Drug Delivery* 21 (4): 250–57. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.844745>.
- Demeule, M., A. Regina, C. Che, J. Poirier, T. Nguyen, R. Gabathuler, J.-P. Castaigne, and R. Beliveau. 2007. "Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324 (3): 1064–72. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.131318>.
- Deng, Hua, Prashanta Dutta, and Jin Liu. 2018. "Stochastic Simulations of Nanoparticle Internalization through Transferrin Receptor Dependent Clathrin-Mediated Endocytosis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862 (9): 2104–11. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2018.06.018>.
- Deng, Yang, Jennifer K. Saucier-Sawyer, Christopher J. Hoimes, Junwei Zhang, Young Eun Seo, Jillian W. Andrejcsk, and W. Mark Saltzman. 2014. "The Effect of Hyperbranched Polyglycerol Coatings on Drug Delivery Using Degradable Polymer Nanoparticles." *Biomaterials* 35 (24): 6595–6602. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.038>.
- Dinarvand, R., N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani, and F.

- Atyabi. 2011. "Polylactide-Co-Glycolide Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Agents." *International Journal of Nanomedicine* 6: 877–95. <https://doi.org/10.2147/IJN.S18905>.
- Ding-Zhou, Li, Isabelle Margaille, Bruno Palmier, Didier Pruneau, Michel Plotkine, and Catherine Marchand-Verrecchia. 2003. "LF 16-0687 Ms, a Bradykinin B2 Receptor Antagonist, Reduces Ischemic Brain Injury in a Murine Model of Transient Focal Cerebral Ischemia." *British Journal of Pharmacology* 139 (8): 1539–47. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705385>.
- Djupesland, Per G., John C. Messina, and Ramy A. Mahmoud. 2014. "The Nasal Approach to Delivering Treatment for Brain Diseases: An Anatomic, Physiologic, and Delivery Technology Overview." *Therapeutic Delivery*. <https://doi.org/10.4155/tde.14.41>.
- Dong, Xiaowei. 2018. "Current Strategies for Brain Drug Delivery." *Theranostics* 8 (6): 1481–93. <https://doi.org/10.7150/thno.21254>.
- Doolittle, N D, M E Miner, W a Hall, T Siegal, E Jerome, E Osztie, L D McAllister, et al. 2000. "Safety and Efficacy of a Multicenter Study Using Intraarterial Chemotherapy in Conjunction with Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier for the Treatment of Patients with Malignant Brain Tumors." *Cancer* 88 (3): 637–47. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10970142\(20000201\)88:3<637::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)10970142(20000201)88:3<637::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Y) [pii].

- Dore-Duffy, Paula. 2008. "Pericytes: Pluripotent Cells of the Blood Brain Barrier." *Current Pharmaceutical Design* 14 (16): 1581–93. <https://doi.org/10.2174/138161208784705469>.
- Dore-Duffy, Paula, and Kristen Cleary. 2011. "Morphology and Properties of Pericytes." In , 49–68. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_2.
- Dube, Taru, Sonika Chibh, Jibanananda Mishra, and Jiban Jyoti Panda. 2017. "Receptor Targeted Polymeric Nanostructures Capable of Navigating across the Blood-Brain Barrier for Effective Delivery of Neural Therapeutics." *ACS Chemical Neuroscience* 8 (10): 2105–17. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00207>.
- Dur??n-Lobato, Matilde, Inmaculada Mu??oz-Rubio, M.??ngeles Holgado, Josefa ??lvarez-Fuentes, Mercedes Fern??ndez-Ar??valo, and Luc??a Mart??n-Banderas. 2014. "Enhanced Cellular Uptake and Biodistribution of a Synthetic Cannabinoid Loaded in Surface-Modified Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10 (6): 1068–79. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1806>.
- Dwibhashyam, V S N M, and A N Nagappa. 2008. "Strategies for Enhanced Drug DeliveDwibhashyam, V.S.N.M. & Nagappa, A.N., 2008. Strategies for Enhanced Drug Delivery to the Central Nervous System. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 70(2), Pp.145–53.Ry to the Central Nervous System." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70 (2): 145–53. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.41446>.

- Dziurkowska, Ewelina, and Marek Wesolowski. 2013. "Simultaneous Quantitation of Venlafaxine and Its Main Metabolite, O-Desmethylvenlafaxine, in Human Saliva by HPLC." *Journal of Separation Science* 36 (11): 1726–33. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300087>.
- Ehret, M. J., G. M. Levin, M. Narasimhan, and A. Rathinavelu. 2007. "Venlafaxine Induces P-Glycoprotein in Human Caco-2 Cells." *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 22 (1): 49–53. <https://doi.org/10.1002/hup.820>.
- Eigenmann, Daniela E, Gongda Xue, Kwang S Kim, Ashlee V Moses, Matthias Hamburger, and Mouhssin Oufir. 2013. "Comparative Study of Four Immortalized Human Brain Capillary Endothelial Cell Lines, HCMEC/D3, HBMEC, TY10, and BB19, and Optimization of Culture Conditions, for an in Vitro Blood–brain Barrier Model for Drug Permeability Studies." *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33>.
- Erdlenbruch, Bernhard, Claudia Schinkhof, Wilfried Kugler, Dagmar E.H. Heinemann, Jochen Herms, Hansjörg Eibl, and Max Lakomek. 2003. "Intracarotid Administration of Short-Chain Alkylglycerols for Increased Delivery of Methotrexate to the Rat Brain." *British Journal of Pharmacology* 139 (4): 685–94. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705302>.
- European Medicines Agency. 2014. *Quality Aspects of Nano-Based Medicines SME Workshop: Focus on Quality for Medicines Containing Chemical Entities*.

Eyal, Sara, Peng Hsiao, and Jashvant D. Unadkat. 2009. "Drug Interactions at the Blood-Brain Barrier: Fact or Fantasy?" *Pharmacology and Therapeutics* 123 (1): 80–104. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.03.017>.

Fatehi, Leili, Susan M Wolf, Jeffrey McCullough, Ralph Hall, Frances Lawrenz, Jeffrey P Kahn, Cortney Jones, et al. 2012. "Recommendations for Nanomedicine Human Subjects Research Oversight: An Evolutionary Approach for an Emerging Field HHS Public Access." *J Law Med Ethics* 40 (4): 716–50. <https://doi.org/10.1111/j.1748-720X.2012.00703.x>.

"FDA's Regulatory Science Program for Generic PLA/ PLGA-Based Drug Products | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology." n.d. Accessed August 30, 2018. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/188841-FDA-s-Regulatory-Science-Program-for-Generic-PLA-PLGA-Based-Drug-Products/>.

Fornaguera, C., A. Dols-Perez, G. Calderó, M. J. García-Celma, J. Camarasa, and C. Solans. 2015. "PLGA Nanoparticles Prepared by Nano-Emulsion Templating Using Low-Energy Methods as Efficient Nanocarriers for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier." *Journal of Controlled Release* 211: 134–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.002>.

Fornaguera, Cristina, and Maria José García-Celma. n.d. "Personalized Medicine Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale."

<https://doi.org/10.3390/jpm7040012>.

Fredenberg, Susanne, Marie Wahlgren, Mats Reslow, and Anders Axelsson. 2011. "The Mechanisms of Drug Release in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Drug Delivery Systems - A Review." *International Journal of Pharmaceutics* 415 (1–2): 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.

Fullstone, G., S. Nyberg, X. Tian, and G. Battaglia. 2016. *From the Blood to the Central Nervous System: A Nanoparticle's Journey Through the Blood–Brain Barrier by Transcytosis*. *International Review of Neurobiology*. 1st ed. Vol. 130. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.06.001>.

Gabathuler, Reinhard. 2010. "Approaches to Transport Therapeutic Drugs across the Blood–brain Barrier to Treat Brain Diseases." *Neurobiology of Disease* 37 (1): 48–57. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.07.028>.

Gaillard, Pieter J, Corine C Visser, and Albertus G de Boer. 2005. "Targeted Delivery across the Blood–brain Barrier." *Expert Opinion on Drug Delivery* 2 (2): 299–309. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.299>.

Gao, Huile. 2016. "Progress and Perspectives on Targeting Nanoparticles for Brain Drug Delivery." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6 (4): 268–86. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.013>.

Gao, Huile, Jun Qian, Shijie Cao, Zhi Yang, Zhiqing Pang, Shuaiqi Pan, Li Fan, Zhangjie Xi, Xinguo Jiang, and Qizhi Zhang. 2012.

“Precise Glioma Targeting of and Penetration by Aptamer and Peptide Dual-Functioned Nanoparticles.” *Biomaterials* 33 (20): 5115–23.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.058>.

Gartziandia, Oihane, Susana Patricia Egusquiaguirre, John Bianco, José Luis Pedraz, Manoli Igartua, Rosa Maria Hernandez, Véronique Prémat, and Ana Beloqui. 2016. “Nanoparticle Transport across in Vitro Olfactory Cell Monolayers.” *International Journal of Pharmaceutics* 499 (1–2): 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.046>.

Gelperina, Svetlana, Olga Maksimenko, Alexander Khalansky, Lyudmila Vanchugova, Elena Shipulo, Kenul Abbasova, Rustam Berdiev, Stefanie Wohlfart, Nina Chepurnova, and Jörg Kreuter. 2010. “Drug Delivery to the Brain Using Surfactant-Coated Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Influence of the Formulation Parameters.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74 (2): 157–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.09.003>.

Ghori, Muhammad U., Mohammed H. Mahdi, Alan M. Smith, and Barbara R. Conway. 2015. “Nasal Drug Delivery Systems: An Overview.” *American Journal of Pharmacological Sciences, Vol. 3, 2015, Pages 110-119* 3 (5): 110–19. <https://doi.org/10.12691/AJPS-3-5-2>.

Goldsmith, Meir, Lilach Abramovitz, and Dan Peer. 2014. “Precision Nanomedicine in Neurodegenerative Diseases.” *ACS Nano* 8 (3): 1958–65. <https://doi.org/10.1021/nn501292z>.

- Gomes, Maria João, Carlos Fernandes, Susana Martins, Fernanda Borges, and Bruno Sarmiento. 2017. "Tailoring Lipid and Polymeric Nanoparticles as SiRNA Carriers towards the Blood-Brain Barrier – from Targeting to Safe Administration." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 12 (1): 107–19. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9685-6>.
- Gray, Steven J, Kenton T Woodard, and R Jude Samulski. 2010. "Viral Vectors and Delivery Strategies for CNS Gene Therapy." *Therapeutic Delivery* 1 (4): 517–34.
- Grover, Aditya, Anjali Hirani, Yashwant Pathak, and Vijaykumar Sutariya. 2014. "Brain-Targeted Delivery of Docetaxel by Glutathione-Coated Nanoparticles for Brain Cancer." *AAPS PharmSciTech* 15 (6): 1562–68. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0165-0>.
- Guillamón-Vivancos, T., U. Gómez-Pinedo, and J. Matías-Guiu. 2015. "Astrocytes in Neurodegenerative Diseases (I): Function and Molecular Description." *Neurología (English Edition)* 30 (2): 119–29. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2014.12.005>.
- Guillemin, Gilles J, and Bruce J Brew. 2016. "Pericytes : A Review of Function and Identification" 75 (3): 388–97. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303114.1>.
- Guo, Jianwei, Xiaoling Gao, Lina Su, Huimin Xia, Guangzhi Gu, Zhiqing Pang, Xinguo Jiang, Lei Yao, Jun Chen, and Hongzhan Chen. 2011. "Aptamer-Functionalized PEG-PLGA Nanoparticles for Enhanced Anti-Glioma Drug Delivery."

Biomaterials 32 (31): 8010–20.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.004>.

Guo, Wanhua, Aimei Li, Zhijun Jia, Yi Yuan, Haifeng Dai, and Hongxiu Li. 2013. “Transferrin Modified PEG-PLA-Resveratrol Conjugates: In Vitro and in Vivo Studies for Glioma.” *European Journal of Pharmacology* 718 (1–3): 41–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.034>.

Hall, Catherine N, Clare Reynell, Bodil Gesslein, Nicola B Hamilton, Anusha Mishra, Brad A Sutherland, Fergus M O ’farrell, Alastair M Buchan, Martin Lauritzen, and David Attwell. 2014. “Capillary Pericytes Regulate Cerebral Blood Flow in Health and Disease.” *Nature* 508.
<https://doi.org/10.1038/nature13165>.

Hanson, Leah R, William H Frey, and II. 2008. “Intranasal Delivery Bypasses the Blood-Brain Barrier to Target Therapeutic Agents to the Central Nervous System and Treat Neurodegenerative Disease.” *BMC Neuroscience* 9 Suppl 3 (Suppl 3): S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S5>.

Haque, Shadabul, Shadab Md, Mohammad Fazil, Manish Kumar, Jasjeet Kaur Sahni, Javed Ali, and Sanjula Baboota. 2012. “Venlafaxine Loaded Chitosan NPs for Brain Targeting: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation.” *Carbohydrate Polymers* 89 (1): 72–79.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.051>.

Haque, Shadabul, Shadab Md, Jasjeet Kaur Sahni, Javed Ali, and

- Sanjula Baboota. 2014. "Development and Evaluation of Brain Targeted Intranasal Alginate Nanoparticles for Treatment of Depression." *Journal of Psychiatric Research* 48 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHIRES.2013.10.011>.
- Harris, Frederick, and Lynne Pierpoint. 2012. "Photodynamic Therapy Based on 5-Aminolevulinic Acid and Its Use as an Antimicrobial Agent." *Medicinal Research Reviews* 29 (6): 1292–1327. <https://doi.org/10.1002/med>.
- Harrison, C. Louise, Nicol Ferrier, and Allan H. Young. 2004. "Tolerability of High-Dose Venlafaxine in Depressed Patients." *Journal of Psychopharmacology* 18 (2): 200–204. <https://doi.org/10.1177/0269881104042621>.
- Hawkins, Brian T, and Thomas P Davis. n.d. "The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease." <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>.
- Helms, Hans C, N Joan Abbott, Malgorzata Burek, Romeo Cecchelli, Pierre-Olivier Couraud, Maria A Deli, Carola Förster, et al. 2016. "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: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (5): 862–90. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>.
- Herran, E, M Igartua, J L Pedraz, and R M Hernandez. 2014. "Novel Drug Delivery Systems for Releasing Growth Factors to the

CNS: Focus on Alzheimer's and Parkinson's Diseases." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 14 (7): 557–66.

Hersh, David S, Aniket S Wadajkar, Nathan Roberts, Jimena G Perez, Nina P Connolly, Victor Frenkel, Jeffrey A Winkles, Graeme F Woodworth, and Anthony J Kim. 2016. "Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier." *Current Pharmaceutical Design* 22 (9): 1177–93.

Hervé, Françoise, Nicolae Ghinea, and Jean-Michel Scherrmann. 2008. "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis." *The AAPS Journal* 10 (3): 455–72. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9055-2>.

Hu, Kaili, Yanbin Shi, Wenming Jiang, Jiaying Han, Shixian Huang, and Xinguo Jiang. 2011. "Lactoferrin Conjugated PEG-PLGA Nanoparticles for Brain Delivery: Preparation, Characterization and Efficacy in Parkinsons Disease." *International Journal of Pharmaceutics* 415 (1–2): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.062>.

Huang, Na, Shuai Lu, Xiao-Ge Liu, Jie Zhu, Yu-Jiong Wang, and Rui-Tian Liu. 2017. "PLGA Nanoparticles Modified with a BBB-Penetrating Peptide Co-Delivering Aβ Generation Inhibitor and Curcumin Attenuate Memory Deficits and Neuropathology in Alzheimer's Disease Mice." *Oncotarget* 8 (46): 81001–13. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20944>.

Huile, Gao, Pan Shuaiqi, Yang Zhi, Cao Shijie, Chen Chen, Jiang

- Xinguo, Shen Shun, Pang Zhiqing, and Hu Yu. 2011. "A Cascade Targeting Strategy for Brain Neuroglial Cells Employing Nanoparticles Modified with Angiopep-2 Peptide and EGFP-EGF1 Protein." *Biomaterials* 32 (33): 8669–75. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.069>.
- Ibraheem, D., M. Iqbal, G. Agusti, H. Fessi, and A. Elaissari. 2014. "Effects of Process Parameters on the Colloidal Properties of Polycaprolactone Microparticles Prepared by Double Emulsion like Process." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 445 (March): 79–91. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2014.01.012>.
- Ichikawa, Yoshihiko, Mohsen Ghanefar, Marina Bayeva, Rongxue Wu, Arineh Khechaduri, Sathyamangla V Naga Prasad, R Kannan Mutharasan, Tejaswitha Jairaj Naik, and Hossein Ardehali. 2014. "Cardiotoxicity of Doxorubicin Is Mediated through Mitochondrial Iron Accumulation." *The Journal of Clinical Investigation* 124 (2): 617–30. <https://doi.org/10.1172/JCI72931>.
- Illum, Lisbeth. 2000. "Transport of Drugs from the Nasal Cavity to the Central Nervous System." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (1): 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00087-7).
- . 2003. "Nasal Drug Delivery - Possibilities, Problems and Solutions." *Journal of Controlled Release* 87 (1–3): 187–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00363-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00363-2).

- . 2004. "Is Nose-to-Brain Transport of Drugs in Man a Reality?" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (1): 3–17. <https://doi.org/10.1211/0022357022539>.
- Inokuchi, Ryota, Naoko Ohashi-Fukuda, Kensuke Nakamura, Tomoki Wada, Masataka Gunshin, Yoichi Kitsuta, Susumu Nakajima, and Naoki Yahagi. 2015. "Comparison of Intranasal and Intravenous Diazepam on Status Epilepticus in Stroke Patients: A Retrospective Cohort Study." *Medicine* 94 (7): e555. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000555>.
- Iqbal, Muhammad, Nadiyah Zafar, Hatem Fessi, and Abdelhamid Elaissari. 2015. "Double Emulsion Solvent Evaporation Techniques Used for Drug Encapsulation." *International Journal of Pharmaceutics* 496 (2): 173–90. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.10.057>.
- Jain, Atul, Ashay Jain, Neeraj K. Garg, Rajeev K. Tyagi, Bhupinder Singh, Om Prakash Katore, Thomas J. Webster, and Vandana Soni. 2015. "Surface Engineered Polymeric Nanocarriers Mediate the Delivery of Transferrin-Methotrexate Conjugates for an Improved Understanding of Brain Cancer." *Acta Biomaterialia* 24: 140–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.027>.
- Jain, Shilpa, and Monika Datta. 2014. "Montmorillonite-PLGA Nanocomposites as an Oral Extended Drug Delivery Vehicle for Venlafaxine Hydrochloride." *Applied Clay Science* 99: 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.06.006>.

Jose, S., S. Sowmya, T. A. Cinu, N. A. Aleykutty, S. Thomas, and E. B. Souto. 2014. "Surface Modified PLGA Nanoparticles for Brain Targeting of Bacoside-A." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 63: 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.024>.

Kaisar, Mohammad A., Ravi K. Sajja, Shikha Prasad, Vinay V. Abhyankar, Taylor Liles, and Luca Cucullo. 2017. "New Experimental Models of the Blood-Brain Barrier for CNS Drug Discovery." *Expert Opinion on Drug Discovery* 12 (1): 89–103. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1253676>.

Kamaly, Nazila, Basit Yameen, Jun Wu, and Omid C Farokhzad. 2016. "Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release." *Chemical Reviews* 116 (4): 2602–63. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.

Kang, Ting, Mengyin Jiang, Di Jiang, Xingye Feng, Jianhui Yao, Qingxiang Song, Hongzhan Chen, Xiaoling Gao, and Jun Chen. 2015. "Enhancing Glioblastoma-Specific Penetration by Functionalization of Nanoparticles with an Iron-Mimic Peptide Targeting Transferrin/Transferrin Receptor Complex." *Molecular Pharmaceutics* 12 (8): 2947–61. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00222>.

Kashi, Tahereh Sadat Jafarzadeh, Solmaz Eskandarion, Mehdi Esfandyari-Manesh, Seyyed Mahmoud Amin Marashi, Nasrin Samadi, Seyyed Mostafa Fatemi, Fatemeh Atyabi, Saeed Eshraghi, and Rassoul Dinarvand. 2012a. "Improved Drug

Loading and Antibacterial Activity of Minocycline-Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Solid/Oil/Water Ion Pairing Method." *International Journal of Nanomedicine* 7: 221–34. <https://doi.org/10.2147/IJN.S27709>.

Kashi, Tahereh Sadat Jafarzadeh, Solmaz Eskandarion, Mehdi Esfandyari-Manesh, Seyyed Mahmoudamin Amin Marashi, Nasrin Samadi, Seyyed Mostafa Fatemi, Fatemeh Atyabi, Saeed Eshraghi, and Rassoul Dinarvand. 2012b. "111 Solid/Oil/Water PLGA Capsules Protein." *International Journal of Nanomedicine* 7: 221–34. <https://doi.org/10.2147/IJN.S27709>.

Katare, Yogesh K., Ritesh P. Daya, Christal Sookram Gray, Roger E. Luckham, Jayant Bhandari, Abhay S. Chauhan, and Ram K. Mishra. 2015. "Brain Targeting of a Water Insoluble Antipsychotic Drug Haloperidol via the Intranasal Route Using PAMAM Dendrimer." *Molecular Pharmaceutics* 12 (9): 3380–88. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00402>.

Kesharwani, P, A Jain, A Jain, A K Jain, N K Garg, R K Tekade, T R R Singh, and A K Iyer. 2016. "Cationic Bovine Serum Albumin (CBA) Conjugated Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticles for Extended Delivery of Methotrexate into Brain Tumors." *Rsc Advances* 6 (92): 89040–50. <https://doi.org/10.1039/c6ra17290c>.

Khakh, Baljit S, and Michael V Sofroniew. n.d. "Diversity of Astrocyte Functions and Phenotypes in Neural Circuits Introduction and Historical Perspective."

<https://doi.org/10.1038/nn.4043>.

Kim, Geon Ha, Jieun E Kim, Sandy Jeong Rhie, and Sujung Yoon. 2015. "The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases." *Experimental Neurobiology* 24 (4): 325–40. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>.

Kim, Jeong Ai, Nam D Tran, Zhen Li, Fan Yang, Weilin Zhou, and Mark J Fisher. 2006. "Brain Endothelial Hemostasis Regulation by Pericytes." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26: 209–17. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600181>.

Koley, Dipankar, and Allen J Bard. 2010. "Triton X-100 Concentration Effects on Membrane Permeability of a Single HeLa Cell by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (39): 16783–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011614107>.

Kong, Bokyung, Ji Hyun Seog, Lauren M Graham, and Sang Bok Lee. 2011. "Experimental Considerations on the Cytotoxicity of Nanoparticles." *Nanomedicine (London, England)* 6 (5): 929–41. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>.

Koo, Seung Hyun, Ji-Soo Lee, Gun-Hee Kim, and Hyeon Gyu Lee. 2011. "Preparation, Characteristics, and Stability of Glutathione-Loaded Nanoparticles." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (20): 11264–69. <https://doi.org/10.1021/jf2024648>.

Kreuter, Jörg. 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>.
- Kulbachinskiy, a V. 2007. "Methods for Selection of Aptamers to Protein Targets." *Biochemistry. Biokhimiia* 72 (13): 1505–18.
<https://doi.org/10.1134/S000629790713007X>.
- Kumar, Amrish, Aditya Nath Pandey, and Sunil Kumar Jain. 2016. "Nasal-Nanotechnology: Revolution for Efficient Therapeutics Delivery." *Drug Delivery*.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.920431>.
- Kumari, Sonali, and Anand K. Kondapi. 2017. "Lactoferrin Nanoparticle Mediated Targeted Delivery of 5-Fluorouracil for Enhanced Therapeutic Efficacy." *International Journal of Biological Macromolecules* 95: 232–37.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.110>.
- Kuo, Yung Chih, and Yu Chun Chen. 2015. "Targeting Delivery of Etoposide to Inhibit the Growth of Human Glioblastoma Multiforme Using Lactoferrin- and Folic Acid-Grafted Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 479 (1): 138–49.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.070>.
- Lakhin, A. V., V. Z. Tarantul, and L. V. Gening. 2013. "Aptamers: Problems, Solutions and Prospects." *Acta Naturae* 5 (19): 34–43.
- Lawrence, C M, S Ray, M Babyonyshev, R Galluser, D W Borhani,

- and S C Harrison. 1999. "Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440): 779–82.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.286.5440.779>.
- Li, Hongyan, and Zhong Ming Qian. 2002. "Transferrin/Transferrin Receptor- Mediated Drug Delivery." *Med Res Rev Medicinal Research Reviews* 22 (3): 225–50.
<https://doi.org/10.1002/med.10008>.
- Li, Ming, Olivier Rouaud, and Denis Poncelet. 2008. "Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches." *International Journal of Pharmaceutics* 363 (1–2): 26–39.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.07.018>.
- Lin, Aihua, Yiming Liu, Yu Huang, Jingbo Sun, Zhifeng Wu, Xian Zhang, and Qineng Ping. 2008. "Glycyrrhizin Surface-Modified Chitosan Nanoparticles for Hepatocyte-Targeted Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 359 (1–2): 247–53.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.03.039>.
- Lippmann, Ethan S., Christian Weidenfeller, Clive N. Svendsen, and Eric V. Shusta. 2011. "Blood-Brain Barrier Modeling with Co-Cultured Neural Progenitor Cell-Derived Astrocytes and Neurons." *Journal of Neurochemistry* 119 (3): 507–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07434.x>.
- Liu, Rong, Guang-Hui Ma, Yin-Hua Wan, and Zhi-Guo Su. 2005. "Influence of Process Parameters on the Size Distribution of

PLA Microcapsules Prepared by Combining Membrane Emulsification Technique and Double Emulsion-Solvent Evaporation Method.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45 (3–4): 144–53.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2005.08.004>.

Liu, Zhongyang, Mengyin Jiang, Ting Kang, Deyu Miao, Guangzhi Gu, Qingxiang Song, Lei Yao, et al. 2013. “Lactoferrin-Modified PEG-Co-PCL Nanoparticles for Enhanced Brain Delivery of NAP Peptide Following Intranasal Administration.” *Biomaterials* 34 (15): 3870–81.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.02.003>.

Lochhead, Jeffrey J., and Robert G. Thorne. 2012. “Intranasal Delivery of Biologics to the Central Nervous System.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (7): 614–28.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2011.11.002>.

Loureiro, Joana A., Bárbara Gomes, Gert Fricker, Manuel A.N. Coelho, Sandra Rocha, and Maria Carmo Pereira. 2016. “Cellular Uptake of PLGA Nanoparticles Targeted with Anti-Amyloid and Anti-Transferrin Receptor Antibodies for Alzheimer’s Disease Treatment.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145: 8–13.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.041>.

Loureiro, Joana a, Bárbara Gomes, Manuel a N Coelho, Maria do Carmo Pereira, and Sandra Rocha. 2014. “Targeting Nanoparticles across the Blood-Brain Barrier with Monoclonal Antibodies.” *Nanomedicine* 9: 709–22.

<https://doi.org/10.2217/nnm.14.27>.

Lu, Cui-Tao, Ying-Zheng Zhao, Ho Lun Wong, Jun Cai, Lei Peng, and Xin-Qiao Tian. 2014. "Current Approaches to Enhance CNS Delivery of Drugs across the Brain Barriers." *International Journal of Nanomedicine* 9: 2241–57. <https://doi.org/10.2147/IJN.S61288>.

Lu, Wei, Qing Sun, Jin Wan, Zhenjue She, and Xin-guo Jiang. 2006. "Cationic Albumin – Conjugated Pegylated Nanoparticles Allow Gene Delivery into Brain Tumors via Intravenous Administration," no. 24: 11878–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2354>.

Luo, Zimiao, Zhiqiang Yan, Kai Jin, Qiang Pang, Ting Jiang, Heng Lu, Xianping Liu, Zhiqing Pang, Lei Yu, and Xinguo Jiang. 2017. "Precise Glioblastoma Targeting by AS1411 Aptamer-Functionalized Poly (l- γ -Glutamylglutamine)–paclitaxel Nanoconjugates." *Journal of Colloid and Interface Science* 490 (March): 783–96. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2016.12.004>.

Macedo, Maria, and Maria Sousa. 2008. "Transferrin and the Transferrin Receptor: Of Magic Bullets and Other Concerns." *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 7 (1): 41–52. <https://doi.org/10.2174/187152808784165162>.

Madrakian, Tayyebbeh, Reza Haryani, Mazaher Ahmadi, and Abbas Afkhami. 2015. "Spectrofluorometric Determination of Venlafaxine in Biological Samples after Selective Extraction on the Superparamagnetic Surface Molecularly Imprinted

Nanoparticles.” *Anal. Methods* 7 (2): 428–35.
<https://doi.org/10.1039/C4AY02144D>.

Mahajan, Supriya D., Wing Cheung Law, Ravikumar Aalinkeel, Jessica Reynolds, Bindukumar B. Nair, Ken Tye Yong, Indrajit Roy, Paras N. Prasad, and Stanley A. Schwartz. 2012. *Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Antiretrovirals to the Brain. Methods in Enzymology*. 1st ed. Vol. 509. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4>.

Malerba, Francesca, Francesca Paoletti, Simona Capsoni, and Antonino Cattaneo. 2011. “Intranasal Delivery of Therapeutic Proteins for Neurological Diseases.” *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (10): 1277–96.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2011.588204>.

Martin-Banderas, L, M Duran-Lobato, I Munoz-Rubio, J Alvarez-Fuentes, M Fernandez-Arevalo, and M A Holgado. 2013. “Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery: Recent Strategies and Developments.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 13 (1): 58–69.
<https://doi.org/10.2174/138955713804484721>.

Martin-Banderas, L, M a Holgado, J L Venero, J Alvarez-Fuentes, and M Fernández-Arévalo. 2011. “Nanostructures for Drug Delivery to the Brain.” *Current Medicinal Chemistry* 18 (34): 5303–21. <https://doi.org/10.2174/092986711798184262>.

Martín-Banderas, Lucía, Eva Sáez-Fernández, M^a Ángeles Holgado, M^a Matilde Durán-Lobato, José C. Prados, Consolación

- Melguizo, and José L. Arias. 2013. "Biocompatible Gemcitabine-Based Nanomedicine Engineered by Flow Focusing® for Efficient Antitumor Activity." *International Journal of Pharmaceutics* 443 (1-2): 103-9. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2012.12.048>.
- Merelli, A., L. Czornyj, and A. Lazarowski. 2015. "Erythropoietin as a New Therapeutic Opportunity in Brain Inflammation and Neurodegenerative Diseases." *International Journal of Neuroscience* 125 (11): 793-97. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.989321>.
- Merelli, Amalia, Liliana Czornyj, and Alberto Lazarowski. 2013. "Erythropoietin: A Neuroprotective Agent in Cerebral Hypoxia, Neurodegeneration, and Epilepsy." *Current Pharmaceutical Design* 19 (38): 6791-6801.
- Mikitsh, John L, and Ann-Marie Chacko. 2014. "Pathways for Small Molecule Delivery to the Central Nervous System across the Blood-Brain Barrier." *Perspectives in Medicinal Chemistry* 6: 11-24. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13384>.
- Mir, Maria, Naveed Ahmed, and Asim ur Rehman. 2017. "Recent Applications of PLGA Based Nanostructures in Drug Delivery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159 (November): 217-31. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.07.038>.
- Mirza, Agha Zeeshan, and Farhan Ahmed Siddiqui. 2014. "Nanomedicine and Drug Delivery: A Mini Review." *International Nano Letters* 4 (1): 94.

<https://doi.org/10.1007/s40089-014-0094-7>.

Monaco, Ilaria, Simona Camorani, David Colecchia, Erica Locatelli, Pierpaolo Calandro, Anais Oudin, Simone Niclou, et al. 2017. "Aptamer Functionalization of Nanosystems for Glioblastoma Targeting through the Blood-Brain Barrier." *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (10): 4510–16. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00527>.

Monsalve, Yuliana, Giovanni Tosi, Barbara Ruozi, Daniela Belletti, Antonietta Vilella, Michele Zoli, Maria Angela Vandelli, Flavio Forni, Betty L Lopez, and Ligia Sierra. 2015. "PEG-g-Chitosan Nanoparticles Functionalized with the Monoclonal Antibody OX26 for Brain Drug Targeting." *Nanomedicine* 10 (11): 1735–50. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.29>.

Moos, T, and E H Morgan. 2000. "Transferrin and Transferrin Receptor Function in Brain Barrier Systems." *Cellular and Molecular Neurobiology* 20 (1): 77–95. <https://doi.org/10.1023/A:1006948027674>.

Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Muntimadugu, Eameema, Raju Dhommatti, Anjali Jain, Venu Gopala Swami Challa, M. Shaheen, and Wahid Khan. 2016. "Intranasal Delivery of Nanoparticle Encapsulated Tarenflurbil: A Potential Brain Targeting Strategy for Alzheimer's Disease."

European Journal of Pharmaceutical Sciences 92 (September): 224–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.012>.

Nair, Madhavan, Rahul Dev Jayant, Ajeet Kaushik, and Vidya Sagar. 2016. “Getting into the Brain: Potential of Nanotechnology in the Management of NeuroAIDS.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 103 (August): 202–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.008>.

Najjar, Souhel, Daniel M Pearlman, Orrin Devinsky, Amanda Najjar, and David Zagzag. n.d. “Neurovascular Unit Dysfunction with Blood-Brain Barrier Hyperpermeability Contributes to Major Depressive Disorder: A Review of Clinical and Experimental Evidence.”

Nikandish, Niusha, Leila Hosseinzadeh, Abbas Hemati Azandaryani, and Katayoun Derakhshandeh. 2016. “The Role of Nanoparticle in Brain Permeability: An in-Vitro BBB Model.” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 15 (2): 403–13.

O’Brien, Fionn E., Timothy G. Dinan, Brendan T. Griffin, and John F. Cryan. 2012. “Interactions between Antidepressants and P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Clinical Significance of in Vitro and in Vivo Findings.” *British Journal of Pharmacology* 165 (2): 289–312. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01557.x>.

Oller-Salvia, Benjamí, Macarena Sá Nchez-Navarro, Ernest Giralt, and Meritxell Teixidó. 2016. “Chem Soc Rev Blood–brain

- Barrier Shuttle Peptides: An Emerging Paradigm for Brain Delivery." *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* 45 (45): 4631–4852.
- Owens, Donald E., and Nicholas A. Peppas. 2006. "Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 307 (1): 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- Pahuja, Richa, Kavita Seth, Anshi Shukla, Rajendra Kumar Shukla, Priyanka Bhatnagar, Lalit Kumar Singh Chauhan, Prem Narain Saxena, et al. 2015. "Trans-Blood Brain Barrier Delivery of Dopamine-Loaded Nanoparticles Reverses Functional Deficits in Parkinsonian Rats." *ACS Nano* 9 (5): 4850–71. <https://doi.org/10.1021/nn506408v>.
- Paka, Ghislain Djiokeng, and Charles Ramassamy. 2016. "Optimization of Curcumin-Loaded PEG-PLGA Nanoparticles by GSH Functionalization: Investigation of the Internalization Pathway in Neuronal Cells." *Molecular Pharmaceutics*, [acs.molpharmaceut.6b00738](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00738).
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00738>.
- Panahi, Homayon Ahmad, and Haniyeh Sadat Alaei. 2014. "β-Cyclodextrin/Thermosensitive Containing Polymer Brushes Grafted onto Magnetite Nano-Particles for Extraction and Determination of Venlafaxine in Biological and Pharmaceutical Samples." *International Journal of Pharmaceutics* 476 (1): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.051>.
- Parashar, Ashish Kumar, and Rajesh Kumar Nema. 2012. "A Review

on Novel Techniques for Drug Delivery to the Brain." *Current Research in Pharmaceutical Sciences* 7 (3): 134–41.

Pardeshi, Chandrakantsing Vijaysing, and Veena Shailendra Belgamwar. 2013. "Direct Nose to Brain Drug Delivery via Integrated Nerve Pathways Bypassing the Blood–brain Barrier: An Excellent Platform for Brain Targeting." *Expert Opinion on Drug Delivery* 10 (7): 957–72. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.790887>.

Pardridge, William M. n.d. "BLOOD-BRAIN BARRIER DRUG TARGETING : THE FUTURE OF BRAIN DRUG DEVELOPMENT," 90–105.

———. 2002. "Drug and Gene Delivery to the Brain: The Vascular Route." *Neuron* 36 (4): 555–58. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01054-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01054-1).

Patel, Hasmukh A., Sunil Shah, Dinesh O. Shah, and P.A. Joshi. 2011. "Sustained Release of Venlafaxine from Venlafaxine–montmorillonite–polyvinylpyrrolidone Composites." *Applied Clay Science* 51 (1–2): 126–30. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2010.11.013>.

Patel, Mayur M., and Bhoomika M. Patel. 2017. "Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain." *CNS Drugs* 31 (2): 109–33. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0405-9>.

Patel, Mayur M, Bhoomika R Goyal, Shraddha V Bhadada, Jay S Bhatt, and Avani F Amin. 2009. "Getting into the Brain." *CNS*

Drugs 23 (1): 35–58. <https://doi.org/10.2165/0023210-200923010-00003>.

Pavan, Barbara, Alessandro Dalpiaz, Nunzia Ciliberti, Carla Biondi, Stefano Manfredini, and Silvia Vertuani. 2008. “Progress in Drug Delivery to the Central Nervous System by the Prodrug Approach.” *Molecules* 13 (5): 1035–65. <https://doi.org/10.3390/molecules13051035>.

Pehlivan, Sibel Bozdağ. n.d. “Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Targeting, Imaging and Diagnosis of Neurodegenerative Diseases.” <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1156-7>.

Pires, Anaísa, Ana Fortuna, Gilberto Alves, and Amílcar Falcão. 2009. “Intranasal Drug Delivery: How, Why and What For?” *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 12 (3): 288–311. <https://doi.org/10.18433/J3NC79>.

Pitek, Andrzej S., David O’Connell, Eugene Mahon, Marco P. Monopoli, Francesca Francesca Baldelli, and Kenneth A. Dawson. 2012. “Transferrin Coated Nanoparticles: Study of the Bionano Interface in Human Plasma.” *PLoS ONE* 7 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040685>.

Prabhakar, Kandadi, Syed Muzammil Afzal, Goparaboina Surender, and Veerabrahma Kishan. 2013. “Tween 80 Containing Lipid Nanoemulsions for Delivery of Indinavir to Brain.” *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3 (5): 345–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.08.001>.

- Pund, Swati, Ganesh Rasve, and Ganesh Borade. 2013. "Ex Vivo Permeation Characteristics of Venlafaxine through Sheep Nasal Mucosa." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48 (1-2): 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.029>.
- Ramos-Rodriguez, Juan Jose, Daniel Sanchez-Sotano, Alberto Doblas-Marquez, Carmen Infante-Garcia, Simon Lubian-Lopez, and Monica Garcia-Alloza. 2017. "Intranasal Insulin Reverts Central Pathology and Cognitive Impairment in Diabetic Mother Offspring." *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0198-4>.
- RAPOPORT, STANLEY I., and PETER J. ROBINSON. 1986. "Tight-Junctional Modification as the Basis of Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier." *Annals of the New York Academy of Sciences* 481 (1 The Neuronal): 250-67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb27155.x>.
- Rapoport, Stanley I, and Masaharu Hori. n.d. "Testing of a Hypothesis for Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier." *J. Physiol* 223: 323-31.
- Ratliff, John K., and Edward H. Oldfield. 2001. "Convection-Enhanced Delivery in Intact and Lesioned Peripheral Nerve." *Journal of Neurosurgery* 95 (6): 1001-11. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.6.1001>.
- Rodríguez Cruz, Yamila, Manon Strehaiano, Teresita Rodríguez Obaya, Julio César García Rodríguez, and Tanguí Maurice.

2016. "An Intranasal Formulation of Erythropoietin (Neuro-EPO) Prevents Memory Deficits and Amyloid Toxicity in the APPSwe Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 55 (1): 231–48. <https://doi.org/10.3233/JAD-160500>.
- Ruck, Tobias, Stefan Bittner, and Sven G Meuth. 2015. "Blood-Brain Barrier Modeling: Challenges and Perspectives." *Neural Regeneration Research* 10 (6): 889–91. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.158342>.
- Samaridou, Eleni, and Maria José Alonso. 2018. "Nose-to-Brain Peptide Delivery – The Potential of Nanotechnology." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26 (10): 2888–2905. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.001>.
- Sanchez-Covarrubias, Lucy, Lauren M Slosky, Brandon J Thompson, Thomas P Davis, and Patrick T Ronaldson. 2014. "Transporters at CNS Barrier Sites: Obstacles or Opportunities for Drug Delivery?" *Current Pharmaceutical Design* 20 (10): 1422–49.
- Saraiva, Cláudia, Catarina Praça, Raquel Ferreira, Tiago Santos, Lino Ferreira, and Liliana Bernardino. 2016. "Nanoparticle-Mediated Brain Drug Delivery: Overcoming Blood–brain Barrier to Treat Neurodegenerative Diseases." *Journal of Controlled Release* 235 (August): 34–47. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.05.044>.
- Saunders, Norman R., M. D. Habgood, and K. M. Dziegielewska. 1999. "Barrier Mechanisms in the Brain, I. Adult Brain."

- Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.02986.x>.
- Schinkel, Alfred H. 1999. "P-Glycoprotein, a Gatekeeper in the Blood-Brain Barrier." *Advanced Drug Delivery Reviews* 36 (2–3): 179–94. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00085-4).
- Sekerdag, Emine, Sevda Lüle, Sibel Bozdağ Pehlivan, Naile Öztürk, Aslı Kara, Abbas Kaffashi, Imran Vural, et al. 2017. "A Potential Non-Invasive Glioblastoma Treatment: Nose-to-Brain Delivery of Farnesylthiosalicylic Acid Incorporated Hybrid Nanoparticles." *Journal of Controlled Release* 261 (September): 187–98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.032>.
- Shah, Lipa, Sunita Yadav, and Mansoor Amiji. 2013. "Nanotechnology for CNS Delivery of Bio-Therapeutic Agents." *Drug Delivery and Translational Research* 3 (4): 336–51. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0133-3>.
- Shan, Liang. 2004. *Indotricarbocyanine-Loaded AS1411 DNA Aptamer- and TGN Peptide-Modified Poly(Ethylene Glycol)-Poly(ε-Caprolactone) Nanoparticles*. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Sharma, Deepak, Rakesh Kumar Sharma, Aseem Bhatnagar, Dhruv K Nishad, Thakuri Singh, Reema Gabrani, Sanjeev K Sharma, Javed Ali, and Shweta Dang. 2016. "Nose to Brain Delivery of Midazolam Loaded PLGA Nanoparticles: In Vitro and In Vivo

- Investigations." *Current Drug Delivery* 13 (4): 557–64.
- SL, Jyothi, DV Gowda, N Vishal Gupta, and Riyaz Ali M Osmani. 2017. "Nose to Brain Drug Delivery: New Perspectives for Old Problems-An Enlightening Review." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 9 (7).
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Soddu, Elena, Giovanna Rassa, Paolo Giunchedi, Bruno Sarmento, and Elisabetta Gavini. 2015. "From Naturally-Occurring Neurotoxic Agents to CNS Shuttles for Drug Delivery." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 74 (July): 63–76. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2015.04.005>.
- Stab, Julia, Iavor Zlatev, Bastian Raudszus, Sabrina Meister, Claus U Pietrzik, Klaus Langer, Hagen Von Briesen, and Sylvia Wagner. 2016. "Flurbiprofen-Loaded Nanoparticles Can Cross a Primary Porcine In Vitro Blood-Brain Barrier Model to Reduce Amyloid- B 42 Burden." *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery* 6 (1): 1–10. <https://doi.org/10.4172/2155-983X.Page>.
- Stetefeld, Jörg, Sean A McKenna, and Trushar R Patel. 2016. "Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences." *Biophysical Reviews* 8 (4): 409–27.

<https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.

Stockwell, Jocelyn, Nabihah Abdi, Xiaofan Lu, Oshin Maheshwari, and Changiz Taghibiglou. 2014. "Novel Central Nervous System Drug Delivery Systems." *Chemical Biology & Drug Design* 83 (5): 507–20. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12268>.

Stützle, Martina, Johannes Flamm, Stefan Carle, and Katharina Schindowski. 2015. "Nose-to-Brain Delivery of Insulin for Alzheimer's Disease" 3 (3): 190–202. <https://doi.org/10.5599/admet.3.3.184>.

Sweeney, Aldrin E. 2015. "Nanomedicine Concepts in the General Medical Curriculum: Initiating a Discussion." *International Journal of Nanomedicine* 10: 7319–31. <https://doi.org/10.2147/IJN.S96480>.

Tam, Vivienne H., Chris Sosa, Rui Liu, Nan Yao, and Rodney D. Priestley. 2016. "Nanomedicine as a Non-Invasive Strategy for Drug Delivery across the Blood Brain Barrier." *International Journal of Pharmaceutics* 515 (1–2): 331–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.031>.

Tang, Jing, Zijun Bian, Jun Hu, Shouhong Xu, and Honglai Liu. 2012. "The Effect of a P123 Template in Mesopores of Mesocellular Foam on the Controlled-Release of Venlafaxine." *International Journal of Pharmaceutics* 424 (1–2): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.048>.

Tang, Jing, Igor I. Slowing, Yulin Huang, Brian G. Trewyn, Jun Hu, Honglai Liu, and Victor S.Y. Lin. 2011. "Poly(Lactic Acid)-

- Coated Mesoporous Silica Nanosphere for Controlled Release of Venlafaxine." *Journal of Colloid and Interface Science* 360 (2): 488–96. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.027>.
- Tang, Xiaolin (Charlie), and Michael J. Pikal. 2004. "Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice." *Pharmaceutical Research* 21 (2): 191–200. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>.
- Tang, Xiaolong, Yong Liang, Yongqiang Zhu, Chunmei Xie, Aixia Yao, Li Chen, Qinglin Jiang, et al. 2015. "Anti-Transferrin Receptor-Modified Amphotericin B-Loaded PLA-PEG Nanoparticles Cure Candidal Meningitis and Reduce Drug Toxicity." *International Journal of Nanomedicine* 10: 6227–41. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84656>.
- Tiedemann, Lena J, Sebastian M Schmid, Judith Hettel, Katrin Giesen, Paul Francke, Christian Büchel, and Stefanie Brassen. 2017. "Central Insulin Modulates Food Valuation via Mesolimbic Pathways" 8 (July): 16052.
- Tong, Gui Feng, Nan Qin, and Li Wei Sun. 2017. "Development and Evaluation of Desvenlafaxine Loaded PLGA-Chitosan Nanoparticles for Brain Delivery." *Saudi Pharmaceutical Journal* 25 (6): 844–51. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.003>.
- Tosi, G., L. Costantino, F. Rivasi, B. Ruozi, E. Leo, A. V. Vergoni, R. Tacchi, A. Bertolini, M. A. Vandelli, and F. Forni. 2007. "Targeting the Central Nervous System: In Vivo Experiments

with Peptide-Derivatized Nanoparticles Loaded with Loperamide and Rhodamine-123.” *Journal of Controlled Release* 122 (1): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.022>.

Tosi, G., A. Vilella, P. Veratti, D. Belletti, F. Pederzoli, B. Ruozi, M. A. Vandelli, M. Zoli, and F. Forni. 2015. “Exploiting Bacterial Pathways for BBB Crossing with PLGA Nanoparticles Modified with a Mutated Form of Diphtheria Toxin (CRM197): In Vivo Experiments.” *Molecular Pharmaceutics* 12 (10): 3672–84.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00446>.

Tucker, I.M., J.C.W. Corbett, J. Fatkin, R.O. Jack, M. Kaszuba, B. MacCreath, and F. McNeil-Watson. 2015. “Laser Doppler Electrophoresis Applied to Colloids and Surfaces.” *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 20 (4): 215–26.
<https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2015.07.001>.

Turecek, Peter L., Mary J. Bossard, Freddy Schoetens, and Inge A. Ivens. 2016. “PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (2): 460–75.
<https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2015.11.015>.

Ulbrich, Karsten, Telli Hekmatara, Elisabeth Herbert, and Jörg Kreuter. 2009. “Transferrin- and Transferrin-Receptor-Antibody-Modified Nanoparticles Enable Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier (BBB).” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2): 251–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.021>.

- Vaka, Siva Ram Kiran, H.N. Shivakumar, Michael A. Repka, and S. Narasimha Murthy. 2013. "Formulation and Evaluation of Carnosic Acid Nanoparticulate System for Upregulation of Neurotrophins in the Brain upon Intranasal Administration." *Journal of Drug Targeting* 21 (1): 44–53. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.725405>.
- Valdovinos-Flores, Cesar, and María E. Gonsebatt. 2012. "The Role of Amino Acid Transporters in GSH Synthesis in the Blood-Brain Barrier and Central Nervous System." *Neurochemistry International* 61 (3): 405–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.019>.
- "Venlafaxina." n.d. Accessed September 24, 2018. <https://www.vademecum.es/principios-activos-venlafaxina-n06ax16>.
- Verkhratsky, Alexei, Markel Olabarria, Harun N Noristani, Chia-Yu Yeh, and Jose Julio Rodriguez. n.d. "Astrocytes in Alzheimer's Disease."
- Veronese, Francesco M, and Anna Mero. 2008. "The Impact of PEGylation on Biological Therapies." *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 22 (5): 315–29.
- Vogelbaum, Michael A., and Christopher A. Iannotti. 2012. *Convection-Enhanced Delivery of Therapeutic Agents into the Brain. Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 104. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52138-5.00023-2>.

- Voth, Brittany, Daniel T. Nagasawa, Panayiotis E. Pelargos, Lawrence K. Chung, Nolan Ung, Quinton Gopen, Stephen Tenn, Daniel T. Kamei, and Isaac Yang. 2015. "Transferrin Receptors and Glioblastoma Multiforme: Current Findings and Potential for Treatment." *Journal of Clinical Neuroscience* 22 (7): 1071–76. <https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2015.02.002>.
- Wang, Danyang, and Lin Ping Wu. 2016. "Nanomaterials for Delivery of Nucleic Acid to the Central Nervous System (CNS)." *Materials Science and Engineering C* 70: 1039–46. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.011>.
- Wang, Lei, Yongwei Hao, Haixia Li, Yalin Zhao, Dehui Meng, Dong Li, Jinjin Shi, Hongling Zhang, Zhenzhong Zhang, and Yun Zhang. 2015. "Co-Delivery of Doxorubicin and SiRNA for Glioma Therapy by a Brain Targeting System: Angiopep-2-Modified Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles." *Journal of Drug Targeting* 23 (9): 832–46. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1025077>.
- Wang, Zhao H., Zhan Y. Wang, Chang S. Sun, Chun Y. Wang, Tong Y. Jiang, and Si L. Wang. 2010. "Trimethylated Chitosan-Conjugated PLGA Nanoparticles for the Delivery of Drugs to the Brain." *Biomaterials* 31 (5): 908–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.104>.
- Watanabe, Yoshinori, Yuko Asami, Yoko Hirano, Kazuhiko Kuribayashi, Rio Itamura, and Takayuki Imaeda. 2018. "Factors Impacting the Efficacy of Venlafaxine Extended Release 75–225 Mg/Day in Patients with Major Depressive

Disorder: Exploratory Post Hoc Subgroup Analyses of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Japan." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* Volume 14 (May): 1261–72. <https://doi.org/10.2147/NDT.S146428>.

Webster, Thomas J. 2006. "Nanomedicine: What's in a Definition?" *International Journal of Nanomedicine* 1 (2): 115–16.

Weiss, Nicolas, Florence Miller, Sylvie Cazaubon, and Pierre-Olivier Couraud. 2009. "The Blood-Brain Barrier in Brain Homeostasis and Neurological Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (4): 842–57. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2008.10.022>.

Weksler, Babette, Ignacio A Romero, and Pierre-Olivier Couraud. 2013. "The HCMEC/D3 Cell Line as a Model of the Human Blood Brain Barrier." *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16>.

Westphal, M., Z. Ram, V. Riddle, D. Hilt, E. Bortey, and On behalf of the Executive Committee of the Gliadel® Study Group. 2006. "Gliadel® Wafer in Initial Surgery for Malignant Glioma: Long-Term Follow-up of a Multicenter Controlled Trial." *Acta Neurochirurgica* 148 (3): 269–75. <https://doi.org/10.1007/s00701-005-0707-z>.

Wilhelm, Imola, and István A. Krizbai. 2014. "In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain." *Molecular Pharmaceutics* 11 (7): 1949–63. <https://doi.org/10.1021/mp500046f>.

- Wohlfart, Stefanie, Svetlana Gelperina, and Jörg Kreuter. 2012. "Transport of Drugs across the Blood-Brain Barrier by Nanoparticles." *Journal of Controlled Release* 161 (2): 264–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>.
- Wolff, Anette, Maria Antfolk, Birger Brodin, and Maria Tenje. 2015. "In Vitro Blood–Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (9): 2727–46. <https://doi.org/10.1002/JPS.24329>.
- Wong, Ho Lun, Xiao Yu Wu, and Reina Bendayan. 2012. "Nanotechnological Advances for the Delivery of CNS Therapeutics." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (7): 686–700. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2011.10.007>.
- Wu, Hongbing, Kaili Hu, and Xinguo Jiang. 2008. "From Nose to Brain: Understanding Transport Capacity and Transport Rate of Drugs." *Expert Opinion on Drug Delivery* 5 (10): 1159–68. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.10.1159>.
- Xia, Yu, Tiantian Xu, Changbing Wang, Yinghua Li, Zhengfang Lin, Mingqi Zhao, and Bing Zhu. 2018. "Novel Functionalized Nanoparticles for Tumor-Targeting Co-Delivery of Doxorubicin and SiRNA to Enhance Cancer Therapy." *International Journal of Nanomedicine* 13: 143–59. <https://doi.org/10.2147/IJN.S148960>.
- Xiao, Xiao-Yu, Ying-Xian Zhu, Ju-Yuan Bu, Guo-Wei Li, Jian-Hui Zhou, and Shao-Peng Zhou. 2016. "Evaluation of

Neuroprotective Effect of Thymoquinone Nanoformulation in the Rodent Cerebral Ischemia-Reperfusion Model.” *BioMed Research International* 2016 (September): 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/2571060>.

Yan, Feng, Ying Wang, Shenzhi He, Shuting Ku, Wei Gu, and Ling Ye. 2013. “Transferrin-Conjugated, Fluorescein-Loaded Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery across the Blood-Brain Barrier.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24 (10): 2371–79. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4993-3>.

Yeh, Po Ying J., Rajesh K. Kainthan, Yuquan Zou, Mu Chiao, and Jayachandran N. Kizhakkedathu. 2008. “Self-Assembled Monothiol-Terminated Hyperbranched Polyglycerols on a Gold Surface: A Comparative Study on the Structure, Morphology, and Protein Adsorption Characteristics with Linear Poly(Ethylene Glycol)S.” *Langmuir* 24 (9): 4907–16. <https://doi.org/10.1021/la702867t>.

Yin, YaShu, DaWei Chen, MingXi Qiao, XiuYan Wei, and HaiYang Hu. 2007. “Lectin-Conjugated PLGA Nanoparticles Loaded with Thymopentin: Ex Vivo Bioadhesion and in Vivo Biodistribution.” *Journal of Controlled Release* 123 (1): 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.024>.

Yoshikawa, T, and W M Pardridge. 1992. “Biotin Delivery to Brain with a Covalent Conjugate of Avidin and a Monoclonal Antibody to the Transferrin Receptor.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 263 (2): 897–903.

- Yoshikawa, Takayoshi, Toshiyuki Sakaeda (nee Kakutani), Tamio Sugawara, Koichiro Hirano, and Valentino J Stella. 1999. "A Novel Chemical Delivery System for Brain Targeting." *Advanced Drug Delivery Reviews* 36 (2-3): 255-75. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00091-X).
- Yusuf, Mohammad, Maria Khan, Riaz A. Khan, Ibrahim Abdullah Maghrabi, and Bahar Ahmed. 2016. "Polysorbate-80-Coated, Polymeric Curcumin Nanoparticles for *in Vivo* Anti-Depressant Activity across BBB and Envisaged Biomolecular Mechanism of Action through a Proposed Pharmacophore Model." *Journal of Microencapsulation* 33 (7): 646-55. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1242666>.
- Zambaux, M.F, F Bonneaux, R Gref, P Maincent, E Dellacherie, M.J Alonso, P Labrude, and C Vigneron. 1998. "Influence of Experimental Parameters on the Characteristics of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Prepared by a Double Emulsion Method." *Journal of Controlled Release* 50 (1-3): 31-40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00106-5).
- Zhang #a, Fan, Yi-An Lin, Sujatha Kannan, and Rangaramanujam M Kannan. 2016. "Targeting Specific Cells in the Brain with Nanomedicines for CNS Therapies HHS Public Access." *J Control Release* 240: 212-26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.013>.
- Zhang, Bo, Ting Jiang, Li Ling, Zhonglian Cao, Jingjing Zhao, Yanyan Tuo, Xiaojian She, et al. 2016. "Enhanced Antitumor Activity of EGFP-EGF1-Conjugated Nanoparticles by a Multitargeting

Strategy.” *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (14): 8918–27.
<https://doi.org/10.1021/acsami.6b00036>.

Zhou, Wenhui, Po-Jung Jimmy Huang, Jinsong Ding, and Juewen Liu. 2014. “Aptamer-Based Biosensors for Biomedical Diagnostics.” *The Analyst* 139 (11): 2627.
<https://doi.org/10.1039/c4an00132j>.

Zhou, Yan, Guoqiang Zhang, Zhi Rao, Yang Yang, Qian Zhou, Hongyan Qin, Yuhui Wei, and Xin’an Wu. 2015. “Increased Brain Uptake of Venlafaxine Loaded Solid Lipid Nanoparticles by Overcoming the Efflux Function and Expression of P-Gp.” *Archives of Pharmacal Research* 38 (7): 1325–35.
<https://doi.org/10.1007/s12272-014-0539-6>.

Zhu, Baomin, Huanying Zhang, and Lianling Yu. 2017. “Novel Transferrin Modified and Doxorubicin Loaded Pluronic 85/Lipid-Polymeric Nanoparticles for the Treatment of Leukemia: In Vitro and in Vivo Therapeutic Effect Evaluation.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86 (February): 547–54.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.11.121>.

