

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Nuevos sistemas de liberación controlada de ropinirol para el
tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Liudmila Boeva

Directoras

M^a Sofía E. Negro Álvarez
Emilia M^a Barcia Hernández

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



***NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA
DE ROPINIROL PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON***

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:

LIUDMILA BOEVA

BAJO LA DIRECCIÓN DE LAS DOCTORAS

M^a SOFIA E. NEGRO ÁLVAREZ

EMILIA M^a BARCIA HERNÁNDEZ

MADRID, 2017.

M^a Sofía Elisa Negro Álvarez y Emilia M^a Barcia Hernández, Profesoras Titulares de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, realizada por Liudmila Boeva, y cuyo título es:

“NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ROPINIROL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”

ha sido realizada bajo su dirección conjunta y reúne todos los requisitos para su defensa pública.

Lo que suscriben en Madrid, el 20 de Abril de 2017

Fdo. M^a Sofía Negro Álvarez

Fdo. Emilia M^a Barcia Hernández

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado y han colaborado durante estos años, en particular:

A las directoras de mi tesis, las profesoras Emilia Barcia Hernández y Sofía Negro Álvarez, por aceptarme en su grupo de investigación, por todo lo que me han enseñado, por su confianza, dedicación y apoyo.

A Karla Slowing por su valiosa ayuda durante todo el período de experimentación con animales. A Luis García y Ana Fernández por su gran ayuda en los experimentos con animales.

A mis compañeros y compañeras del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, en especial a mis compañeras de Biofarmacia. Por su amistad, compañerismo y colaboración.

A los profesores del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por su ayuda y buena disposición.

ÍNDICE

I. RESUMEN	- 1 -
II. SUMMARY	- 9 -
III. INTRODUCCIÓN	- 17 -
1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	- 19 -
1.1. Introducción	- 19 -
1.2. Sintomatología	- 21 -
1.3. Etiología.....	- 22 -
1.3.1. Factores ambientales.....	- 23 -
1.3.2. Factores genéticos.....	- 24 -
1.3.3. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.....	- 26 -
1.3.4. Inflamación.....	- 27 -
1.4. Tratamiento Farmacológico.....	- 29 -
1.4.1. Levodopa	- 30 -
1.4.2. Agonistas dopaminérgicos	- 32 -
1.4.3. Inhibidores de la COMT	- 35 -
1.4.4. Inhibidores de la MAO	- 36 -
1.4.5. Amantadina	- 38 -
2. ROPINIROL.....	- 39 -
2.1. Características físico-químicas	- 39 -
2.2. Mecanismo de acción	- 40 -
2.3. Aplicaciones terapéuticas	- 41 -
2.4. Características biofarmacéuticas y farmacocinéticas.....	- 42 -
2.5. Interacciones	- 43 -
2.6. Efectos adversos.....	- 45 -
3. BIBLIOGRAFÍA.....	- 47 -
IV. OBJETIVOS.....	- 59 -

V. PARTE EXPERIMENTAL	- 63 -
ARTÍCULO 1. HPLC-UV method development and validation for the quantification of ropinirole in new PLGA multiparticulate systems: Microspheres and nanoparticles	- 65 -
ARTÍCULO 2. Efficacy of Ropinirole-loaded PLGA microspheres for the reversion of rotenone-induced Parkinsonism.....	- 75 -
ARTÍCULO 3. Nanotechnology-based drug delivery of ropinirole for Parkinson’s disease.....	- 87 -
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	- 131 -
1. ARTÍCULO 1.....	- 133 -
2. ARTÍCULO 2.....	- 139 -
3. ARTÍCULO 3.....	- 151 -
4. BIBLIOGRAFÍA	- 162 -
VII. CONCLUSIONES	- 169 -
VIII. ABREVIATURAS.....	- 175 -

I. RESUMEN

NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ROPINIROL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, después de la enfermedad de Alzheimer, siendo un proceso irreversible y progresivo, cuyo origen no está aun totalmente esclarecido. En la actualidad la enfermedad de Parkinson no tiene cura, por lo que los objetivos de los tratamientos actuales se orientan a: reducir los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes, evitar o disminuir las posibles complicaciones de la enfermedad, y evitar o disminuir las posibles complicaciones derivadas de los tratamientos.

OBJETIVO

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, caracterización y evaluación de dos nuevos sistemas terapéuticos; microesferas y nanopartículas biodegradables de ropinirol, para su administración en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Dichas formulaciones podrían mejorar los tratamientos actuales.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de ropinirol base y clorhidrato de ropinirol por cromatografía líquida de alta resolución y con detección UV (HPLC-UV).

- Desarrollo y caracterización de microesferas biodegradables de ropinirol. Evaluación de la formulación seleccionada en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.
- Evaluación del efecto neuroprotector del ropinirol en la línea celular de neuroblastoma humano, SKN-AS.
- Desarrollo y caracterización de nanopartículas biodegradables de ropinirol. Evaluación de la formulación seleccionada en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha procedido al desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV), para la cuantificación simultánea de ropinirol como base libre y ropinirol en forma de clorhidrato. Los mejores resultados se han obtenido con una fase móvil constituida por acetonitrilo-tampón fosfato (55:45, v/v), ajustada a pH 6,0 y con un 0,3% de trietanolamina. El flujo elegido es de 1,0 ml/min, y la detección se realizó a una longitud de onda 245 nm, utilizando una columna C18 Kromasil 100 (250x4 mm, 5 µm). Los tiempos de retención resultantes fueron de 5,04 min para clorhidrato de ropinirol y 7,70 min para ropinirol base. Se logró una separación excelente entre ambos picos ($R=5,23$). Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,8 µg/ml y 2,4 µg/ml, y de 0,3 µg/ml y 0,9 µg/ml, para ropinirol base y clorhidrato, respectivamente.

La validación del método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) demostró que dicha técnica es simple, rápida, exacta, precisa, robusta y selectiva, y permite la cuantificación simultánea de ropinirol base y clorhidrato de ropinirol.

Se ha procedido al desarrollo y optimización de dos nuevos sistemas multiparticulares de liberación controlada (micropartículas y nanopartículas) cargados con ropinirol base, y destinados a tratar la enfermedad de Parkinson. Los nuevos sistemas se caracterizaron *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal de Parkinson (ratas macho Wistar), utilizando rotenona como neurotoxina.

En la preparación de las micropartículas biodegradables de ropinirol se utilizó la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A, empleando como polímero biodegradable el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). Para la optimización del proceso de elaboración se ha analizado la influencia de dos variables: cantidad de ropinirol base (40, 80 y 120 mg) y polímero utilizado (PLGA Resomer® RG 502 y PLGA Resomer® RG 502H). La cantidad de polímero empleada en todas las formulaciones preparadas ha sido de 400 mg. La formulación más adecuada para conseguir el objetivo propuesto se preparó con 120 mg de ropinirol y 400 mg de PLGA 502. Esta formulación presenta una alta eficacia de encapsulación ($83,20 \pm 4,16\%$), un tamaño medio de partícula comprendido entre 10 y 50 μm , y es capaz de liberar el principio activo a una velocidad constante de 78,23 $\mu\text{g}/\text{día}/10$ mg de microesferas durante 19 días.

El efecto neuroprotector del ropinirol liberado a partir de las micropartículas seleccionadas se evaluó en la línea celular de neuroblastoma humano, SKN-AS. Cuando las células fueron expuestas a la neurotoxina rotenona (20 μM) y co-tratadas con concentraciones crecientes de ropinirol (10 a 120 μM), se obtuvieron recuperaciones significativas de la viabilidad celular a las concentraciones de ropinirol más elevadas (100 y 120 μM).

La administración de una dosis de rotenona (2 mg/día) por vía intraperitoneal (i.p) indujo en los animales de experimentación cambios neuronales y conductuales similares a los de la enfermedad de Parkinson. El análisis histológico e inmunohistoquímico de cortes cerebrales de sustancia nigra y estriado (tinción de Nissl, análisis de la proteína ácida glial fibrilar o GFAP, y análisis de tirosina hidroxilasa o TH), y las pruebas de comportamiento realizadas (catalepsia, aquinesia, rotarod y natación), mostraron que el tratamiento con ropinirol, administrado tanto en solución (1 mg/Kg día durante 45 días) como encapsulado en las micropartículas (cantidad de micropartículas equivalente a 7,5 mg/kg ó 15 mg/kg de ropinirol, administradas los días 15 y 30), revierte la neurodegeneración inducida por rotenona, aunque los mejores resultados se obtuvieron en el grupo de animales tratados con la dosis más alta de micropartículas cargadas con ropinirol.

Se han elaborado además nanopartículas de ropinirol, utilizando como polímero biodegradable, PLGA Resomer® RG 502. La técnica

empleada para su elaboración es la de nanoprecipitación, empleando diferentes cantidades de ropinirol; 4,5; 5; 8 y 10 mg. En todos los casos, la cantidad de PLGA 502 empleada fue de 50 mg. El valor más alto de eficacia de encapsulación se obtuvo para la formulación elaborada con 8 mg de ropinirol, con un valor medio de $74,8 \pm 8,2\%$. Dicha formulación presenta un tamaño medio de partícula de $152,2 \pm 31$ nm, un valor de potencial zeta de $-14,25 \pm 0,43$ mV, y es capaz de ceder el ropinirol durante 5 días, con una velocidad de cesión de orden cero de $4,13 \pm 0,17$ $\mu\text{g/h}$ para 10 mg de nanopartículas, por lo que dicha formulación resultó ser la más idónea.

La eficacia *in vivo* de las nanopartículas de ropinirol se evaluó en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona, mediante la realización de los mismos ensayos que con las micropartículas. Al final del estudio (36 días), los mejores resultados se lograron en el grupo de animales que recibieron cada tres días la formulación de ropinirol en una cantidad equivalente a 1mg/kg de ropinirol y a partir del día 15 de iniciado el ensayo.

CONCLUSIONES

- La validación del método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) demostró que dicha

técnica es simple, rápida, exacta, precisa, específica y robusta, y permite la cuantificación simultánea de ropinirol base y clorhidrato de ropinirol.

- Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman el potencial interés de los nuevos sistemas biodegradables desarrollados para ropinirol (microesferas de PLGA y nanopartículas de PLGA), que han demostrado ser efectivos en revertir los síntomas de neurodegeneración en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.

II. SUMMARY

NEW CONTROLLED RELEASE SYSTEMS OF ROPINIROL FOR THE TREATMENT OF PARKINSON DISEASE

INTRODUCTION

Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative pathology after Alzheimer's disease, being an irreversible and progressive process, with its origin still not completely understood. At present, Parkinson's disease has no cure, so the objectives of current treatments are aiming at: Reducing symptoms, improving the quality of patients' life, avoiding or reducing possible disease complications, and avoiding or decreasing the possible complications derived from the treatments.

OBJECTIVE

The aim of this Doctoral Thesis is to develop, characterize and evaluate two new biodegradable therapeutic systems of ropinirole: microspheres and nanoparticles, as new efficient delivery systems for Parkinson's disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

- Development and validation of an analytical method for the simultaneous quantification of ropinirole as free base and ropinirole as hydrochloride, by High Performance Liquid Chromatography with UV detection (HPLC-UV).

- Development and characterization of ropinirole-loaded PLGA microparticles. Evaluation of the formulation selected in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease.
- Evaluation of the neuroprotective effects of ropinirole in human neuroblastoma cell line; SKN-AS.
- Development and characterization of ropinirole-loaded PLGA nanoparticles. Evaluation of the formulation selected in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease.

RESULTS AND DISCUSSION

A new HPLC-UV method has been developed and validated for the simultaneous quantification of ropinirole free base and ropinirole hydrochloride. The best results have been obtained with a mobile phase consisting of acetonitrile-phosphate buffer (55:45, v/v), adjusted to pH 6.0 and with 0.3% of triethanolamine. The flow rate chosen was 1.0 ml/min, and the detection was performed at a wavelength of 245 nm, using a Kromasil 100 C18 column (250x4 mm, 5 µm). The resulting retention times were 5.04 min for ropinirole hydrochloride and 7.70 min for ropinirole free base. Excellent separation between the two peaks was achieved ($R=5.23$). The limits of detection and quantification were 0.8 µg/ml and 2.4 µg/ml, and 0.3 µg/ml and 0.9 µg/ml, for ropinirole base and ropinirole hydrochloride, respectively.

The validation of the HPLC-UV showed that this technique is simple, fast, accurate, precise, robust and selective, and allows the simultaneous quantification of ropinirole free base and ropinirole hydrochloride.

We also proceeded to the development and optimization of two new controlled release multiparticulate systems (micro- and nanoparticles) loaded with ropinirole base, and intended to treat Parkinson's disease. Both systems were characterized *in vitro* as well as *in vivo* in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease.

For the preparation of biodegradable ropinirole-loaded microparticles the solvent extraction-evaporation method from an O/W emulsion was used. The polymer employed for their preparation is poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA). For the optimization of the elaboration process, the influence of two variables was analyzed: amount of ropinirole base (40, 80 and 120 mg) and polymer used; PLGA Resomer®RG 502 and PLGA Resomer®RG 502H. The amount of polymer used in all the formulations prepared was 400 mg. The formulation most suitable for achieving the proposed objective was prepared with 120 mg of ropinirole and 400 mg of PLGA 502. This formulation has high encapsulation efficiency ($83.20 \pm 4.16\%$), an average particle size comprised between 10 and 50 μm , and releases ropinirole at a constant rate of 78.23 $\mu\text{g/day/10}$ mg microspheres for 19 days.

The neuroprotective effects of the ropinirole released from the selected microparticles was evaluated in the human neuroblastoma cell line, SKN-AS. When these cells were exposed to the neurotoxin (rotenone) and co-treated with increasing concentrations of ropinirole (10-120 μ M) significant recoveries of cell viability were obtained at the highest ropinirole tested concentrations (100 and 120 μ M).

The intraperitoneal administration of rotenone at a dose of 2 mg/day induced neuronal and behavioral changes in experimental animals (male Wistar rats) similar to those of Parkinson's disease. Histological and immunohistochemical analysis of cerebral samples (substantia nigra and striatum) such as; Nissl staining, glial fibrillary acid protein or GFAP analysis, thyroxine hydroxylase or TH analysis, as well as behavioral tests (catalepsy, akinesia, rotarod and swimming) showed that the treatment with ropinirole, both administered in solution (1 mg/kg daily for 45 days) or encapsulated within PLGA microparticles (amounts of microparticles equivalent to 7.5 mg/kg or 15 mg/kg ropinirole administered on days 15 and 30), reverses rotenone-induced neurodegeneration, although the best results were obtained in the group of animals treated with the highest dose of ropinirole-loaded microparticles.

Ropinirole-loaded nanoparticles have also been prepared using biodegradable polymer, PLGA Resomer[®] RG 502. The technique employed for its preparation is nanoprecipitation, using different amounts of ropinirole; 4.5; 5; 8 and 10 mg. In all cases, the amount of PLGA 502 used was 50 mg. The highest value of encapsulation efficiency was obtained for

the formulation made with 8 mg ropinirole, with a value of $74.8 \pm 8.2\%$. This formulation has an average particle size of 152.2 ± 31 nm, a zeta potential value of -14.25 ± 0.43 mV, and is able to release ropinirole for 5 days, with a mean zero-order rate constant of 4.13 ± 0.17 $\mu\text{g/hr}$ for 10 mg of nanoparticles, thereby resulting in the most suitable nanoparticle formulation.

The efficacy of ropinirole-loaded PLGA nanoparticles was also evaluated in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease by performing the same tests as with the microparticles. At the end of the study (36 days), the best results were achieved in the group of animals that received an equivalent amount of 1 mg/kg of ropinirole nanoparticles every three days, and from day 15th after the trial had started.

CONCLUSIONS

- The validation of the High Performance Liquid Chromatography method with ultraviolet detection (HPLC-UV) showed that this technique is simple, fast, accurate, precise, specific and robust, and allows the simultaneous quantification of ropinirole free base and ropinirole hydrochloride.
- The results obtained in our study confirm the potential interest of the new biodegradable delivery systems developed for ropinirole (PLGA microspheres and PLGA nanoparticles), which have shown to be effective in reversing the symptoms of neurodegeneration in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease.

III. INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, después de la enfermedad de Alzheimer (Alves y col., 2008). Afecta a 1-2 adultos de cada 1000 habitantes. Su desarrollo está relacionado con la edad, ya que aparece generalmente a partir de los 50 años, y la media de inicio de los síntomas se sitúa alrededor de los 60 años (De Lau y col., 2006). Después de los 80 años, la incidencia anual se incrementa entre 400 y 500 casos por cada 100.000 habitantes (Mayeux, 2003), aunque en los últimos años se ha registrado un aumento de los casos de EP (5-10%) en pacientes menores de 45 años (Taylor y col., 2005).

La EP afecta a todos los grupos étnicos y a ambos sexos. Por grupo étnico, se ha observado una mayor incidencia en la raza negra que en la blanca y además, afecta en menor proporción a mujeres que a hombres (Hirsch y col., 2016). Aunque no se conoce con certeza la causa de esta supuesta diferencia en función del género, se sugiere que podría estar relacionada con un efecto protector de los estrógenos sobre las neuronas dopaminérgicas (Sawada y Shimohama, 2000).

La EP fue descrita por primera vez en el año 1817 por el médico inglés James Parkinson, quien en su monografía "Essay on the Shaking Palsy" la denomina "parálisis agitante" y la describe como "movimientos

temblorosos involuntarios, con disminución de la potencia muscular en la movilidad pasiva y activa, con propensión a encorvar el tronco hacia delante, pasar de caminar a correr, y en la que los sentidos y el intelecto no sufren mayor daño” (Parkinson, 2002).

Los cambios neuroquímicos que suceden en el cerebro de pacientes con EP empezaron a dilucidarse hacia los años 50, cuando el sueco Arvid Carlsson demostró que la dopamina era un neurotransmisor y que sus niveles en los ganglios basales eran altos en sujetos sanos y deficitarios en modelos animales de parkinsonismo (Carlsson y col., 1957). De hecho, Charcot enriqueció la descripción de los aspectos clínicos de la enfermedad, analizó la escritura, señaló la rigidez como signo y separó este síntoma de la bradicinesia. Aunque inicialmente sus ideas fueron rebatidas, el tiempo le acabó dando la razón, le valió la concesión del Nobel en el año 2000, y sus trabajos sirvieron de base a los exitosos ensayos en pacientes de Birkmayer y Hornykiewicz (Birkmayer y Hornykiewicz, 1961), con levodopa administrada por vía endovenosa, así como a los ensayos de Cotzias (Cotzias, 1968), con levodopa administrada por vía oral. Además, la implicación de las estructuras basales en la patogénesis de la EP ha conducido a un exhaustivo estudio de las mismas en las últimas décadas, llegando a la formulación de un modelo de organización de los ganglios basales universalmente aceptado, y como resultado, a un mejor entendimiento de la enfermedad (Alexander y col., 1986, Albin y col., 1989; Bergman y col., 1990). Finalmente, los buenos resultados del primer ensayo controlado realizado con levodopa frente a placebo, en el control de los síntomas motores de la EP (Yahr y col., 1969)

convirtieron al precursor oral de la dopamina en el eje del tratamiento de la EP, lo que aún se mantiene en el momento actual.

1.2. Sintomatología

La enfermedad de Parkinson, en la actualidad, se considera un proceso neurodegenerativo irreversible y progresivo.

Los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen:

- Temblor en reposo: se trata de contracciones involuntarias de los músculos esqueléticos, que afectan a manos, brazos, piernas, mandíbula y cara. Suele ser el primer síntoma de la enfermedad.

- Rigidez: es conocida como hipertonia parkinsoniana, y se caracteriza por una elevada rigidez debido al aumento del tono, de manera que los músculos se encuentran en constante tensión. Afecta a los brazos, las piernas y el tronco.

- Bradicinesia: es el síntoma más incapacitante de la enfermedad; y se caracteriza por cierto enlentecimiento de los movimientos voluntarios, presentando dificultad para iniciar su iniciación. Este síntoma se detecta normalmente por los cambios en la escritura, adquisición de un tono de habla bajo y monótono (hipofonía), una excesiva producción de saliva (sialorrea), y la ausencia de expresión facial.

- Alteraciones en el equilibrio y la coordinación: a medida que la enfermedad evoluciona, los pacientes sufren una pérdida de reflejos posturales, adquiriendo una postura encorvada que dificulta el mantenimiento de la posición vertical corporal (Beitz, 2014).

Los síntomas de la EP a menudo comienzan en un lado del cuerpo, extendiéndose, en un período de tiempo de varios meses a pocos años, a ambos lados. Las alteraciones, que se perciben del lado opuesto del cuerpo, casi siempre presentan menor gravedad que en el lado inicial, condición que suele conservarse. A medida que los síntomas empeoran, las personas que padecen la enfermedad pueden tener problemas para caminar, hablar o realizar tareas sencillas, de manera que al cabo de unos 10-15 años, el enfermo de Parkinson suele requerir asistencia para la mayor parte de sus actividades diarias, pasando a ser totalmente dependiente al final de la enfermedad (Poewe, 2006; García y col., 2008).

Además, los pacientes pueden presentar síntomas no motores, que aunque menos conocidos por su alta variabilidad, no por ello resultan menos importantes. Destacan las alteraciones producidas en el sueño, lentitud en el pensamiento, razonamiento y memoria, así como alteraciones neuropsiquiátricas (depresión, ansiedad, apatía, alucinaciones, delirios, etc.) (Rana y col., 2015).

1.3. Etiología

La etiología específica de la EP es desconocida. Hasta el momento se han descrito diversos factores endógenos y exógenos que incrementan el riesgo de desarrollo de la enfermedad. Entre ellos se encuentran factores ambientales, genéticos, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Schapira, 2006).

1.3.1. Factores ambientales

La hipótesis ambiental indica que la neurodegeneración implicada en el desarrollo de la EP es provocada por la exposición a neurotoxinas del medio ambiente. Así, se ha indicado que la exposición a metales pesados; tales como hierro y cobre, herbicidas y pesticidas, constituye un factor de riesgo de padecer la enfermedad (Semchuk y col., 1992, Lai y col., 2002, Hatcher y col., 2008). Sin embargo, otros estudios han indicado que dichos resultados son cuestionables (Firestone y col., 2010).

Algunos autores han relacionado el consumo de productos lácteos con el aumento de riesgo de padecer EP (Chen y col., 2007), y en otros estudios se ha indicado que el consumo de tabaco constituye un factor protector ante la enfermedad (Allam y col., 2004). Aunque en este último caso se desconoce el mecanismo por el que se produciría dicha protección, la hipótesis más aceptada es el posible efecto de la nicotina sobre la oxidación celular o el enzima MAO-B (Quik, 2004). Otros agentes como la cafeína y el alcohol, podrían también tener un efecto protector sobre la EP (Ascherio y Chen, 2003, Ragonese y col., 2003).

Establecer el papel de los factores ambientales en la etiopatogenia de la EP resulta complejo, y hasta el momento no hay datos convincentes que indiquen algún agente específico como causante de la enfermedad.

1.3.2. Factores genéticos

En los últimos años también se ha demostrado la importancia de los factores genéticos en la etiología de la EP. Los genes que confieren susceptibilidad, o que son causa directa de la misma, se agrupan bajo la denominación de PARK (PARK1-PARK15) (Kubo y col., 2006, Klein y Lohmann-Hedrich, 2007, Mena y col., 2008, Hatano y col., 2009).

El gen de la α -sinucleína (PARK1) ha sido el primero en ser reconocido como implicado en una forma anormal de la EP, que se transmite de manera autosómica dominante. La α -sinucleína se localiza fundamentalmente en el neocórtex, hipocampo y sustancia nigra (SN), y constituye la proteína mayoritaria aislada a partir de los cuerpos de Lewy, una de las lesiones más características localizadas en el análisis post-mortem de cerebros de enfermos de Parkinson (Cookson, 2012).

El gen parkina (PARK2), está implicado en un tipo de parkinsonismo familiar precoz, autosómico recesivo, que afecta a cerca del 50% de los casos de Parkinson familiar (Klein y Westenberger, 2012). Este tipo de Parkinson se manifiesta con prácticamente una ausencia de cuerpos de Lewy, lo que sugiere que la parkina juega un papel fundamental en la

formación de este tipo de inclusiones. Así, la parkina está implicada en una de las vías mayoritarias de degradación de proteínas en la célula; la vía de ubiquitina-proteasoma, de manera que debido a su actividad E3-ubiquitina ligasa reconoce proteínas específicas como sustrato, e induce su poliubiquitinación y posterior degradación (Hasegawa y col., 2008).

El gen PINK 1 (PARK6), codifica la serin-treoninquinasa, cuya función no está totalmente establecida, aunque parece que ejercería un papel protector en los casos de estrés celular o incremento en la demanda de energía por la célula (Valente y col., 2004).

El gen LRRK2 (PARK8) codifica la LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) o dardarina, proteína abundante en el cerebro, aunque también se encuentra en otros tejidos. El papel funcional de la dardarina está aún por dilucidar, aunque se ha indicado que interviene en reacciones que requieren interacción proteína-proteína, en determinados procesos de transducción de señales, en la estructura del citoesqueleto y en funciones de aclaramiento celular mediante autofagia. Se conocen bastantes mutaciones del gen LRRK2 implicados en casos dominantes de la EP; algunas de las más frecuentes en población caucásica son las G2019S y la R1441G. Se calcula que cerca del 30% de los casos de parkinsonismo familiar podrían deberse a una alteración en este gen, así como alrededor de un 2-3% de los casos no familiares. Las mutaciones del gen LRRK2 se asocian a parkinsonismo clásico de inicio tardío, con herencia autosómica dominante, asociado a una mayor predisposición a presentar síntomas psiquiátricos, tales como: depresión, ansiedad, irritabilidad, alucinaciones

y demencia, y que no están relacionados con la medicación dopaminérgica (Mena y col., 2008, Li y col., 2014).

El gen DJ1 (PARK7) está localizado en la región 1p36, contiene 8 exones y codifica una proteína de 189 aminoácidos que pertenece a la familia ThiJ/Pfp1. La frecuencia de mutaciones es muy baja, estando tan sólo presente en alrededor de un 2% de los pacientes con EP de inicio temprano. La función del gen DJ1 podría ser la de proteger las neuronas del estrés oxidativo y/o proteger contra el daño mitocondrial (Kubo y col., 2006).

1.3.3. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

Los mecanismos de óxido-reducción desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula, y engloban procesos de renovación de membranas, supervivencia de células en el sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, aumento en la transcripción de citocinas durante procesos inflamatorios, así como participación en la señalización celular y mecanismos de segundos mensajeros.

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) son normalmente generados por el metabolismo celular para la obtención de energía. Para poder mantener un equilibrio de óxido-reducción en el

organismo, los sistemas antioxidantes eliminan las ROS. En situaciones patológicas como la EP, se produce un estado de estrés oxidativo, y como consecuencia se aumenta la producción de radicales libres y la producción de ROS (Lin y Beal, 2006). Cuando los mecanismos celulares no pueden contrarrestar estos cambios, se inicia una cadena de reacciones que involucran alteraciones de los canales iónicos, y aumento en la liberación de calcio y en la producción de óxido nítrico (Halliwell, 2006). El aumento en los niveles de calcio y óxido nítrico estimula la producción de interleucinas inflamatorias, causando gliosis e incrementando el estado de estrés oxidativo. Además, la producción de ROS también activa el factor nuclear *kappa beta* (NFκB), produciendo una alteración en el sistema inmune (Flood y col., 2011).

En la actualidad existen evidencias de las propiedades agregatorias de la α-sinucleína y de su posible asociación con un estado de estrés oxidativo presente en la EP. Así, se ha observado *in vitro* que los agregados tipo amiloide de la α-sinucleína (Jenner y col., 1996) son similares a los observados *in vivo*, e inducidos por co-incubación con cobre (II), Fe/peróxido de hidrógeno, o citocromo c/peróxido de hidrógeno (Sayre y col., 2001).

1.3.4. Inflamación

La inflamación presente en las enfermedades neurodegenerativas, como la EP, se produce como respuesta a una lesión o alteración en el sistema nervioso central (SNC), y consiste principalmente en una

respuesta inmune innata, que activa las células de la glía (astrocitos y microglía) (Gao y col., 2003, Block y Hong, 2005, Hanisch y Kettenmann, 2007).

En condiciones normales, la microglía se encuentra en reposo, pero si existe una lesión o infección se activa (Kreutzberg, 1996, Liu y col., 2003). Una vez activada, sufre un proceso de maduración originando dos estadios diferentes: el activo y el reactivo. (Davis y col., 1994). La microglía activada, desde el punto de vista estructural, se caracteriza por ser una célula ramificada, con un cuerpo celular más grande que la no activada, y que presenta proyecciones cortas. Expresa receptores del complemento CR3 y del complejo de histocompatibilidad de clase-1 (MHC-1). Además, activa una serie de productos citotóxicos, que provocan daño y muerte neuronal tales como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquinas (IL-1b) e interferón gamma (IFN- γ), que son potentes inductores del aumento de producción de óxido nítrico (Liu y col., 2003; Hirsch y Hunot, 2009). Por otra parte, la microglía reactiva es más pequeña, esférica, carece de ramificaciones, y está incrementada la expresión de MHC-1 y MHC-2 y la capacidad de presentar antígenos a las células T para su degradación. Por lo tanto, la activación de la microglía influye en la extensión de la lesión cerebral, después de un estímulo inflamatorio descontrolado (Wyss-Coray y col., 2002).

Un segundo tipo de células de la glía son los astrocitos; que actúan como puente para suministrar los nutrientes de los capilares sanguíneos a las neuronas, y que son el lugar principal de almacenamiento de glucógeno en el cerebro (Aloisi, 1999). Los astrocitos se activan sufriendo

diversas modificaciones estructurales, que reciben el nombre de astrocitosis. La característica principal de la astrocitosis es el aumento en el número y tamaño de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), que forma parte del citoesqueleto, y es considerada como el principal marcador de astrocitosis (Raine, 2000). La función precisa de la molécula de GFAP todavía no es clara, aunque se ha indicado que un aumento en los niveles de GFAP provoca una mayor producción de esta proteína en las células, así como un aumento en el número de astrocitos, ya sea debido a su proliferación o a su migración. Una de las funciones más importantes de los astrocitos activados, es la participación en la respuesta inmune del sistema nervioso central. Así, se ha demostrado que los astrocitos activos producen moléculas que están implicadas en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria. Entre ellas se incluyen citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1b, IL-17 y IL-6) y antiinflamatorias, quimiocinas, eicosanoides, prostaglandinas y tromboxanos (Mrak y Griffin, 2005). Por otra parte, también se ha demostrado que los astrocitos activos conducen a la expresión de la ciclo-oxigenasa tipo-2 (COX-2) y de la óxido nítrico sintasa, que provocarían la producción de ROS y de óxido nítrico, responsables del estrés oxidativo y de la muerte neuronal (Laurenzi y col., 2001, Rappold y Tieu, 2010).

1.4. Tratamiento Farmacológico

La EP es una patología que no tiene cura, por lo que los objetivos de los tratamientos actuales se orientan a: reducir los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes, evitar o disminuir las posibles

complicaciones de la enfermedad, y evitar o disminuir las posibles complicaciones derivadas de los tratamientos.

En la actualidad, los tratamientos farmacológicos de la EP tratan de obtener la recuperación del equilibrio entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico, que tienen funciones contrapuestas en la regulación de los movimientos voluntarios. Si bien los agentes anticolinérgicos presentan un uso muy limitado, debido a su baja eficacia y frecuentes efectos adversos (confusión, amnesia, trastorno cognitivo, sequedad de boca y otras mucosas, aumento de la presión ocular, retención urinaria, y enlentecimiento gastrointestinal), generalmente se emplean en pacientes jóvenes cuando la EP cursa con temblores graves (Yuan y col., 2010).

Dentro de los potenciadores de la actividad dopaminérgica se encuentra la levodopa, los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), y la amantadina.

1.4.1. Levodopa

La levodopa es un aminoácido aromático, que se comporta como un profármaco del neurotransmisor endógeno dopamina. Se absorbe en el intestino delgado mediante el transportador de aminoácidos grandes neutros. A nivel periférico es transformada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, lo que obliga a inhibir esta enzima, bien con carbidopa bien con benserazida, para posibilitar que una cantidad

adecuada de levodopa atraviese la barrera hematoencefálica, para así incrementar su acceso a sistema nervioso central, y evitar los efectos adversos por la conversión a dopamina en los tejidos no cerebrales. El paso por la barrera hematoencefálica se hace también mediante el transportador de aminoácidos neutros, y una vez en cerebro, se convierte en dopamina mediante la dopa decarboxilasa (LeWitt, 2008).

Desde el punto de vista de sus características biofarmacéuticas y farmacocinéticas, la levodopa cuando se administra por vía oral se absorbe con rapidez en el intestino delgado, alcanzándose la concentración plasmática máxima entre las 0,5 y 2 horas después de la administración de una dosis por vía oral. Su semivida plasmática de eliminación es corta; de unas 3 horas.

La levodopa, junto con la apomorfina, es el fármaco con mayor efectividad sobre los síntomas motores de la EP. Sin embargo, su uso está limitado en el tiempo por la aparición de fluctuaciones motoras y discinesias, que se presentan en prácticamente el 100% de los pacientes a los 10 años de tratamiento. Estas complicaciones están relacionadas en parte por la administración intermitente de levodopa, y por su corta semivida, que origina picos y valles que se asocian a una estimulación pulsátil de los receptores dopaminérgicos estriatales. Esta estimulación pulsátil induce cambios moleculares en las vías de señalización, y genera patrones anormales en la descarga neuronal en los circuitos motores de los ganglios basales (Widnell, 2005). Estas complicaciones motoras, que aparecen como consecuencia de su utilización, hacen necesario retrasar lo más posible su instauración en el tratamiento de la EP, así como utilizar las

dosis más bajas posibles, lo que supone frecuentemente recurrir a la politerapia.

En el momento actual, y con el fin de evitar los picos y valles asociados a la administración de dosis múltiples de levodopa, se ha diseñado un gel de levodopa/carbidopa (Duodopa®) destinado a su administración mediante infusión continua. Para la administración a largo plazo, el gel debe administrarse con una bomba portátil directamente en el duodeno o yeyuno superior, a través de una gastrostomía endoscópica percutánea, y mediante una sonda transabdominal externa y una sonda intestinal interna. Duodopa® se utiliza en el tratamiento de la EP en estado avanzado, que cursa con fluctuaciones motoras graves e hiper/discinesia, y cuando las terapias habituales de la EP no han dado resultados satisfactorios (AEMPS, 2017).

1.4.2. Agonistas dopaminérgicos

Son fármacos que actúan estimulando directamente los receptores dopaminérgicos. Son capaces de mejorar todos los síntomas del cuadro parkinsoniano, aunque resultan menos efectivos que la levodopa. Sin embargo, al presentar una semivida más prolongada, reducen la incidencia de desarrollar períodos *on-off* y la posible aparición de discinesias.

En la actualidad el uso de agonistas dopaminérgicos en la EP es una buena alternativa para el tratamiento de pacientes jóvenes, al permitir retrasar el inicio del tratamiento con levodopa (Chaná, 2009).

Entre los agentes agonistas dopaminérgicos, los que tienen mayor interés para el tratamiento de la EP son los agonistas no ergóticos: apomorfina, pramipexol, rotigotina y ropinirol. Este último es objeto de esta memoria experimental.

La apomorfina fue el primer agonista dopaminérgico empleado en el tratamiento de la EP. En realidad, fue el segundo fármaco antiparkinsoniano eficaz, ya que su empleo es posterior a los anticolinérgicos, pero anterior a la levodopa (Schwab y col., 1951, Cotzias y col., 1970). La apomorfina es un agonista con afinidad por los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Su metabolismo es fundamentalmente hepático y posee un catabolismo muy rápido, lo que explica su corta semivida plasmática de eliminación, y que es de unas 2-3 horas (Kempster y col., 1990, Colosimo y col., 1996). La apomorfina muestra una elevada potencia antiparkinsoniana (Cotzias y col., 1970, Colosimo y col., 1996). Se ha demostrado que es el único agonista con una potencia similar a la que presenta la levodopa (Cotzias y col., 1970, Kempster y col., 1990, Colosimo y col., 1996, Rossi y col., 2000). Se usa tanto en inyección subcutánea intermitente como en infusión continua (Van Laar y col., 1993). Para el control de la EP avanzada, la apomorfina administrada por una vía diferente a la subcutánea (sublingual, intranasal, rectal y, posiblemente, transcutánea), puede ser eficaz a corto plazo,

aunque no se dispone de información suficiente para recomendar su uso a largo plazo.

El pramipexol es un agonista dopaminérgico no ergolínic, con una acción relativamente selectiva sobre los receptores dopaminérgicos, especialmente sobre el subtipo D3 (Piercy y col., 1996). Posee además baja afinidad por los receptores α -adrenérgicos, y su interacción con otros receptores es prácticamente indetectable. Actúa sobre los receptores dopaminérgicos presinápticos (autorreceptores), y así lo demuestra su capacidad para abolir las descargas de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y del área tegmental ventral de animales de experimentación (Piercy y col., 1996). Produce también una disminución de las concentraciones extracelulares de dopamina y sus metabolitos (Carter y Müller, 1991). Sin embargo, su eficacia en la EP está más relacionada con su capacidad para estimular los receptores dopaminérgicos postsinápticos.

El pramipexol es efectivo en la mejora de los síntomas motores y las actividades de la vida diaria en pacientes con EP incipiente, que requieren terapia dopaminérgica. En este tipo de pacientes, el tratamiento con pramipexol se asocia a un menor porcentaje de complicaciones motoras (fluctuaciones y discinesias), aunque resulta menos eficaz que la levodopa en el control de los síntomas motores. Además, el pramipexol es efectivo en pacientes con EP avanzada con fluctuaciones motoras. El fármaco reduce el tiempo *off* así como la dosis de levodopa, y mejora la realización de las actividades de la vida diaria.

La rotigotina es el único agonista dopaminérgico de uso transdérmico, aprobado para todos los estadios de la EP idiopática. Posee una alta afinidad por los receptores dopaminérgicos D3 y, en menor medida, por los D2, D4 y D5 (Baldwin y Keating, 2007). También se ha observado en estudios *in vitro* cierta actividad antagonista sobre los receptores adrenérgicos α_2 y σ , y agonista sobre los receptores de 5-HT1A (Belluzzi y col., 1994).

Entre las ventajas que presenta la rotigotina se encuentra su posibilidad de administración transdérmica, que proporciona un aporte continuo del fármaco, permitiendo así reducir el número de administraciones. Constituye una buena alternativa de administración en pacientes con disfagia o que requieran dieta absoluta, que presenten alteraciones de la motilidad intestinal, y en el pre y postoperatorio (Berner y John, 1994, Poewe y Luessi, 2005). Además, la rotigotina es bien tolerada por vía transdérmica, y es eficaz en monoterapia en pacientes con EP inicial, o en combinación con levodopa en pacientes con EP avanzada.

1.4.3. Inhibidores de la COMT

Los inhibidores de la COMT se emplean en pacientes con intensa desnervación dopaminérgica, lo que se manifiesta en la EP avanzada. En estos casos, el organismo es incapaz de almacenar levodopa, por lo que solo existe respuesta terapéutica durante el período de tiempo en el que la dopamina se encuentra en el espacio extracelular. En el SNC, la

levodopa se convierte en dopamina, la cual es; o bien recaptada o bien metabolizada por la COMT y la MAO. El objetivo de estos fármacos es inhibir al máximo el metabolismo de la dopamina, con el fin de que se mantenga durante el mayor tiempo posible.

Dentro de los inhibidores de la COMT se encuentran entacapona y tolcapona. La asociación levodopa/entacapona es eficaz en la EP avanzada. Puede disminuir el tiempo *off* comparado con la levodopa, por lo que puede usarse en pacientes no ancianos con EP avanzada que presenten o no fluctuaciones motoras. Sin embargo, el beneficio motor en el período *on* existe, pero es escaso (Gershanik y col., 2003).

La tolcapona es más potente y presenta una mayor duración de efectos que la entacapona, resultando eficaz en la EP con fluctuaciones motoras, ya que permite disminuir la dosis diaria de levodopa. Sin embargo, presenta toxicidad hepática, por lo que la tolcapona debe valorarse sólo en pacientes con EP y fluctuaciones que no responden o que no son candidatos para la administración de otros tratamientos.

1.4.4. Inhibidores de la MAO

Las monoaminooxidasas (MAO) son enzimas que intervienen en el catabolismo de las aminas biógenas, en especial de las catecolaminas, inhibiendo su acción enzimática. Las plaquetas y el cerebro humano son las localizaciones principales de la MAO-B, siendo ésta la responsable de la

degradación de un 80% de la dopamina cerebral, de ahí el interés de los Inhibidores selectivos de la MAO-B en el tratamiento de la EP.

Dentro de los agentes terapéuticos inhibidores de la COMT se encuentran los derivados de las propargilaminas; tales como selegilina y rasagilina. Estos compuestos poseen una cadena propargilo que les confiere efectos neuroprotectores en una variedad de modelos experimentales tanto *in vitro* e *in vivo* (Ebadi y col., 2002, Nayak y Henchcliffe, 2008).

Selegilina es un inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B (Chrisp y col., 1991), que presenta además capacidad inhibitoria de los receptores dopaminérgicos presinápticos y de bloqueo de la reabsorción de dopamina. La consecuencia de estas acciones farmacológicas es el aumento de la dopamina estriatal en el cerebro de los pacientes de EP (Riederer y Youdim, 1986). Además, tiene efectos psicoestimulantes y antidepresivos. La selegilina retrasa el comienzo de la incapacidad asociada a la fase precoz no tratada de la EP, lo que permite retrasar la introducción de levodopa, a pesar de que tiene una eficacia de leve a moderada en el control de los síntomas de la enfermedad.

Rasagilina, al igual que selegilina, es un inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B, pero a diferencia de lo que sucede con la selegilina, no da lugar en su proceso de biotransformación a derivados anfetamínicos (Thébault y col., 2004). Su metabolito principal es el aminoindano, molécula con posible acción antiparkinsoniana per se (Bar

Am y col., 2004). Dentro del grupo de las propalgilaminas es el compuesto más potente.

Estos agentes actúan sobre diversas vías de señalización intracelular relacionadas con la cascada apoptótica, lo que puede ser la base de su posible efecto neuroprotector sobre procesos patológicos de diversa patogenia (Glover y col., 1977, Westlund y col., 1985, Riederer y Youdim, 1986, Chrisp y col., 1991, Parkinson Study Group, 1993). Están indicados para el tratamiento de la EP en monoterapia (sin levodopa) en la EP temprana, y como terapia adyuvante de la levodopa en la EP más avanzada. Pueden utilizarse junto con otros agentes antiparkinsonianos.

1.4.5. Amantadina

El amantadina es un fármaco de la clase de las adamantanaminas, que presenta actividad antiviral y antiparkinsoniana. Su mecanismo de acción, aunque no se conoce con precisión, parece estar relacionado con un incremento en la liberación de dopamina en las terminaciones nerviosas, lo que retrasa su recaptación (Mizoguchi y col., 1994, Takahashi y col., 1996). Es también capaz de actuar como agonista dopaminérgico y como antagonista no competitivo de los receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (Kornhuber y col., 1994). Este último aspecto se ha postulado como el mecanismo implicado en la reducción de las discinesias inducidas por levodopa. Por último, presenta también cierta actividad anticolinérgica.

La amantadina es moderadamente eficaz en el tratamiento de la EP y sus complicaciones motoras. Sin embargo, sus efectos secundarios, tales como alucinaciones, aparición de ideas paranoides y confusión, limitan su uso.

2. ROPINIROL

2.1. Características físico-químicas

El ropinirol (RP), desde el punto de vista estructural, corresponde al 4-[2-dipropilamino) etil]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (Figura 1), con una fórmula empírica de $C_{16}H_{24}N_2O$. Tiene un peso molecular de 260,375 g/mol.

Se presenta como un sólido amarillento, con una solubilidad en agua, cuando se formula como clorhidrato, de 133 mg/ml. Es soluble en etanol y presenta un punto de fusión de 250°C. Al ser fotosensible, debe almacenarse protegido de la luz y en refrigeración (4°C).

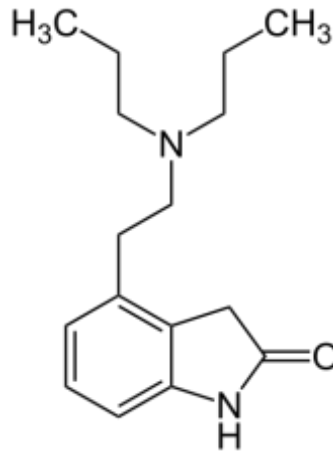


Figura 1. Estructura química del Ropinirol.

2.2 Mecanismo de acción

El RP es un agonista dopaminérgico, no ergolínico, que presenta una marcada selectividad frente a receptores dopaminérgicos D2 y D3, y carece prácticamente de efectos sobre los receptores D1. Sus efectos son nulos o muy ligeros sobre los receptores adrenérgicos (α_2 , α_1 o β), serotoninérgicos y colinérgicos. Por otra parte, en estudios realizados *in vitro* ha demostrado afinidad moderada sobre receptores opioides (Pahwa y col., 2004).

El mecanismo de acción del RP en el tratamiento de la EP no se conoce con exactitud, si bien parece estar ligado a su capacidad de estimular los receptores postsinápticos D2 de dopamina a nivel de cuerpo nigro-estriado (Chen y col., 2008).

Por otra parte, el RP también es útil en el tratamiento del Síndrome de Piernas Inquietas; enfermedad caracterizada por una necesidad irresistible de mover las piernas y, en ocasiones, los brazos, generalmente acompañada por sensaciones molestas tales como hormigueo, quemazón o pinchazos. El Síndrome de Piernas Inquietas de moderado a grave se presenta, por lo general, en personas que padecen dificultad para dormir o malestar intenso en las piernas o los brazos, sobre todo por la noche o cuando la persona está sentada o acostada. Aunque el origen de este síndrome no se conoce, se piensa que es el resultado de una deficiencia dopaminérgica, debido a una disminución de la síntesis de dopamina y/o de la densidad de los receptores D2 en el cuerpo estriado. Así, estudios realizados por tomografía de emisión de positrones (PET), muestran una posible implicación de una disfunción dopaminérgica presináptica estriado (Matheson y Spencer, 2000; Kushida, 2006).

2.3. Aplicaciones terapéuticas

Ropinirol se usa en el tratamiento de los síntomas de la EP en las siguientes situaciones:

- Tratamiento inicial como monoterapia, con el objeto de retrasar la introducción de levodopa.

- En combinación con levodopa, durante el curso de la enfermedad, cuando el efecto de levodopa disminuye o se hace inconsistente, y

aparecen fluctuaciones en el efecto terapéutico (*fin de dosis* o fluctuaciones tipo *on-off*).

- Tratamiento sintomático del Síndrome de Piernas Inquietas idiopático de moderado a grave.

2.4. Características biofarmacéuticas y farmacocinéticas

Tras su administración por vía oral, a partir de una formulación de liberación inmediata, la biodisponibilidad oral de RP es de aproximadamente el 50% (36-57%), alcanzándose la concentración máxima en plasma alrededor de las 1,5 horas. Los alimentos no alteran la cantidad total biodisponible, pero retrasan el tiempo en alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$ (2,6 horas).

Después de la administración oral de RP en comprimidos de liberación prolongada, las concentraciones plasmáticas aumentan lentamente, alcanzándose la $C_{m\acute{a}x}$ generalmente entre las 6 y 10 horas. En un estudio realizado, una vez alcanzado el estado de equilibrio dinámico, en 25 pacientes con EP a los que se administraron 12 mg de RP en forma de comprimidos de liberación prolongada una vez al día, junto con una comida con alto contenido en grasa, aumentó la exposición sistémica a RP, tal como se demostró por un incremento medio del 20% en el AUC (0- ∞) y de un aumento del 44% en la $C_{m\acute{a}x}$. El $t_{m\acute{a}x}$ se retrasó unas 3 horas. Sin embargo, estos cambios tienen poca probabilidad de ser

clínicamente relevantes, sobre todo en lo relativo a la incidencia de reacciones adversas (Tompson y Vearer, 2007).

En su proceso de distribución por el organismo, el RP circula unido a proteínas plasmáticas en una proporción baja, que oscila entre el 10% y el 40%. Al tratarse de un compuesto de elevada lipofilia, presenta un volumen de distribución elevado, de aproximadamente 7 l/kg.

El RP se metaboliza principalmente en el hígado mediante la isoenzima CYP1A2 del citocromo P-450. Tanto su excreción, como la de sus metabolitos, se realizan por vía renal. Su semivida plasmática de eliminación es corta; de una 6 horas.

La insuficiencia renal de leve a moderada no provoca cambios significativos en los parámetros farmacocinéticos de eliminación del RP. Sin embargo, el aclaramiento renal del RP se reduce en aproximadamente un 30% en pacientes con enfermedad renal terminal, que son sometidos de forma regular a hemodiálisis. En este tipo de pacientes, es necesario reducir la dosis a un máximo de 18 mg/día (Pelecchia y col., 2004).

2.5. Interacciones

No se han descrito interacciones farmacocinéticas entre el RP y la levodopa o domperidona que obliguen al ajuste posológico de las dosis de estos fármacos.

Los neurolépticos y otros antagonistas dopaminérgicos con actividad a nivel central, como sulpirida o metoclopramida, pueden disminuir la eficacia de RP y, por tanto, debe evitarse su uso concomitante.

Por lo que se refiere a los estrógenos, se ha descrito un aumento en la concentración plasmática de RP en mujeres tratadas con altas dosis de estrógenos. Si una mujer recibe ya terapia de sustitución hormonal (TSH), se puede iniciar tratamiento con RP de la forma habitual. Sin embargo, si se suspende o se introduce la TSH durante el tratamiento con RP, puede ser necesario un ajuste de la posología de este último, de acuerdo con la respuesta clínica.

El ciprofloxacino incrementa la $C_{máx}$ y el AUC total de RP en un 60% y un 84% respectivamente, con un riesgo potencial de aparición de efectos adversos. Por tanto, en pacientes que estén recibiendo RP, puede ser necesario reajustar su dosis, cuando se inicia o interrumpe el tratamiento con fármacos que inhiban el CYP1A2, tales como ciprofloxacino, enoxacino o fluvoxamina.

En un estudio realizado en pacientes de Parkinson en tratamiento con RP, a una dosis de 2 mg/tres veces al día, que recibían además teofilina, como fármaco representativo de los sustratos del CYP1A2, no se manifestaron cambios significativos en la farmacocinética de RP o de teofilina (Thalamas y col., 1999).

Se sabe que el tabaco induce el metabolismo de CYP1A2, por tanto, puede ser necesario un ajuste de la dosis si los pacientes dejan o empiezan a fumar durante el tratamiento con RP (AEMPS, 2017).

2.6. Efectos adversos

Las reacciones adversas más frecuentes de RP se suelen producir al inicio del tratamiento, o al aumentar la dosis. En general son leves, y se pueden clasificar de la forma siguiente:

- Efectos adversos muy frecuentes: pueden afectar a más del 10% de los pacientes y son: sensación de desvanecimiento, somnolencia y náuseas.

- Efectos adversos frecuentes: pueden llegar a manifestarse en hasta un 10% de los pacientes. Se trata de vómitos, mareos, ardor de estómago, estreñimiento, hinchazón de las piernas, pies o manos.

- Efectos adversos poco frecuentes: pueden afectar hasta a un 1% de los pacientes. Incluyen hipotensión ortostática, somnolencia excesiva diurna, episodios de sueño repentino, confusión grave, ideas delirantes (ideas irracionales) o paranoia (sospechas irracionales).

- Algunos pacientes pueden presentar efectos adversos tales como: reacciones alérgicas como enrojecimiento, inflamación de la piel con picor (urticaria), hinchazón de la cara, labios, boca, lengua o garganta, que pueden causar dificultades para tragar o respirar, sarpullido o picor intenso, impulsos de comportarse de una manera inusual, o impulsos y/o comportamientos sexuales exagerados y, alteraciones en la funcionalidad hepática (AEMPS, 2017).

3. BIBLIOGRAFIA

- **AEMPS;** www.aemps.gob.es. Último acceso febrero 2017.
- **Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B.** The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*, 12: 366-375, 1989.
- **Alexander, G.E., DeLong, M.R., Strick, P.L.** Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, 9: 357-381, 1986.
- **Allam, M.F., Campbell, M.J., Hofman, A., Del Castillo, A.S., Fernández-Crehuet Navajas, R.** Smoking and Parkinson's disease: systematic review of prospective studies. *Mov. Disord.*, 19: 614-621, 2004.
- **Aloisi, F.** The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 468: 123-133, 1999.
- **Alves, G., Forsaa, E.B., Pedersen, K., F., Gjerstad, M.D., Larsen, J.P.** Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 255: 18-32, 2008.
- **Ascherio, A., Chen, H.** Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 61: S51-S54, 2003.
- **Baldwin, C.M., Keating, G.M.** Rotigotine transdermal patch: A review of its use in the management of Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21: 1039-1055, 2007.
- **Bar Am, O., Amit, T., Youdim, M.B.H.** Contrasting neuroprotective and neurotoxic actions of respective metabolites of anti-Parkinson drugs rasagiline and selegiline. *Neurosci. Lett.*, 355: 169-172, 2004.

- **Beitz, J.M.** Parkinson's disease: a review. *Front. Biosci. (Schol Ed)*., 6: 65-74, 2014.
- **Belluzzi, J.D., Domino, E.F., May, J.M., Bankiewicz, K.S., McAfee, D.A.** N-0923, a selective dopamine D2 receptor agonist, is efficacious in rat and monkey models of Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 9: 147-154, 1994.
- **Bergman, H., Wichmann, T., DeLong, M.R.** Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, 249: 1436-1438, 1990.
- **Berner, B., John, V.A.** Pharmacokinetic characterization of transdermal delivery systems. *Clin. Pharmacokinet.*, 26: 121-134, 1994.
- **Birkmayer, W., Hornykiewicz, O.** The L-3, 4-dioxyphenylalanine (Dopa) effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin. Wochenschr.*, 73: 787-788, 1961.
- **Block, M.L., Hong, J.S.** Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.*, 76: 77-98, 2005.
- **Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T.** 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180: 1200, 1957.
- **Carter, A.J., Müller, R.E.** Pramipexole, a dopamine D2-autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 200: 65-72, 1991.

- **Chaná, P.** Advances in the medical treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.*, 15: 22-25, 2009.
- **Chen, H., O'reilly, E., Mccullough, M.L., Rodriguez, C., Schwarzschild, M.A., Calle, E.E., Thun, M.J., Ascherio, A.** Consumption of dairy products and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.*, 165: 998-1006, 2007.
- **Chen, S., Zhang, X., Yang, D., Du, J., Li, L., Li, X., Ming, M., Le, W.** D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways. *FEBS Letters*, 582: 603-610, 2008.
- **Chrisp, P., Mammen, G., Sorkin, E.** Selegiline: A review of its pharmacology, symptomatic benefits and protective potential in Parkinson's disease. *Drug Aging*, 1: 228-248, 1991.
- **Cookson, M.R.** Parkinsonism due to mutations in PINK1, PARKIN, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(9): a009415, 2012.
- **Colosimo, C., Merello, M., Hughes, A.J., Sieradzan, K., Lees, A.J.** Motor response to acute dopaminergic challenge with apomorphine and levodopa in Parkinson's disease: implications for the pathogenesis of the on-off phenomenon. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 60: 634-637, 1996.
- **Cotzias, G.C.** L-Dopa for Parkinsonism. *N. Engl. J. Med.*, 278: 630, 1968.

- **Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., Fehling, C., Kaufman, B., Mena, I.** Similarities between neurologic effects of L-dopa and of apomorphine. *N. Engl. J. Med.*, 282: 31-33, 1970.
- **Davis, E.J., Foster, T.D., Thomas, W.E.** Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.*, 34: 73-78, 1994.
- **De Lau, L., Breteler, M.** Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 5: 525-535, 2006.
- **Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., El Refaey, H.** Neuroprotective actions of selegiline. *J. Neurosci. Res.*, 67: 285-289, 2002.
- **Firestone, J.A., Lundin, J.I., Powers, K.M., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Swanson, P.D., Longstreth, W.T.Jr., Checkoway, H.** Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case control study. *Am. J. Ind. Med.*, 53: 217- 223, 2010.
- **Flood, P.M., Qian, L., Peterson, L.J., Zhang, F., Shi, J.S., Gao, H.M., Hong, J.S.** Transcriptional factor NF- κ B as a target for therapy in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.*, 11: 216-298, 2011.
- **Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J.S.** Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 24: 395-401, 2003.
- **García, S., Sauri, S., Meza, E. y Lucino, J.** Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. *Med. Int. Mex.*, 24: 28-37, 2008.
- **Gershanik, O., Emre, M., Bernhard, G., Sauer, D.** Efficacy and safety of levodopa with entacapone in Parkinson's disease patients

suboptimally controlled with levodopa alone, in daily clinical practice: an international, multicentre, open-label study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 27: 963-971, 2003.

- **Glover, V., Sandler, M., Owen, F., Riley G.** Dopamine is a monoaminooxidase B substrate in man. *Nature*, 265: 80-81, 1977.
- **Halliwell, B.** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.*, 97: 1634-1658, 2006.
- **Hanisch, U.K., Kettenmann, H.** Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.*, 10: 1387-1394, 2007.
- **Hasegawa, T., Treis, A., Patenge, N., Fiesel, F.C., Springer, W., Kahle, P.J.** Parkin protects against tyrosinase-mediated dopamine neurotoxicity by suppressing stress-activated protein kinase pathways. *J. Neurochem.*, 105: 1700-1715, 2008.
- **Hatano, T., Kubo, S., Sato, S., Hattori, N.** Pathogenesis of familial Parkinson's disease. New insights based on monogenic form of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 111: 1075-1093, 2009.
- **Hatcher, J.M., Pennell, K.D., Miller, G.W.** Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28: 322-329, 2008.
- **Hirsch, E.C., Hunot, S.** Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *Lancet Neurol.*, 8: 382-397, 2009.

- **Hirsch, L.A, Jette, N.A., Frolkis, A.C., Steeves, T.E., Pringsheim, T.A.** The incidence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 46: 292-300, 2016.
- **Jenner, P., Olanow, C.W.** Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47: S161-S170, 1996.
- **Kempster, P.A., Frankel, J.P., Stern, G.M., Lees, A.J.** Comparison of motor response to apomorphine and levodopa in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 53: 1004-1007, 1990.
- **Klein, C., Lohmann-Hedrich, K.** Impact of genetic findings in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.*, 20: 453-464, 2007.
- **Klein, C., Westenberger, A.** Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2: a008888, 2012.
- **Kornhuber, J., Weller, M., Schoppmeyer, K., Riederer, P.** Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonist with neuroprotective properties. *J. Neural. Transm.*, 43: 91-104, 1994.
- **Kreutzberg, G.W.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*, 8: 312-318, 1996.
- **Kubo, S, Hattori, N, Mizuno, Y.** Recessive Parkinson's Disease. *Mov. Dis.*, 21:885-893, 2006.
- **Kushida, C.A.** Ropinirole for the treatment of restless legs syndrome. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2: 407-419, 2006.
- **Lai, B.C., Marion, S.A., Teschke, K., Tsui, J.K.** Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 8, 297-309: 2002.

- **Laurenzi, M.A., Arcuri, C., Rossi, R., Marconi, P., Bocchini, V.** Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem. Res.*, 26: 1209-1216, 2001.
- **LeWitt, P.A.** Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 359: 2468-2476, 2008.
- **Li, J.Q., Tan, L., Yu, J.T.** The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Mol. Neurodegener.*, 9: 47, 2014.
- **Lin, M.T., Beal, M.F.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443: 787-795, 2006.
- **Liu, B., Hong, J.S.** Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 1-7, 2003.
- **Matheson, A.J., Spencer, C.M.** Ropinirole: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs*, 60: 115-137, 2000.
- **Mayeux, R.** Epidemiology of neurodegeneration. *Ann. Rev. Neurosci.*, 26: 81-104, 2003.
- **Mena, M.A., Rodríguez-Navarro, J.A., Ros, R., de Yébenes, J.G.** One pathogenesis and neuroprotective treatment of Parkinson disease: What have we learned from the genetic form of this disease?. *Curr. Med. Chem.*, 15: 2305-2320, 2008.
- **Mizoguchi, K., Yokoo, H., Yoshida, M., Tanaka, T., Tanaka, M.** Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism. *Brain Research*, 662: 255-258, 1994.

- **Mrak, R.E., Griffin, W.S.** Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, 8: 369-375, 2005.
- **Nayak, L., Henschcliff, C.** Rasagiline in the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 4: 23-32, 2008.
- **Pahwa, R., Lyons, K.E., Hauser, R.A.** Ropinirole therapy for Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.*, 4: 581-588, 2004.
- **Parkinson, J.** An essay on the shaking palsy (1817). *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 14: 223-236, 2002.
- **Parkinson Study Group.** Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.*, 328: 176-183, 1993.
- **Pellecchia, M.T., Vitale, C., Sabatini, M., Longo, K., Amboni, M., Bonavita, V., Barone, P.** Ropinirole as a treatment of restless legs syndrome in patients on chronic hemodialysis: an open randomized crossover trial versus levodopa sustained release. *Clin. Neuropharmacol.*, 27: 178-81, 2004.
- **Piercy, M.F., Hoffman, W.E., Smith, M.W., Hyslop, D.K.** Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3 receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 312: 35-44, 1996.
- **Poewe, W.** The natural history of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 253: 2-6, 2006.
- **Poewe, W., Luessi, F.** Clinical studies with transdermal rotigotine in early Parkinson's disease. *Neurology*, 65: 11-14, 2005.

- **Quik, M.** Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, 27: 561-568, 2004.
- **Ragonese, P., Salemi, G., Morgante, L., Aridon, P., Epifanio, A., Buffa, D.; Scoppa; F., Savettieri, G.** A case-control study on cigarette, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*, 22: 297-304, 2003.
- **Raine, C.S.** Inflammation in Alzheimer's disease: a view from the periphery. *Neurobiol. Aging*, 21: 437-440, 2000.
- **Rana, A.Q., Ahmed, U.S., Chaudry, Z.M., Vasan, S.** Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. *Expert Rev. Neurother.*, 15: 549-562, 2015.
- **Rappold, P.M., Tieu, K.** Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 7: 413-423, 2010.
- **Riederer. P., Youdim, M.** Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with L-deprenyl. *J. Neurochem.*, 46: 1359-1365, 1986.
- **Rossi, P., Colosimo, C., Moro, E., Tonali, P., Albanese, A.** Acute challenge with apomorphine and levodopa in Parkinsonism. *Eur. Neurol.*, 43: 95-101, 2000.
- **Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G.** Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.*, 8: 721-738, 2001.

- **Sawada, H., Shimohama, S.** Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24: 143-147, 2000.
- **Schapira, A.H.** Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 6: 10-23, 2006.
- **Schwab, R.S., Amador, L.V., Lettvin, J.Y.** Apomorphine in Parkinson's disease. *Trans. Am. Med. Assoc.*, 56: 251-253, 1951.
- **Semchuk, K.M., Love, E.J., Lee, R.G.** Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42: 1328- 1335, 1992.
- **Takahashi, T., Yamashita, H., Zhang, Y., Nakamura, S.** Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum. *Brain Res. Bull.*, 41: 363-367, 1996.
- **Taylor, K.S., Counsell, C.E., Gordon, J.C., Harris, C.E.** Screening for undiagnosed parkinsonism among older people in general practice. *Age Ageing*, 35: 501-504, 2005.
- **Thalamas, C., Taylor, A., Brefel-Courbon, C., Eagle, S., Fitzpatrick, K., Rascol, O.** Lack of pharmacokinetic interaction between ropinirole and theophylline in patients with Parkinson's disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 55: 299-303, 1999.
- **Thébault, J.J., Guillaume, M., Levy, R.** Tolerability, safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rasagiline: a potent, selective, and irreversible monoamine oxidase type B inhibitor. *Pharmacotherapy*, 24: 1295-1305, 2004.

- **Tompson, D.J., Vearer, D.** Steady-state pharmacokinetic properties of a 24-hour prolonged-release formulation of ropinirole: results of two randomized studies in patients with Parkinson's disease. *Clin. Ther.*, 29: 2654-2666, 2007.
- **Valente, E.M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A.E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B., Bentivoglio, A.R.** PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.*, 56: 336-341, 2004.
- **Van Laar, T., Jansen, E.N., Essink, A.W., Neef, C., Oosterloo, S., Roos, R.A.** A double-blind study of the efficacy of apomorphine and its assessment in 'off' periods in Parkinson's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 95: 231-235, 1993.
- **Westlund, K.N., Denney, R.M., Kochersperger, L.M., Rose, R.M., Abell, C.W.** Distinct monoamine oxidase A and B population in primate brain. *Science*, 230: 181-183, 1985.
- **Widnell, K.** Pathophysiology of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 20: S17-22, 2005.
- **Wyss-Coray, T., Mucke, L.** Inflammation in neurodegenerative disease: A double-edged sword. *Neuron*, 35: 419-432, 2002.
- **Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Schear, M.J., Barrett, R.E., Hoehn, M.M.** Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch. Neurol.*, 21: 343-354, 1969.
- **Yuan, H., Zhang, Z.W., Liang, L.W., Shen, Q., Wang, X.D., Ren, S.M., Ma, H.J., Jiao, S.J., Liu, P.** Treatment strategies for Parkinson's disease. *Neurosci. Bull.*, 26: 66-76, 2010.

IV. OBJETIVOS

La enfermedad de Parkinson (EP) constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, después de la enfermedad de Alzheimer, siendo un proceso irreversible y progresivo, cuyo origen no está aun totalmente esclarecido. En la actualidad la EP no tiene cura, por lo que los tratamientos actuales se orientan a: reducir los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes, evitar o disminuir las posibles complicaciones de la enfermedad, y evitar o disminuir posibles complicaciones de los tratamientos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, caracterización in vitro y evaluación en un modelo animal de dos nuevos sistemas terapéuticos de liberación controlada de ropinirol; microesferas y nanopartículas biodegradables de PLGA, para su administración en el tratamiento de la EP. Dichas formulaciones podrían mejorar los tratamientos actuales.

Este objetivo global podría desglosarse en los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de ropinirol base y clorhidrato de ropinirol por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV (HPLC-UV).

2. Desarrollo y caracterización de microesferas biodegradables de ropinirol. Evaluación de la formulación seleccionada en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.

3. Evaluación del efecto neuroprotector de ropinirol en la línea celular de neuroblastoma humano, SKN-AS.

4. Desarrollo y caracterización de nanopartículas biodegradables de ropinirol. Evaluación de la formulación seleccionada en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.

V. PARTE EXPERIMENTAL

ARTÍCULO 1

**HPLC-UV METHOD DEVELOPMENT AND
VALIDATION FOR THE QUANTIFICATION OF
ROPINIROLE IN NEW PLGA MULTIPARTICULATE
SYSTEMS: MICROSPHERES AND NANOPARTICLES.**

J. Fuster, S. Negro, A. Salama, A. Fernández-Carballido, P.
Marcianes, L. Boeva, E. Barcia

Publicado en *International Journal of Pharmaceutics* 491: 310-
317. 2015.



HPLC-UV method development and validation for the quantification of ropinirole in new PLGA multiparticulate systems: Microspheres and nanoparticles



J. Fuster, S. Negro, A. Salama, A. Fernández-Carballido, P. Marcianes, L. Boeva, E. Barcia*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2015

Received in revised form 19 June 2015

Accepted 20 June 2015

Available online 3 July 2015

Keywords:

Ropinirole

HPLC

PLGA

Nanoparticles

Microspheres

ABSTRACT

A simple HPLC-UV method was developed and validated for the quantification of RP free base encapsulated into two new multiparticulate systems (microparticles and nanoparticles), as well as for the quantification of RP hydrochloride when given as a loading dose together with the new delivery system developed. HPLC separation was achieved using a C18 Kromasil column (250 mm × 4 mm) with a mobile phase composed of acetonitrile-phosphate buffer solution (55:45, v/v) adjusted at pH 6.0 and containing 0.3% triethanolamine. Flow rate was set at 1.0 mL min⁻¹. The UV detector was operated at 245 nm. The method allowed for the simultaneous determination of both RP and RP-HCl. The method was linear within the range 2.5–50 µg mL⁻¹ for both RP and RP-HCl. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) found were 0.8 µg mL⁻¹ and 2.4 µg mL⁻¹ for RP, and 0.3 µg mL⁻¹ and 0.9 µg mL⁻¹ for RP-HCl. The method was found to be simple, rapid, specific, precise, accurate, and reproducible. The method was successfully applied to the determination of the encapsulation efficiency of RP in the multiparticulate systems developed, being 85.03 ± 3.77% and 51.12 ± 3.50%, for RP-loaded PLGA microspheres and RP-loaded PLGA nanoparticles, respectively.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ropinirole (RP) is a non-ergot D2/D3 dopamine agonist with higher affinity for D3 receptors than for D2 or D4 receptor subtypes (Nashatizadeh et al., 2009). It has proven efficacy when used as monotherapy in early Parkinson's disease, and in combination with levodopa in the advanced stages of the disease (Hauser et al., 2011; Stocchi et al., 2011). RP is also the first drug approved by the FDA for the treatment of the restless legs syndrome (Kushida, 2006).

The compound was developed by Smithkline Beecham as hydrochloride and chemically corresponds to 4-[2-(dipropylamine)ethyl]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one. At present there are few available liquid chromatography methods for the determination of RP however in all of them ropinirole hydrochloride is used for quantification (Azeem et al., 2008; Bhosale et al., 2011; Kothapalli et al., 2011; Samala et al., 2014; USPNF, 2014). There is only one study in which quantification of RP as free base is

described however using spectrophotometry (Anampally et al., 2011).

After oral administration RP is rapidly absorbed exhibiting a bioavailability of approximately 50% due to first pass metabolism. RP shows low plasma protein binding, it is inactivated by metabolism in the liver, with none of its major circulating metabolites exhibiting pharmacological activity (Kaye and Nicholls, 2000). The usual dose of RP is 3–9 mg daily taken in three divided doses due to its short elimination half-life (around 6 h) thereby resulting in a great inconvenience for the patients (Azeem et al., 2012). Therefore, its relatively low oral bioavailability and short plasma elimination half-life make RP a suitable candidate for the development of controlled release systems. In the market there is a pharmaceutical product in the form of prolonged release tablets for daily oral administration in which RP is included as hydrochloride. To prolong the effect of drugs for longer periods of time (weeks, months) multiparticulate controlled release systems can be developed, such as microparticles. The use of biodegradable and biocompatible microspheres to achieve controlled release of RP could represent an attractive alternative to avoid daily administrations, thereby leading to better patient compliance and possibly a reduction of adverse side-effects. In our case RP-

* Corresponding author Barcia: Dpto de Farmacia y Tecnología Farmacéutica Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid Plaza Ramón y Cajal s/n 28040 Madrid, Spain.
E-mail address: ebarcia@ucm.es (E. Barcia).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.035>

0378-5173/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

ARTÍCULO 2

EFFICACY OF ROPINIROLE-LOADED PLGA MICROSPHERES FOR THE REVERSION OF ROTENONE-INDUCED PARKINSONISM

S. Negro, L. Boeva, K. Slowing, A. Fernández-Carballido, L.
García-García, E. Barcia

Aceptado para su publicación en *Current Pharmaceutical Design*.
Sep. 2016.

RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Ropinirole-Loaded PLGA Microspheres for the Reversion of Rotenone-Induced Parkinsonism

Sofía Negro^a, Liudmila Boeva^a, Karla Slowing^b, Ana Fernández-Carballido^a, Luis García-García^{b,c} and Emilia Barcia^{a,*}^aDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^bDepartamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^cUnidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE HISTORY

Received: March 3, 2016
Accepted: September 6, 2016DOI: 10.2177/157331612621661009101
45548

Abstract: A new controlled delivery system has been developed for ropinirole (RP) for the treatment of Parkinson's disease (PD) consisting in PLGA microparticles (MPs) which exhibited *in vitro* constant release of RP (78.23 µg/day/10 mg MPs) for 19 days. The neuroprotective effects of RP released from MPs were evaluated in SKN-AS cells after exposure to rotenone (20 µM). Cell apoptosis was significantly reduced by RP (100-120 µM). Daily doses of rotenone (2 mg/kg) given *i.p.* to rats induced neuronal and behavioral changes similar to those of PD. After 15 days, animals received RP in saline (1 mg/kg/day for 45 days) or as MPs at two dose levels (amount of MPs equivalent to 7.5 mg/kg or 15 mg/kg RP given on days 15 and 30). Brain immunohistochemistry (Nissl-staining, GFAP and TH immunohistochemistry) and behavioral testing (catalepsy, akinesia, rotarod and swim test) showed that animals receiving RP either in solution or encapsulated within the MPs reverted the PD symptoms with the best results obtained in animals receiving RP microspheres at the highest dose assayed, thereby confirming the potential therapeutic interest of the new RP delivery system.

Keywords: Ropinirole, PLGA, microspheres, rotenone, Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a degenerative process mainly characterized by a loss of striatal dopaminergic neurons. The pathophysiology of the disease still remains unclear however involving multiple brain structures and signaling pathways [1]. Levodopa is the most effective drug for relieving symptoms of advanced PD, but when used chronically, it is often associated with the development of motor fluctuations and dyskinesia, symptoms which gradually worsen as the neurodegeneration progresses. Ahlskog and Muenter [2] reported 42.1% motor fluctuations and 38.5% dyskinesias after 4-6 years of treatment with levodopa; with these percentages risen up to 69.6% and 87.8%, respectively, after more than 9 years of treatment.

Ropinirole is a specific D2 and D3 dopamine receptor agonist indicated for the treatment of PD both as monotherapy and in combination with levodopa in the advanced stages of PD [3-5]. Nowadays, ropinirole is increasingly being used as monotherapy in the initial treatment of PD rather than as adjuvant to levodopa therapy [6]. Moreover, the drug is also effective in advanced PD in patients experiencing motor complications due to long-term levodopa therapy [7].

Due to its short plasma half-life (6 h), commercialized oral immediate-release forms of ropinirole must be taken every 8 hours. Moreover, it is hypothesized that pulsatile rather than continuous stimulation of dopamine receptors in PD may induce motor fluctuations; thereby expecting that these responses could be avoided by continuous stimulation of the dopamine receptors. To achieve this, another possibility to reduce side effects and enhance drug efficacy will be the development of controlled drug delivery systems. With these, the effective dose could be lowered owing to controlled drug

release and optimized biodistribution [8]. Moreover constant dopaminergic stimulation could be attained. Based on these considerations, a prolonged release formulation for oral administration of ropinirole (tablets) has been commercialized for once-daily administration. With this formulation, better control of the symptoms is achieved when compared with the immediate release tablets [9-10].

Prior to animal testing, studies performed *in vitro* using cell lines are very valuable to evaluate the neuroprotective effects of pharmaceutical compounds. For instance, rotenone is able to induce neurotoxicity via the activation of caspase-3 both *in vitro* and *in vivo* [11].

Animal models are very useful to study the pathogenesis and therapeutic strategies developed for human diseases. Regarding PD, neurotoxins such as rotenone can induce behavioral, clinical and pathological signs in animals resembling those occurring in PD [11, 12], which can be analyzed by means of behavioral testing as well as brain histological and histochemical assessments.

In our study we have developed and characterized a new controlled release system for ropinirole (PLGA microparticles) which has also been evaluated for neuroprotection in SKN-AS neuronal-like cell line. Moreover, a rotenone-induced animal model of PD has been developed in our study and the efficacy of the new controlled delivery system has been evaluated regarding motor outcomes (catalepsy, akinesia, rotarod, and swimming test) and brain histology and histochemical outcomes by means of Nissl-staining, GFAP (glial fibrillary acidic protein) immunohistochemistry, and TH (tyrosine hydroxylase) immunohistochemistry.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Ropinirol free base (RP) was purchased from Zhejiang Medicine & Health Products Import & Export Co., Ltd (China). Rotenone (RT) was obtained from Sigma-Aldrich (Spain). Poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA, 50:50) with 0.2 dL/g inherent viscos-

*Address correspondence to this author at the Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; Tel: +(34) 913941741; Fax: +(34) 913941736; E-mail: ebarcia@ucm.es

ARTÍCULO 3

NANOTECHNOLOGY-BASED DRUG DELIVERY OF ROPINIROLE FOR PARKINSON'S DISEASE

E. Barcia, L. Boeva, L. García-García, K. Slowing, A. Fernández-Carballido, Y. Casanova, S. Negro

Enviado para su publicación a *Drug Delivery*

NANOTECHNOLOGY-BASED DRUG DELIVERY OF ROPINIROLE FOR PARKINSON'S DISEASE

Emilia Barcia^a; Liudmila Boeva^a, Luis García-García^b; Karla Slowing^c; Ana Fernández- Carballido^a; Yaquelyn Casanova^a; Sofía Negro^a

^aDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^bUnidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^cDepartamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Corresponding author:

Sofía Negro

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Plaza Ramón y Cajal s/n

28040 Madrid (Spain)

Telephone: +(34) 913941741

Fax: +(34) 913941736

E-mail: soneal@ucm.es

ABSTRACT

A new drug delivery system has been developed for ropinirole (RP) for the treatment of Parkinson's disease (PD) consisting in biodegradable PLGA nanoparticles (NPs). The formulation selected was prepared with 8 mg of RP and 50 mg PLGA 502. This formulation presented an encapsulation efficiency of $74.8 \pm 8.2\%$, mean particle size lower than 155 nm, zeta potential of -14.25 ± 0.43 mV and zero-order in vitro release of RP (4.13 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{h}/10$ mg NPs) for 5 days. Daily doses of the neurotoxin rotenone (2 mg/kg) given i.p. to male Wistar rats induced neuronal and behavioral changes similar to those of PD. After 15 days, animals received RP in saline (1 mg/kg/day for 35 days) or encapsulated within PLGA NPs (amount of NPs equivalent to 1 mg/kg/day RP every three days for 35 days). Brain histology and immunochemistry (Nissl-staining, GFAP and TH immunohistochemistry) and behavioral testing (catalepsy, akinesia, rotarod and swim test) showed that RP-loaded PLGA NPs were able to revert PD-like symptoms of neurodegeneration in the animal model assayed in the study.

Keywords: ropinirole; nanoparticles; PLGA, Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is nowadays the second most prevalent neurodegenerative disorder (Tolosa et al, 2006). PD is characterized by the following clinical motor alterations; bradykinesia, rigidity and postural instability, and non-motor disorder symptoms due to loss of the dopaminergic neurons of the compact part of the dopaminergic neurons within the substantia nigra pars compacta (SNpc) and attendant projections to the putamen.

Among antiparkinsonian drugs ropinirole (RP) is a non-ergolinic dopaminergic agonist with high affinity for dopaminergic receptors D2 and D3, null or low on D1 receptors and poor on other non-dopaminergic receptors (Jost and Angersbach, 2005; Jost et al., 2008). It is indicated as monotherapy in early PD and as adjunctive therapy to levodopa. RP is given orally as immediate-release (IR) tablets taken three times daily or as extended-release (ER) tablets taken once daily. After administration of RP in IR tablets absorption is rapid and complete, bioavailability is approximately 50% (36-57%) due to extensive first-pass hepatic metabolism (Bhatt et al., 2011) and the elimination half-life is short (5-6

h). This low bioavailability limits the amount of RP that could gain access to the CNS. The administration of sustained drug delivery systems reduces the dosing frequency, can minimize the side effects, can enhance the therapeutic efficacy and may prevent the hepatic first-pass metabolism thereby improving the oral bioavailability of drugs. However, in the case of ropinirole, when extended-release (ER) tablets are used, the systemic exposure obtained is comparable to that of immediate release formulations, (same daily doses), which makes relative bioavailability of RP form ER formulations similar to that of IR tablets (Stocchi et al., 2008, Tompson and Vearer, 2007, Jost and Angersbach, 2008). In both cases; IR and ER tablets most of the drug does not reach the brain due to hepatic metabolism. Moreover, as indicated by Tompson and Vearer (Tompson and Vearer, 2007), the nocturnal concentration of RP may be lower in the once-daily ER tablets than in the three times daily IR tablets. The “off” symptoms between dusk and dawn might be more severe in the once daily ER formulation when compared with the multiple daily IR tablets. In addition, the early morning “off” duration may be longer with the ER formulation of RP due to the fact that with this formulation the increasing slope of the plasma concentration is smoother (Yun et al., 2013). This inefficient utilization of drugs such as in the case of RP requires the

administration of higher drug doses which can result in compromising adverse effects.

Therefore, for PD novel therapeutic strategies that focus on sustained drug release are being investigated to achieve continuous dopaminergic stimulation. Moreover, the development of new drug delivery systems able to cross the BBB can be very interesting when searching for new strategies for neurodegenerative diseases such as PD (Saraiva et al, 2016).

The main obstacle that must be overcome to allow drugs to reach their targets in the CNS is the BBB, a highly selective permeable barrier. This complex physiological barrier separates the circulating blood from the brain extracellular fluid and inhibits the free diffusion of circulating molecules from the blood into the brain. The BBB is composed of non-fenestrated endothelial cells, linked by tight junctions, two basement membranes, and astrocytic end-feet. The tight junctions between adjacent lateral endothelial membranes almost completely seal the BBB, and therefore strictly limit the entrance of systemically circulating endogenous and exogenous compounds (Serlin et al., 2015). For this,

much effort has been directed into improving drug transport across the BBB and into the CNS.

Nanoparticles (NPs) are considered one of the most promising and versatile drug delivery systems into inaccessible regions like the brain, being able to provide protection to therapeutic agents while efficiently delivering them into the damaged areas (Spuch et al, 2012, Linazasoro, 2008, Marcianes et al., 2017).

In the present study was aimed to the development and characterization of biodegradable RP-loaded NPs to target the drug to its site of action. Then the efficacy of the formulation selected is tested in a rotenone-induced animal model of PD. Rotenone (RT) is a natural neurotoxicant used as pesticide (Alam and Schmidt, 2002). When administrated to experimental animals (rats) RT is able to induce some of the behavioral, neurochemical and neuropathological characteristics of human PD (Sherer et al., 2003).

To this date, the neurotoxic mechanism of RT is not fully understood, although it has been reported to inhibit the mitochondrial complex I

(NADH-ubiquinone reductase), showing a relative specificity for the dopaminergic neurons. This mechanism is shared with other neurotoxicants known to induce parkinsonism such as 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) (Schapira, 1994). It is noteworthy to point that this mitochondrial impairment is present in human patients suffering nonfamilial PD (Schapira et al., 1989). This finding supports the proposition that PD may be due to an environmental toxin with actions similar to those of MPTP and RT. Other actions have also been reported to participate in the neuronal damage induced by RT, including oxidative damage, microglial activation, production of ROS (reactive oxygen species), apoptosis and α -synuclein aggregation (Uversky, 2004).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Ropinirole free base (RP) was purchased from Zhejiang Medicine & Health Products Import & Export Co., Ltd (China); Rotenone (RT) was obtained from Sigma-Aldrich (Spain); Poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) Resomer[®] RG 502, 50:50, and inherent viscosity 0.2 dL/g was purchased from Evonik Industries (Germany). Polyvinyl alcohol (PVA) ($M_w = 72$ kDa) was obtained from Merck (Spain). All other reagents and solvents were of

analytical grade and provided by Panreac (Spain). Water was purified from Milli-Q filtration system (Millipore, USA) and was used in the preparation of buffers and solutions.

Preparation of RP-loaded PLGA nanoparticles

RP-loaded PLGA nanoparticles (NPs) were prepared by nanoprecipitation. For method optimization the following amounts of RP were assayed: 4.5; 5; 8 and 10 mg. In all cases, 50 mg of PLGA 502 were used in the preparation of NPs. Briefly, RP and the polymer are dissolved in 4 mL acetone under vortex agitation for 2 min. The dissolution formed is added to 12 mL of 0.5% PVA under continuous stirring for 15 min to obtain the NPs. Then, the suspension formed is evaporated in a rotavapor for 2 hr at 25°C and 70 mBar (Buchi Rotavapor-R, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) to completely remove acetone. The suspension obtained is then washed with distilled water (3-times) and centrifuged (Avanti J-301, Beckman Coulter Inc., USA) at 15,000 rpm for 30 min to remove PVA. Finally, the dispersed solution is freeze-dried for 24 hr with sucrose at 3% as cryoprotectant (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, USA).

Characterization of nanoparticles

Morphological characterization and size distribution

The morphology of the NPs was analyzed by emission scanning electron microscopy (JEOL JEM 6335F, Jeol Ltd., Japan). Samples were coated with a thin layer of colloidal gold applied in a cathodic vacuum evaporator before observation by SEM at 20 KV. The mean diameter and size distribution of the particles were evaluated by laser diffraction using a Microtrac-S3500 particle size analyzer (Microtrac S3500, Microtac Inc., USA) at 25°C. The lyophilized samples were suspended in Milli-Q water and sonicated for 30 s before each determination to prevent clumping. Results are described in terms of mean diameter as well as standard deviation (SD).

Determination of process yield and RP encapsulation efficiency

Process yield (%) was calculated as the ratio between the total weight of NPs obtained and the total weight of both drug and polymer used. Regarding RP encapsulation efficiency (EE%) it is calculated as the ratio between the amount of RP content in the NPs and the amount of drug used for their preparation. For this, the RP content of the nanoparticles was determined by dissolving the NPs (10 mg) in 1 mL CH₂Cl₂. The polymer is then precipitated by addition of ethanol (15 mL). The supernatant obtained after centrifugation (Universal 32, Hettich, Germany) at 5,000 *g*

for 5 min is filtered through 0.45 mm filters and analyzed by the HPLC method previously developed and validated by the authors (Fuster et al., 2015). The apparatus consisted in an HPLC A Series 200 Perkin Elmer chromatograph equipped with a 1740 HP computer and a 235C diode array detector (Perkin Elmer, USA). A Kromasil 100 column (250 mm x 4 mm, 5 μ m) (Teknokroma, S. Coop., Spain) was used with a mobile phase consisting of acetonitrile:phosphate buffer (55:45, v/v), adjusted to pH 6 and containing 0.3% triethanolamine. The mobile phase was pumped through the chromatographic column at a flow rate of 1 mL min⁻¹, the injection volume was 20 μ L and the detection wavelength was set at 245 nm. All the analyses were performed at 25 \pm 0.5°C and each determination was made in triplicate. The HPLC method was validated to demonstrate the absence of interference between RP and PLGA.

Zeta potential

Zeta potential determinations were carried out in a laser-Doppler anemometry using a Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, USA). Measurements were done at 25°C in an aqueous solution using an effective voltage of 150 V. Briefly, 5 mg of each lyophilized NP formulation was weighed, placed in a flask, diluted with distilled water (50 mL) and kept in a sonicator for 5 min. The aqueous dispersions of NPs were then

introduced into a capillary cell (Cell Enhances Capillary[®], Malvern Instruments, USA), for zeta potential measurements. All formulations were analyzed in triplicate.

In vitro drug release study

In vitro release of RP from the NPs was investigated. For this, NPs (10 mg) were suspended in 3 mL of ethanol/water (40:60) (sink conditions) in a water shaker bath (Memmert, Germany) at $37\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ and constant agitation at 100 rpm. At predetermined time intervals all volume was withdrawn, the supernatant completely extracted, filtered through 0.45 μm filters and replaced with the same volume of fresh medium. Release tests were carried out for 6 days. Quantification of RP was performed by the HPLC method indicated before. In vitro release tests were done in triplicate.

Animal testing

Male Wistar rats (Harlan, France), weighing 180-220 g at the beginning of the experiment were used in this study. Animals were housed in groups of eight per cage at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ under normal laboratory conditions and on a standard light-dark cycle. Food and water were supplied ad libitum. All

experiments complied with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures. Correct and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort, according to international guidelines on the ethical use of animals with efforts being made to minimize the number of animals.

Treatments and animal groups

The neurotoxin used to develop in rats a PD-like model was rotenone (RT). For this, RT is dissolved in sunflower oil (Fernández et al., 2012). Animals are divided into the following five groups each containing eight animals:

- Group 1 (G1): Control group. Animals (n =8) receiving the vehicles; sunflower oil (group G1A, n=4) or saline (group G1B, n=4).
- Group 2 (G2): Animals (n = 8) receiving 2 mg/kg/day of rotenone for 35 days (G2A) (n=4) or rotenone (2 mg/kg/day) and blank NPs every 3 days from day 15 (G2B, n=4).
- Group 3 (G3): Animals (n = 8) receiving 2 mg/kg/day of rotenone for 35 days and the amount of NPs equivalent to 1 mg/kg/day RP every 3 days from day 15.

- Group 4 (G4): Animals (n = 8) receiving 2mg/kg/day of rotenone for 35 days and RP in saline (1 mg/kg/day) from day 15.

Doses were selected based upon preliminary tests conducted in our laboratory. For this, appropriate amounts of RP-loaded PLGA NPs adapted to animal weight and encapsulation efficiency were injected i.p. RT was given in sunflower oil and the NPs in saline. At the end of the study period (36 days) animals were killed by decapitation with the use of a guillotine.

Body weight assessment

All animals were weighed on days 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 in order to evaluate weight changes occurring along the study.

Behavioral testing

Catalepsy test

Catalepsy tests (grid and bar) were performed on days 15, 22, 29 and 36. For the grid test animals are hung by all four paws on a vertical grid (25.5 cm x 44 cm, with a space of 1 cm between each wire). As the animal holds onto the grid a stopwatch is started and stopped as soon as the animal shows the first movement. The time is noted as descent latency.

Regarding the bar test, animals are placed with both forepaws on a bar which was 10 cm above and parallel from the base. The rats are placed with both forepaws on the bar in a half-rearing position. Latency with removal of the paw is noted. The maximum descent latency is fixed at 180 s for both tests. Catalepsy tests were repeated three times for each animal.

Akinesia test

Akinesia tests were carried out on days 15, 22, 29 and 36. For this, the latency (expressed in seconds) of the animals to move all four limbs is noted with the test finishing when latency exceeded 180 s. Before each test all animals are acclimatized for 5 min on a wooden elevated (100 cm) platform (100 cm x 150 cm) used for measuring akinesia in rats. With a stopwatch, the time taken by the animal to move all the four limbs is recorded. Akinesia tests were performed in triplicate for each animal.

Rotarod

As a measure of motor balance and coordination a rotarod system with automatic timers and falling sensors was used (Rotarod LE 8200; Letica Scientific Instruments, Spain). Before each test animals are habituated to

the rotarod for 1 min on five consecutive days. On the day of the experiment, animals are placed on the rotarod at a constant speed (12 rpm) and the latency (expressed in seconds) taken for the animals to fall from the rotarod is recorded, with the test finishing when latency exceeded 300 s. Rotarod test were carried out in triplicate on days 15, 22, 29 and 36.

Swim-test

The method described by Haobam et al. (Haobam et al., 2005) has been adapted for our experimental conditions. Swim-tests were carried out on days 15, 22, 29 and 36 of the study, and performed in water tubs (40 cm length x 40 cm width x 40 cm height). The depth of the water bath was kept at 30 cm with the temperature maintained at $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. At the end of the test animals were wiped dry with a towel. Swim-scores were recorded on a performance intensity scale of 0-3: 0, hind part sinks with head floating; 1, occasional swimming using hind limbs while floating on one side; 2, occasional floating/swimming only; and 3, continuous swimming. Tests were performed in triplicate for each animal.

Histochemical assessments

Brain processing

At the end of the study period (36 days) animals were sacrificed by decapitation. Immediately after decapitation brains were removed, frozen on dry ice and stored at -80°C until analysis. Coronal brain sections (30 µm thick) at the level of striatum and substantia nigra were obtained by means of a cryostat (Leica CM1850, Leica Biosystems, Germany). The brain slices were thaw-mounted onto Superfrost Plus slides (Thermo Scientific, Germany), dried at 36°C on a hot plate and kept frozen at -80°C.

Nissl-staining

For Nissl-staining brain slices are fixed in 4% formaldehyde in phosphate buffer at pH 7.4. Samples are then washed twice with phosphate buffer, and submerged in 0.5% cresyl violet acid solution for 30 min. Afterwards samples are washed in distilled water and dehydrated in graded ethanol solutions (70%, 95% and 100%). The slices are finally cleared in xylene (twice, 5 min each). Then, the slices are coverslipped with DPX organic mounting medium (Sigma-Aldrich, Spain). Once dried, histological images at the level of substantia nigra were obtained with a digital camera (DFC425 camera, Leica, Germany) coupled to a light microscope (Leitz Laborlux S, Leica, Germany).

GFAP and TH immunohistochemistry

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) immunohistochemistry was carried out as previously reported by García-García et al., with minor modifications (Garcia-Garcia et al., 2015). The samples are fixed with 4% formaldehyde, washed, permeabilized in TBS/0.1%Tween 20 and blocked in 5% albumin dissolved in TBS (Tris-buffered saline). Then, the slides are incubated overnight at 4°C with a fluorescent anti-GFAP antibody conjugated with the cyanine dye Cy3 (dilution 1:500; Sigma-Aldrich, USA), eliminating the need to use a secondary antibody. After washing for removal of the unbound antibody, the brain sections are cover-slipped with homemade Mowiol aqueous mounting medium. Digital images are then obtained with a fluorescence digital camera (Leica DFC 3000G, Germany) coupled to a microscope (Leica DM2000LED, Germany) using tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) filter.

For TH (Tyrosine hydroxylase) immunohistochemistry, a standard procedure was followed. After fixing, permeabilizing with 0.1%Tween 20 in TBS, washing and blocking, the TH antibody (dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA) is added to the samples. After overnight incubation

at 4°C, the slides are washed with TBS/0.1% Tween 20 (3 x 5 min at RT) and the corresponding secondary FITC-labeled antibody (dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA) then added. Finally, after incubation (2 hr at RT) and washing, the slides are mounted with Mowiol aqueous medium and observed with a fluorescence microscope (Leica DM2000LED, Germany). Digital images are captured using the FITC filter (Leica DFC 3000G, Germany).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out using the Statgraphics® *Plus* v. 5.1 software (John Wiley and Sons, USA). The catalepsy, akinesia, rotarod and swim results were analyzed for statistical significance employing non-parametric analyses (multifactorial Kruskal–Wallis one-way ANOVA).

RESULTS AND DISCUSSION

Nowadays, there is not a cure for PD with the need for new treatments or an improvement of the currently available. Nanoparticles (NPs) are considered one of the most promising and versatile drug delivery systems to improve the access of drugs into the brain. For this, the present study was aimed to develop a new delivery system for ropinirole consisting of PLGA nanoparticles destined to improve the treatment of PD.

Different RP-loaded PLGA formulations have been prepared with different amounts of RP (Table 1, formulations NPRP-1 to NPRP-4). Mean diameters of NPs as measured by dynamic light scattering were lower than < 200 nm (Table 1), being therefore suitable to cross the BBB. Several studies have demonstrated that polymeric NPs made with biodegradable polymers such as PLGA and with particle sizes around 250 nm, are able to reach different areas of the brain (Hillaireau and Couvreur, 2009; Suchlfart et al., 2012).

The mean values of process yield for all RP-loaded PLGA NPs ranged from $47.3 \pm 2.7\%$ to $56.7 \pm 5.5\%$ (Table 1). Encapsulation efficiency increased as the amount of RP increased from 4 to 8 mg; however this increase was not observed when 10 mg RP was used. The highest value of encapsulation

efficiency was obtained for the formulation made with 8 mg of RP (74.8±8.2%). High drug payloads are advantageous to minimize the amount of NPs to be administered and to reduce the amount of polymer given which is also desirable (Reis et al., 2006a, Reis et al., 2006b). Taking into consideration all the results obtained formulation NPRP-3 was selected to continue the study.

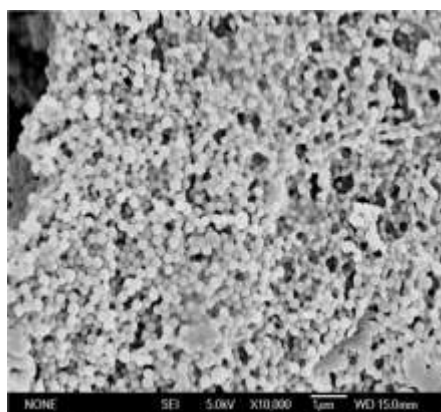
Formulation	Amount of ropinirole (mg)	Particle size (nm) (mean ± SD)	Yield of production (%) (mean ±SD)	Encapsulation efficiency (%) (mean ± SD)
NPRP-1	4.5	148.4±40.8	47.3±2.7	54.5±7.7
NPRP-2	5	133.9±57.3	50.1±3.5	65.5±0.9
NPRP-3	8	152.2 ±31.0	56.7±5.5	74.8±8.2
NPRP-4	10	155.0±40.5	48.9±7.9	58.1±10.4

Table 1.- Formulations prepared.

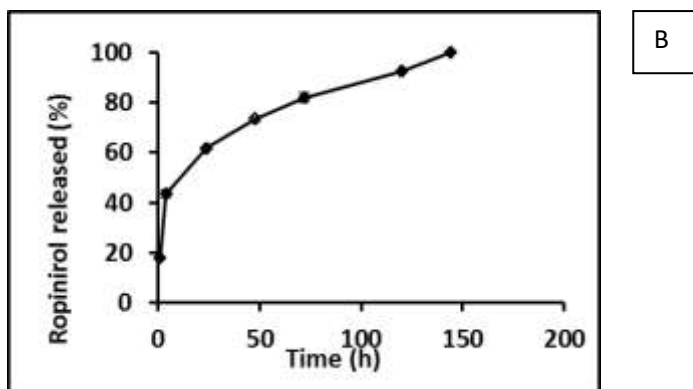
The determination of the zeta potential of nanosystems is of great interest due to its influence on the stability of the suspension and their passage through the BBB. Positively charged nanoparticles may interact with negatively charged cell surfaces thereby representing an advantage of

such NPs. On the other hand, negatively charged particles at low concentrations do not alter the BBB (Lockman et al. 2004). In our case the value of zeta potential obtained for the formulation selected (NPRP-3) was -14.25 ± 0.43 mV, which is adequate for crossing the BBB after suspending the NPs in saline before administration as a standard procedure.

Figure 1 shows microphotographs of formulation NPRP-3 as well as the in vitro release profiles obtained for RP from this formulation. As it can be seen a burst release of around 20% is obtained within the first hour. From 25 hours a slower release is maintained for 5 days that can be described by a mean zero-order rate constant of 4.13 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{h}/10$ mg of NPs.



A



B

Figure 1.- SEM microphotographs of RP-loaded PLGA nanoparticles (A). Mean release profiles (\pm S.E.M., n=3) of RP from PLGA nanoparticles. RP (ropinirole) (B).

To evaluate the efficacy of the new nanosystem developed the selected formulations was tested in a rotenone-induced animal model of PD. The neurotoxin rotenone is able to reproduce in animals most of the features of PD including Lewy body formation in the nigral neurons unlike other existing models (Sindhu et al., 2005). Various studies performed in rats have demonstrated that the damage produced by rotenone is gradual and uniform in a global area of the nigrostriatal system, unlike the unilateral damage observed when using 6-hydroxydopamine (6-OHDA) which mainly causes local degeneration of neurons (Huang et al, 2010, Mercanti et al., 2012). Consequently, the rotenone-induced PD model can be considered

as more adequate than 6-OHDA to mimic the pathogenesis and progress of PD (Hirsch et al., 2003).

Mortality occurred in 14.3% of the animals treated with rotenone but no deaths occurred in control animals along the study period. Other authors (Cannon et al, 2009) using rotenone dissolved in DMSO (2.75-3 mg/Kg/day) have reported 10% mortality occurring in animals shortly (minutes) after injection. In our case none of the animals died shortly after injection probably due to the lower dose of rotenone (2mg/kg/day) and the lower toxicity of the vehicle used in our study (sunflower oil).

The evolution of body weight was recorded at time 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 days (Figure 2.A). Animals belonging to control groups (G1A and G1B), which correspond to those receiving the vehicles; sunflower oil or saline respectively, experienced a gradual and steady weight gain throughout the study with non-significant differences ($p>0.05$) observed between both control groups (G1A and G1B) and subgroups G2A and G2B. Animals treated with RT (groups G2, G3 and G5) showed a very slight weight increase during the first two weeks, probably due to the development of neurodegeneration. After 15 days of the study animals

treated with RP (G3 and G4) improved steadily their weight gain in contrast with group G2 composed of animals just receiving RT.

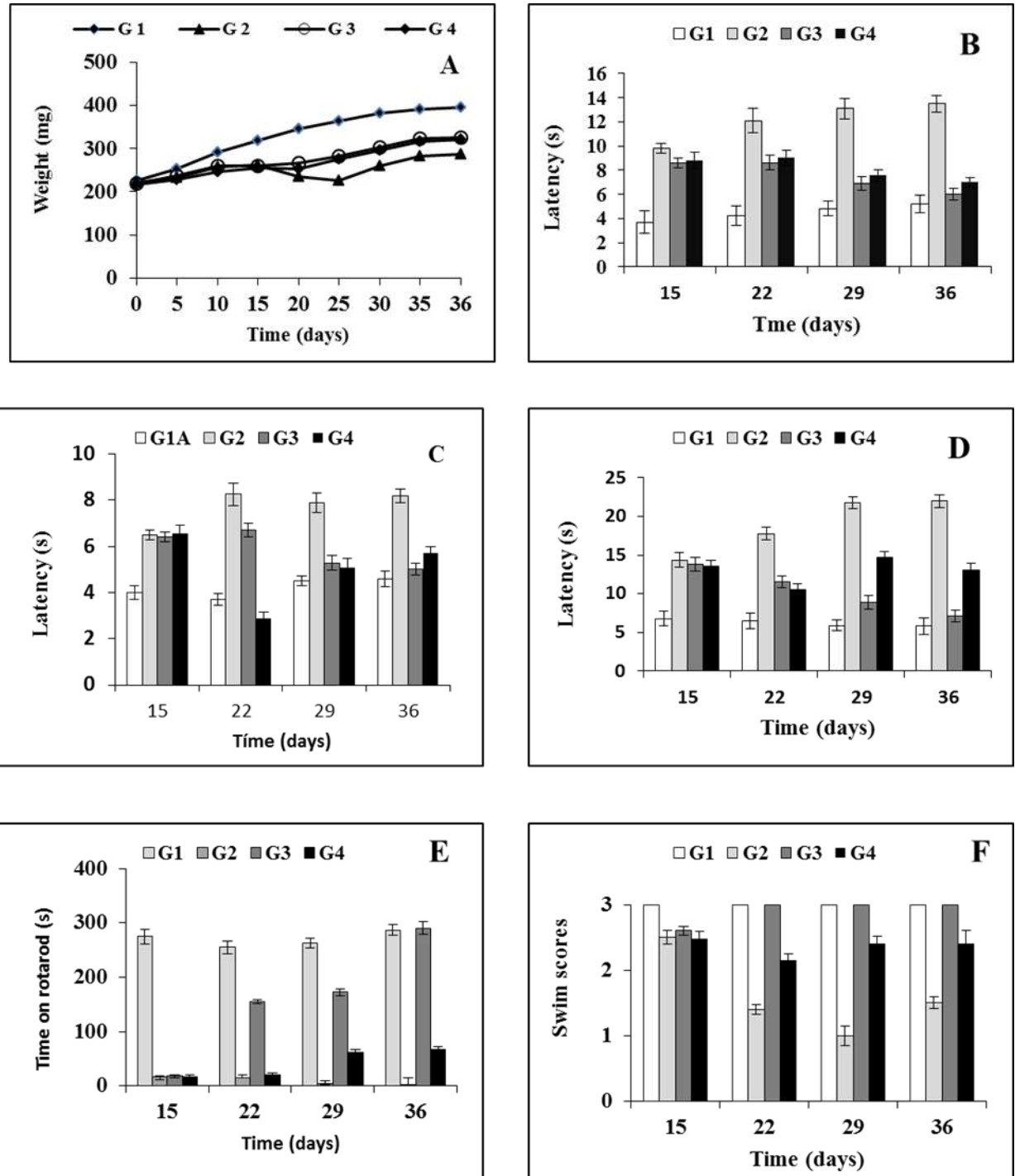


Figure 2.- Evolution of rat-body weight throughout the study (36 days) (A). Results of the behavioral tests: catalepsy test on bar (B) and grid (C),

akinesia test (D), rotarod (E) and swim-test (F) performed in all animal groups.

The results obtained in the catalepsy test (grid and bar) at 15, 22, 29 and 36 days are shown in Figure 2.B and 2.C. Non-significant differences ($p > 0.05$) were obtained in control animals treated with both vehicles; sunflower oil (G1A) or saline (G1B). However, statistically significant differences were found between RT-treated animals (G2) and control animals (G1A and G1B). The neurotoxin RT induced an increase in latency both in the grid and bar tests of catalepsy which was reverted by RP. Administration of RP either in saline or encapsulated within PLGA NPs clearly improved latency from day 22th of the study. This time corresponds to 7 days after initiating the administration of RP. However, at the end of the study period (36 days) the best results were achieved in group G3 which received RP-loaded PLGA NPs, thereby confirming the potential interest of the new nanosystem developed for RP.

Figure 2.D shows the results obtained in the akinesia test in which non-significant differences were found in control group (G1A, G1B). The administration of RT (G2) significantly prolonged descent latency when

compared with G1A and G1B, with a value of latency 2.5 times higher in group G2 with respect to that of G1A or G1B. As in the catalepsy test, the best results corresponded to group G3 receiving RP-loaded NPs. At the end of study (36 days), the latency values for G3 group were similar to control groups (G1). However, administration of RP in saline (1mg/Kg/day) resulted at the end of the study in latency values which were statistically significant higher than those of control group (G1B).

The rotarod test is widely used to evaluate motor coordination in rodents being especially sensitive in detecting cerebellar dysfunction. This test was performed on days 15, 22, 29 and 36. The administration of RT produced a significant reduction in the time that animals spent on the rotarod when compared with control group (G2 versus G1A or G1B) (Figure 2.E). These marked differences are indicative of the development of the process of neurodegeneration produced by the neurotoxin. The administration of RP (G3 and G4) improved motor coordination with the best results obtained for group G3. These animals showed at the end of study similar results to control animals.

Figure 2.F shows the results obtained in the swim-test which is used to monitor the overall motor ability/deficit of the animal. At all times assayed control animals (G1A and G1B) obtained the highest values (score = 3) (Figure 2.F). Swimming ability of RT-treatment animals (group G2) was decreased when compared to control animals ($p > 0.05$) (Figure 6.f; G2 vs G1A or G1B). Animals receiving RP (G3 and G4) showed higher swimming scores than group G2. As in the other behavioral tests carried out, the best results corresponded to group G3 that from day 22th and until the end of study (36 days) exhibited swimming scores similar to those of control animals.

Although clinical evidence of RP-related neuroprotection or to other dopaminergic agonists is limited, there are several *in vitro* and *in vivo* studies reporting a neuroprotective role for this type of drugs (Le and Jankovic, 2001; Schapira, 2002). Thus, in addition to their ability to reduce the symptomatology of PD, it has been described that ropinirole and pramipexole are able to protect against RT-induced neurotoxicity (Schapira, 2002; Chen et al., 2008). Several mechanisms seem to intervene in the neuroprotective effects exerted by RP in different experimental models of PD, including reduction of apoptosis markers and

neuroinflammation (Park et al., 2013), and partial restoration of the antioxidant balance (Bisht et al., 2014).

Nissl-staining is a histological method frequently employed to analyze the morphology and pathology of neurons as well as to study the cytoarchitecture of the brain (Pilati et al., 2008). The results obtained in our study showed signs of neuronal damage at the level of the substantia nigra pars compacta (SNpc) in RT-treated animals with an observable reduction in the number neurons (Figure 3, group G2). These results are in agreement with those reported by other authors (Tapias et al., 2013; Swarnkar et al., 2013). Subchronic treatment with RP significantly prevented the RT-induced cell death at the level of SNpc, regardless the formulation used (Groups G3 or G4), although a slight higher neuroprotective effect is observable when RP is given as NPs.

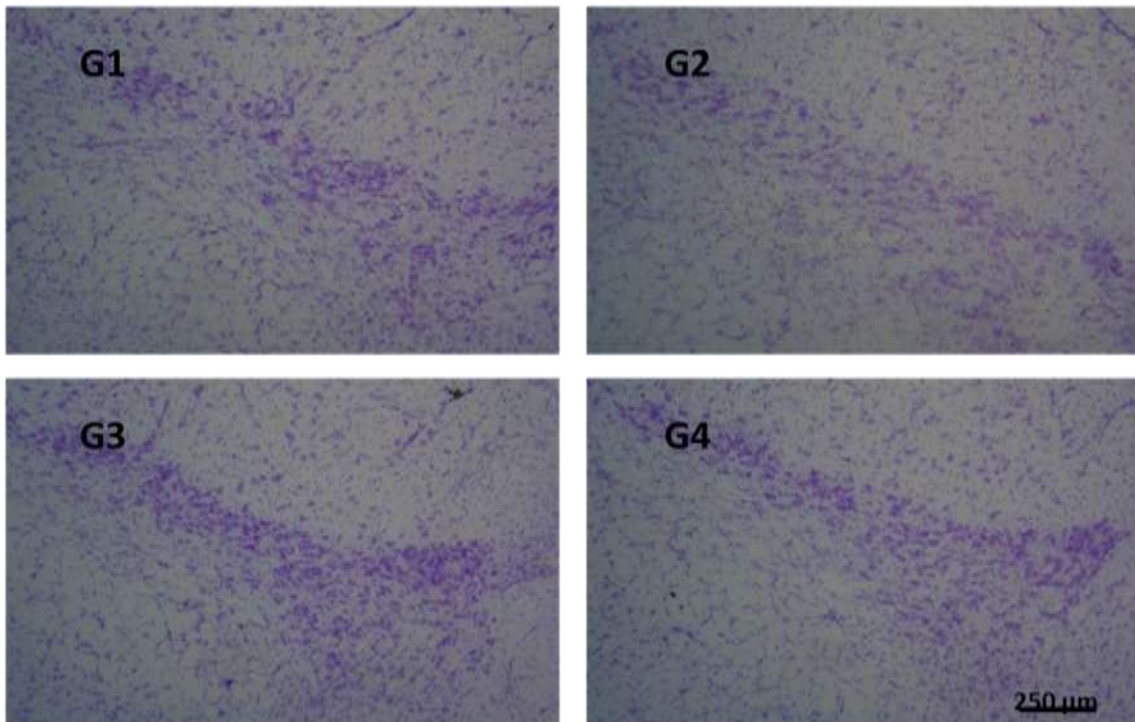


Figure 3.- Representative Nissl-staining (cresyl violet) of nigral neurons from brain sections (substantia nigra pars compacta, 30 μm) corresponding to all animal groups. G1: control group; G2: RT-treated control group; G3 and G4 RT-treated animals also receiving; G3: RP-loaded PLGA nanoparticles; and G4: RP in saline. RT (rotenone), RP (ropinirole).

Neurodegeneration is usually associated with activation of glial cells which seems to play an essential role for the development of neuronal damage by increasing the generation of ROS (reactive oxygen species) (Thomas et al., 2004). Moreover, after a brain insult occurs a slow astrocytic response can maintain microglia activation and eventually lead to a chronic brain lesion (Gao et al., 2013). When using RT as neurotoxin astrocytic activation has been recently reported both *in vitro* (Swarnkar et al., 2012) and *in vivo* (Tapias et al., 2013).

In order to evidence a putative astrocytic activation associated to our rotenone model, non-quantitative GFAP immunohistochemistry was performed. As Figure 4 shows, an intense astroglial response in the substantia nigra was observed after RT treatment. The astrocytic response induced by RT was characterized by strong hypertrophy of cell bodies and thickening of processes (G2). These features are considered typical of reactive astrogliosis (Sofroniew and Vinters, 2010). The mechanisms involved in the brain damage induced by activated astrocytes are multiple, including oxidative stress through increasing the generation of reactive oxygen species (ROS) (Thomas et al., 2004) and the release of pro-inflammatory cytokines (Gómez et al., 2007; Choi et al., 2015). In contrary, RP significantly reduced such rotenone-induced reactive astrogliosis, yielding GFAP labeling similar to that of control animals with independence of the RP formulation used.

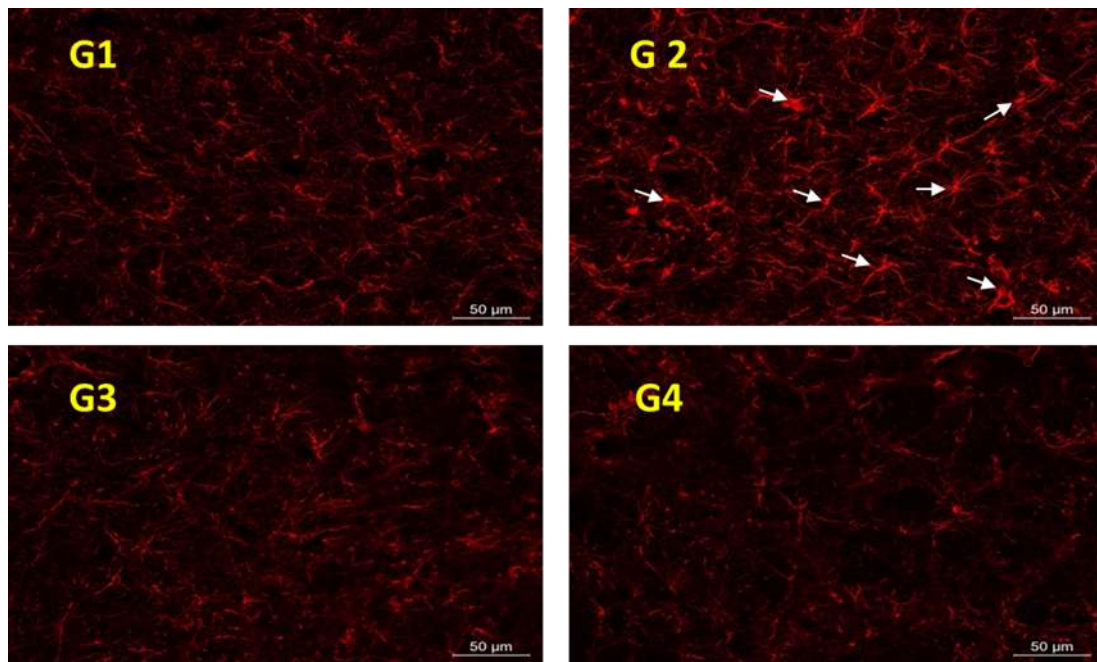


Figure 4.- Glial activation induced by RT at the level of substantia nigra was prevented by RP as assessed by GFAP immunohistochemistry. Representative fluorescence micrographs of coronal brain slices at the level of the substantia nigra from all animal groups assayed (G1 to G4). Arrow heads point to aberrant cell structures. G1: control group; G2: RT-treated control group; G3: RP-loaded PLGA nanoparticles; and G4: RP in saline. RT (rotenone), RP (ropinirole).

RT-induced parkinsonism in animals has been reported to be associated with an observable reduction of TH-immunoreactive neurons in the SNpc (Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003; Moreira et al., 2012; Bassani et al., 2014). In agreement with these studies, in our case a marked reduction of the TH immunoreactivity at the level of the SNpc can be observed as shown in the fluorescence micrographs (Figure 5.A). In addition, when quantitative analysis was carried out, the reduction of the

fluorescence intensity at the level of the SNpc reached almost 30% (Figure 5.B). More importantly, this decrease was completely reverted by RP-loaded PLGA NPs (G3) but not benefit was observed when this drug was given in saline (G4).

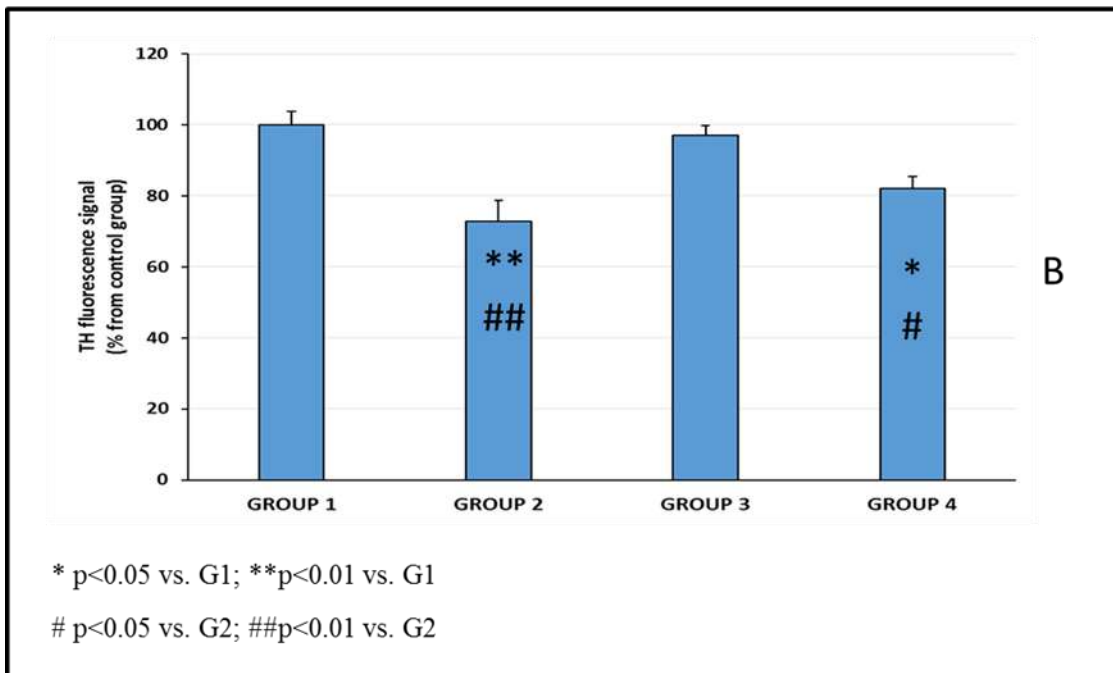
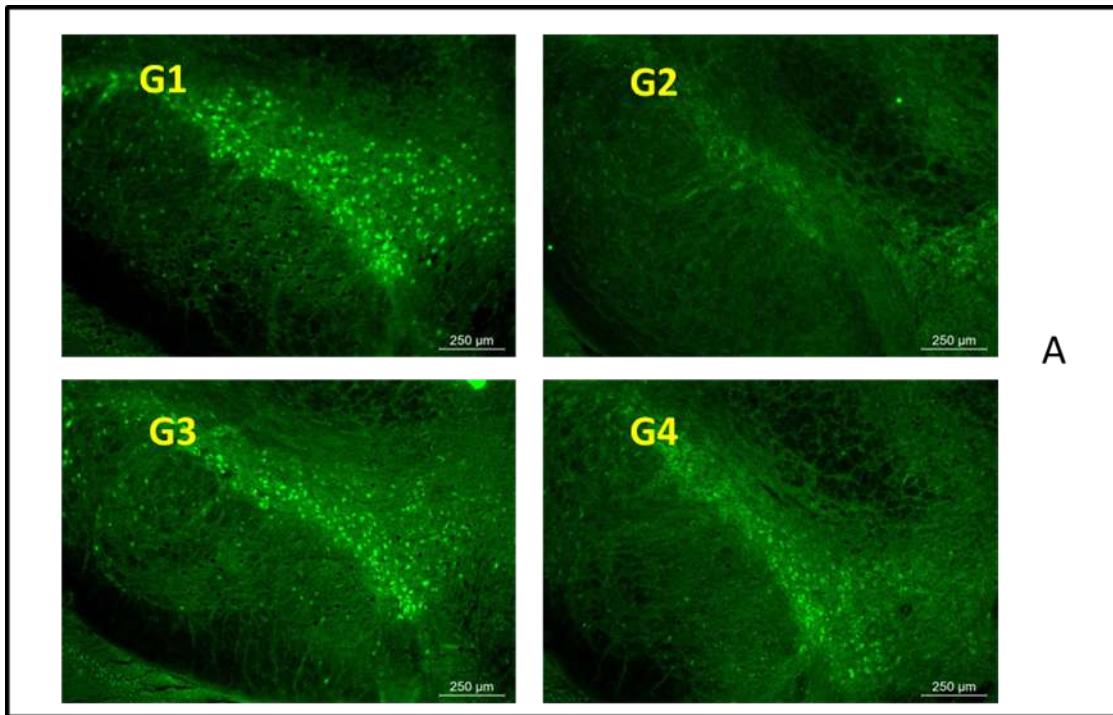


Figure 5.- Representative TH immunohistochemistry fluorescence in coronal brain slices at the level of the substantia nigra for all animal groups (G1 to G4). G1: control group; G2: RT-treated control group; G3: RP-loaded PLGA nanoparticles; and G4: RP in saline. RT (rotenone), RP (ropinirole).

CONCLUSION

Ropinirole-loaded PLGA nanoparticles have demonstrated to be effective in reverting neurodegeneration in a rotenone-induced animal model of Parkinson's disease.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a research project Fundación Mutua Madrileña (FMM2012) and by the Complutense University UCM research group 910939.

REFERENCES

Alam M, Schmidt WJ. (2002). Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 136: 317-24.

Bhatt D, Nisha Ajmeri N, Mandal S, et al. (2011). Nanoparticle: design, characterization and evaluation for oral delivery of ropinirole hydrochloride. *Elixir Pharmacy* 39: 4687-9.

Bassani TB, Gradowski RW, Zaminelli T, et al. (2014). Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Res* 1593: 95-105.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, et al. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-6.

Bisht R, Kaur B, Gupta H, et al. (2014). Ceftriaxone mediated rescue of nigral oxidative damage and motor deficits in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Neurotoxicology* 44:71-9.

Cannon JR, Tapias VM, Na HM, et al. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 34: 279-90.

Chen S, Zhang X, Yang D, et al. (2008). D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways. *FEBS Lett* 582: 603-10.

Choi WS, Kim HW, Xia Z. (2015). JNK inhibition of VMAT2 contributes to rotenone-induced oxidative stress and dopamine neuron death. *Toxicology* 328: 75-81.

Fernández M, Barcia E, Fernández-Carballido A, et al. (2012). Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease. *Int J Pharm* 438: 266-78.

García-García L, Delgado M, Al-Sayed AA, et al. (2015). In vivo [¹⁸F] FDG PET imaging reveals that p-chloroamphetamine neurotoxicity is associated with long-term cortical and hippocampal hypometabolism. *Mol Imaging Biol* 17:.239-47.

Gao Z, Zhu Q, Zhang Y et al. (2013). Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol* 48: 690-701.

Gómez C, Bandez MJ, Navarro A. (2007). Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Front Biosci* 12: 1079-93.

Hillaireau H, Couvreur P. (2009). Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery cell. *Mol Life Sci* 60: 2873-96.

Haobam R , Sindhu KM, Chandra G et al. (2005). Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav Brain Res* 163: 159-167.

Hirsch EC, Höglinger G, Rousset E, et al. (2003). Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm* 65: 89-100.

Huang RQ, Ke WL, Liu Y, et al. (2010). Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in a rotenone-induced chronic Parkinson model. *J Neurol Sci* 290: 123-30.

Jost WJ, Angersbach D. (2005). Ropinirole, a non-ergoline dopamine agonist. *CNS Drugs Rev* 11: 253-72.

Jost WH, Buhmann C, Fuchs G, et al. (2008). Spiegel-Meixensberger M. Initial experience with ropinirole PR (prolonged release). *J Neurol* 5: 60-3.

Le WD, Jankovic J. (2001) Are dopamine receptor agonists neuroprotective in Parkinson's disease? *Drugs Aging* 18: 389-9.

Linazasoro, G. (2008). Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinsonism Relat Disord* 14: 383-92.

Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, et al. (2004). Nanoparticle surface charges altering blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target* 12: 635-41.

Marcianes P, Negro S, García-García L, et al. (2017). Surface-modified gatifloxacin nanoparticles with potential for treating central nervous system tuberculosis. *Int J Nanomedicine*. 12: 1959-68.

Mercanti G, Bazzu G, Giusti P. (2012). A 6-hydroxydopamine *in vivo* model of Parkinson's disease. *Methods Mol Biol* 846: 355-64.

Moreira CG, Barbiero JK, Ariza D, et al. (2012). Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: a new approach for an old neurotoxin. *Neurotox Res* 21: 291-301.

Park G, Park YJ, Yang HO, et al. (2013). Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism. *Pharmacol Biochem Behav*. 104:163-8.

Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, et al. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J Histochem Cytochem* 56: 539-50.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro A, et al. (2006a) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2: 8-21.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro A, et al. (2006b) Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine* 2: 53-65.

Saraiva C, Praça C, Ferreira R, et al. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release* 235: 34-47.

Schapira AH. (1994) Mitochondrial function and neurotoxicity. *Curr Opin Neurol* 7: 531-6.

Schapira AH. (2002) Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 3: 7-14.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, et al. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1(8649): 1269.

Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, et al. (2003). Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 341: 87-90.

Serlin Y, Shelef I, Knyazer B et al. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 38 :2-6.

Sindhu KM, Saravanan KS, Mohanakumar KP. (2005). Behavioral differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. *Brain Res* 1051: 25-34.

Sofroniew MV, Vinters HV. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.

Spuch C, Saida O, Navarro C. (2012). Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 6: 2-18.

Stocchi F, Hersh BP, Scott BL, et al. (2008) Ease PDMSI: Ropinirole 24-hour prolonged release and ropinirole immediate release in early Parkinson's disease: a randomized, double-blind, non-inferiority crossover study. *Curr Med Res Opin* 24: 2883-95.

Suchlfart S, Gelperina S, Kreuter J. (2012). Transport of drug across the blood brain barrier by nanoparticles. *J Control Release* 161: 264-73.

Swarnkar S, Goswami P, Kamat PK, et al. (2013). Rotenone-induced neurotoxicity in rat brain areas: a study on neuronal and neuronal supportive cells. *Neuroscience* 230: 172-83.

Swarnkar S, Singh S, Goswami P, et al. (2012). Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem Res* 37: 2178-89.

Tapias V, Greenamyre JT, Watkins SC. (2013). Automated imaging system for fast quantitation of neurons, cell morphology and neurite morphometry in vivo and in vitro. *Neurobiol Dis.* 54: 158-68.

Thomas DM, Walker PD, Benjamins JA, et al. (2014). Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 1-7.

Tolosa E, Wenning G, Poewe W. (2006). The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 75-86.

Tompson DJ, Vearer D. (2007). Steady-state pharmacokinetic properties of a 24-hour prolonged-release formulation of ropinirole: results of two randomized studies in patients with Parkinson's disease. *Clin Ther* 29: 2654-66.

Uversky VN. (2004). Neurotoxicant induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 318: 225-41.

Yun JY, Kim HJ, Lee JY, et al. (2013). Comparison of once-daily versus twice-daily combination of ropinirole prolonged release in Parkinson's disease. *BMC Neurol*. 13: 113-20.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo primordial de esta memoria experimental es el desarrollo, caracterización *in vitro* y evaluación en un modelo animal de nuevos sistemas de liberación controlada de ropinirol, consistentes en micropartículas y nanopartículas biodegradables, en las que se emplea PLGA como polímero formador de la cubierta. Ambos sistemas terapéuticos están destinados a su administración parenteral en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

1. ARTÍCULO 1

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC-UV PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ROPINIROL EN NUEVOS SISTEMAS MULTIPARTICULARES DE PLGA: MICROESFERAS Y NANOPARTÍCULAS.

Se han desarrollado micropartículas y nanopartículas biodegradables de ropinirol (RP), y se ha procedido a la puesta a punto y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección UV (HPLC-UV) para la cuantificación simultánea de RP base y clorhidrato de RP, que permita su cuantificación en el cálculo del rendimiento de encapsulación en las microesferas y nanopartículas elaboradas, así como en los estudios de cesión *in vitro*.

La preparación de las microesferas biodegradables de RP se ha llevado a cabo con el polímero PLGA RG 502, empleando el método de

evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. Para ello se ha empleado una cantidad de RP base de 120 mg y 400 mg de PLGA 502.

En el caso de las nanopartículas de RP se ha utilizado la técnica de nanoprecipitación y el mismo polímero que el empleado en la elaboración de las micropartículas. Para ello, se ha empleado una cantidad de 4,5 mg de RP base y 50 mg de PLGA 502.

Se ha desarrollado y validado un método HPLC-UV simple para la cuantificación simultánea de ropinirol (RP) como base libre encapsulado en los dos nuevos sistemas multiparticulares desarrollados (microesferas y nanopartículas), así como para la cuantificación de RP en forma de clorhidrato, forma en la que se utiliza para la administración de una dosis de choque, antes de la administración de los sistemas multiparticulares.

Existen pocos métodos de cromatografía líquida de alta resolución descritos en la literatura, pero todos ellos son para clorhidrato de ropinirol (Azeem y col., 2008; Bhosale y col., 2011; Kothapalli y col., 2011; Samala y col., 2014; USP NF, 2014). Además, solamente existe un trabajo en el que se describe un método de cuantificación de RP como base libre, pero mediante espectrofotometría (Anampally y col., 2011).

En la optimización del método de cuantificación de RP en los sistemas multiparticulares desarrollados, se han considerado los siguientes

parámetros: composición, pH y flujo de la fase móvil, y temperatura. La columna seleccionada corresponde a una C18 Kromasil 100 (250x4 mm, 5 μm).

Se han ensayado distintas proporciones de fase móvil (acetonitrilo: tampón fosfato) y distintos pHs. Los resultados obtenidos mostraron que a bajas proporciones de acetonitrilo (45%), el RP, en forma de base o clorhidrato, presentan tiempos de retención cortos, pero sin una buena resolución entre sus picos. Al aumentar la proporción de acetonitrilo se incrementan los tiempos de retención y la simetría de los picos, mejorando la resolución entre ambos.

En nuestro caso, los mejores resultados se han obtenido con una composición de la fase móvil de acetonitrilo: tampón fosfato (55:45%, v/v) ajustado a pH 6 y que contiene un 0,3% de trietanolamina. Con esta composición se obtienen picos adecuados para RP base libre y clorhidrato de RP, y con tiempos de retención de 7,70 min y 5,05 min, respectivamente. Además, esta composición permite una buena separación entre ambos ($R=5,23$); lo que es indicativo de su especificidad. Por lo que se refiere al flujo de la fase móvil, se ha establecido un valor de 1 mL/min, y una longitud de onda de 245 nm, para la detección y cuantificación de RP base y clorhidrato de RP en un único análisis. Con estas condiciones de trabajo, se ha obtenido un valor para el factor de cola de 1,1 para ambos picos, y unos valores de platos teóricos de 5999 para RP base y 4488 para clorhidrato de RP; valores que se encuentran dentro de

los límites recomendados (factor de cola para clorhidrato de RP ≤ 2 y número de platos teóricos >2000) (Artículo 1, tabla 1).

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se procede a la validación del método analítico, de acuerdo con los criterios descritos por las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización para la validación de procedimientos analíticos (ICH, 2005).

El método resultó ser lineal en el rango de concentraciones de 2,5-50 $\mu\text{g/ml}$ para RP base y clorhidrato de RP ($r=0,9991$ y $r=0,9998$, respectivamente) (Artículo 1, tabla 1). El análisis estadístico de los estudios de repetibilidad (precisión intradía) y precisión intermedia (interdía) presentaron desviaciones estándar relativas (R.S.D.) inferiores a 1,8% (Artículo 1, tabla 2), lo que permite considerar al método como preciso.

Los resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método dan lugar a porcentajes de recuperación de RP base que oscilan entre 97,47% y 101,90%, con una R.S.D. inferior a 1,27%, y para clorhidrato de RP que oscilan entre 97,60% y 102,65%, con una R.S.D. inferior a 0,87% (Artículo 1, tabla 3), lo que demuestran la exactitud del método analítico.

El límite de detección calculado para RP base es de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación de 2,4 $\mu\text{g/ml}$. El límite de detección calculado para clorhidrato de RP es de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación de

clorhidrato de RP es 0,9 µg/ml. Estos valores son adecuados para la detección y cuantificación de RP base y clorhidrato de RP.

La estabilidad se evaluó analizando muestras de RP base y clorhidrato de RP, con concentraciones de 50 µg/ml, a temperatura ambiente durante 24 h y luz, y a temperatura de congelación durante 24 horas y tras 15 días, condiciones ambientales que permiten reproducir la situación de preparación y manipulación de los sistemas multiparticulados desarrollados para RP. Los resultados obtenidos demuestran la estabilidad de tanto RP base como clorhidrato, ya que en todas las condiciones experimentales analizadas los cambios resultantes en compuesto activo fueron inferiores al 2%, sin que apareciesen otros picos en el cromatograma. Se ha obtenido una separación excelente entre picos, lo que indica que el método analítico desarrollado es selectivo en las condiciones experimentales ensayadas.

La robustez del método se produce cuando los efectos de los cambios en las condiciones cromatográficas, tales como; proporciones de componentes de la fase móvil ($\pm 2\%$), flujo ($\pm 0,1$ ml/min), temperatura del horno en columna ($\pm 2^\circ\text{C}$) y pH de la fase móvil ($\pm 0,3$ unidades) no produce cambios significativos en los resultados. Por ello, se han ensayado variaciones en los porcentajes de los componentes de la fase móvil (acetonitrilo: tampón fosfato); concretamente 43:57; 45:55; 47:53. El rango de pHs ensayado ha sido de 5,7 a 6,3; el flujo de la fase móvil ha oscilado entre 0,9 y 1,1 ml/min; y la temperatura de la columna se ha ensayado entre 23 y 27°C (Artículo 1, tabla 5). En nuestro caso, los porcentajes de recuperación oscilaron entre 98,1–101,1% y 98,1-101,5% para RP base y

clorhidrato de RP, respectivamente, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las distintas condiciones experimentales ensayadas. Por tanto, el método cromatográfico propuesto es reproducible y robusto.

Se han analizado también muestras de PLGA 502, micropartículas no cargadas, micropartículas no cargadas junto con una solución de RP base (100 $\mu\text{g/ml}$), nanopartículas no cargadas, y nanopartículas con una solución de RP base (50 $\mu\text{g/ml}$). Los cromatogramas obtenidos para las muestras que contienen PLGA 502 muestran un pico a los 2,9 min, que corresponde al diclorometano (CH_2Cl_2), lo que demuestra que el polímero ha sido precipitado completamente después de la adición de etanol (15 ml). Las microesferas no cargadas (Artículo 1, figura 1.b) y nanopartículas no cargadas, han dado lugar a cromatogramas en los que únicamente aparece el pico de CH_2Cl_2 . Por último, los cromatogramas obtenidos para micropartículas no cargadas con una solución de RP (100 $\mu\text{g/ml}$) (imágenes no mostradas) o nanopartículas no cargadas con una solución de RP (50 $\mu\text{g/mL}$), usando el procedimiento de extracción del RP de las micropartículas y nanopartículas, muestran únicamente los picos característicos de CH_2Cl_2 y RP base (Artículo 1, figura 1.d).

Por último, se han analizado muestras de microesferas cargadas con RP y de nanopartículas cargadas con RP. El volumen de etanol más adecuado para realizar la extracción de RP a partir de las micro y nanopartículas, fue de 15 ml, lo que dio lugar a recuperaciones medias del 99%, con desviaciones inferiores al 2,0%, para ambos sistemas multiparticulados, lo que indica que el proceso de extracción de RP fue

eficaz, consistente y reproducible (Artículo 1, figura 1.c). Además, en los cromatogramas únicamente aparecen los picos característicos de CH₂Cl₂ y RP base.

En consecuencia, se ha desarrollado y validado un método de HPLC-UV para la cuantificación simultánea de tanto RP base como clorhidrato de RP; método que es sencillo, rápido, específico, preciso, y reproducible.

Una vez validado, el nuevo método de HPLC-UV ha sido empleado para la determinación de la eficacia de encapsulación de RP en los sistemas de micro y nanoparticulados desarrollados.

2. ARTÍCULO 2

REVERSIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR ROTENONA POR UN NUEVO SISTEMA LIBERACIÓN CONTROLADA DE ROPINIROL.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un nuevo sistema de liberación controlada de RP, consistente en microesferas biodegradables de PLGA cargadas con RP, y destinado al tratamiento de la EP. El nuevo sistema de administración se caracterizó *in vitro* y se ensayó su eficacia *in vivo* en un modelo animal de EP inducido por rotenona.

Para ello, se prepararon microesferas biodegradables de PLGA por medio de la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. La selección de este método de encapsulación se realizó teniendo en cuenta que es un método sencillo, y que cuando se usa para encapsular fármacos insolubles en agua, tales como RP base, normalmente se obtienen valores altos de eficacia de encapsulación. En la optimización del método de encapsulación se ensayaron las siguientes variables: cantidad de RP (40, 80 y 120 mg) y tipo de PLGA (PLGA RG 502 y PLGA RG 502H). En ambos casos, la cantidad de polímero utilizada fue de 400 mg.

En la tabla 1 del Artículo 2 se muestran los valores medios del rendimiento del proceso de encapsulación y los porcentajes medios de encapsulación (EE) obtenidos para las diferentes formulaciones elaboradas. Todas las formulaciones (F1-F3 y F1H-F3H) presentaron rendimientos del proceso de elaboración superiores al 65%, no observándose diferencias significativas entre ambos polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H). Al aumentar la cantidad de RP utilizada en la preparación de las micropartículas, la eficacia de encapsulación disminuyó ligeramente.

Los valores medios de la eficacia de encapsulación fueron superiores al 79,90% y 89,0% para las formulaciones preparadas con los polímeros PLGA 502 y 502H, respectivamente, no apareciendo cambios significativos en este parámetro al aumentar la cantidad de RP.

La observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las microesferas cargadas con RP, preparadas con ambos polímeros y con 80 mg de RP, se muestran en la figura 1.a y 1.b del Artículo 2. En todos los casos las partículas presentan forma esférica con superficies lisas y ausencia de cristales del ingrediente activo en su superficie. Además, para todas las formulaciones preparadas, los tamaños de partícula oscilaron entre $10\pm 4 \mu\text{m}$ y $50\pm 10 \mu\text{m}$, siendo por lo tanto adecuados para su administración parenteral. Por lo general, microesferas con tamaños inferiores a $10 \mu\text{m}$ tienen una capacidad limitada para la liberación controlada de principios activos, poseen una baja capacidad de transporte de fármacos, y pueden ser fagocitadas por las células del sistema inmune. Por otra parte, microesferas con tamaños superiores a $200 \mu\text{m}$ son difíciles de inyectar, y podrían inducir efectos deletéreos sobre los tejidos en la zona de administración (Anderson y Shilve, 1997).

En la figura 1.c del Artículo 2 se muestran los perfiles medios de liberación in vitro de RP de todas las formulaciones desarrolladas (F1-F3 y F1H- F3H). Como se puede observar, cuando se usa el polímero PLGA 502 en la preparación de las microesferas de RP (formulaciones F1-F3), el proceso de liberación durante la primera hora (efecto burst) resultó más lento si se compara con el obtenido para las micropartículas preparadas con PLGA 502H. Esta cesión fue seguida por una liberación de RP de acuerdo a una cinética de orden cero durante 19 días, con valores medios de K_0 de $33,29 \mu\text{g/día}$; $51,73 \mu\text{g/día}$ y $78,23 \mu\text{g/día}$ para 10 mg de microesferas para las formulaciones F1, F2 y F3, respectivamente. Los valores de constantes de cesión obtenidos aumentaron significativamente al aumentar la cantidad de RP ($p<0,05$). Con respecto a las formulaciones

preparadas con PLGA-502H, la liberación inicial (1 hora) fue seguida por una cinética de orden cero durante los primeros once días del ensayo, con valores de K_0 de 57,33 $\mu\text{g}/\text{día}$, 111,48 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 159,01 $\mu\text{g}/\text{día}$ para 10 mg de microesferas, y para las formulaciones F1H, F2H y F3H, respectivamente. El valor de dicha constante de velocidad también aumentó significativamente al aumentar la cantidad RP ($p < 0,05$). Comparando los perfiles de disolución de las microesferas preparadas con ambos polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H), se observan claras diferencias; las formulaciones preparadas con el polímero PLGA 502H liberan el 100% de RP dentro de las primeras dos semanas, mientras que cuando se usa PLGA 502, al final de las dos primeras semanas de ensayo sólo se ha cedido alrededor del 75-80% de RP, lo que cumple mejor con nuestros objetivos. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la formulación F3 para continuar los estudios. Esta formulación, preparada con 120 mg de RP y 400 mg de polímero PLGA 502, permitiría reducir el intervalo de dosificación y la cantidad de micropartículas a inyectar, al liberar RP de forma constante durante 19 días, a una velocidad superior a la del resto de las formulaciones elaboradas con el PLGA 502.

Los estudios de cultivos celulares *in vitro* se usan frecuentemente para evaluar los posibles efectos; en este caso neuroprotectores, de los fármacos en trastornos neurodegenerativos, tales como la EP. En nuestro caso, la actividad neuroprotectora del RP liberado de las microesferas se ha investigado en células de neuroblastoma humano (SKN-AS) y utilizando rotenona (RT) como neurotoxina. La RT es capaz de atravesar las membranas celulares, induciendo neurotoxicidad por medio de la activación de las vías de caspasa-3, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que la

caspasa-3 está implicada en la patogénesis de la EP y de otras enfermedades neurodegenerativas. Además, la RT actúa como inhibidor del complejo mitocondrial I, pudiendo desarrollar signos clínicos de neurodegeneración similares a los que ocurren en la EP (Sherer y col., 2002).

En una primera etapa, y con el fin de determinar la concentración de RT necesaria para inducir neurotoxicidad en la línea de neuroblastoma humano SKN-AS, dichas células fueron incubadas con concentraciones crecientes de RT (20, 30 y 50 μM) y se determinó la viabilidad celular a las 24 h, mediante las técnicas de MTT y de citometría de flujo.

En la figura 2.a del Artículo 2 se muestran los resultados de viabilidad celular (%) obtenidos mediante la técnica de MTT. La viabilidad celular disminuyó significativamente (alrededor del 50%) a todas las concentraciones de RT ensayadas. Cuando los estudios se realizaron utilizando la técnica de citometría de flujo, los resultados obtenidos fueron similares. A partir de estos resultados, se eligió la concentración de RT de 20 μM para continuar los estudios.

Posteriormente, las células SKN-AS fueron expuestas a la neurotoxina (RT) y co-tratadas con concentraciones crecientes de RP (10-120 μM). Las concentraciones de 10, 20 y 50 μM no mostraron ningún efecto neuroprotector, sin embargo si se obtuvieron recuperaciones significativas de la viabilidad celular a las concentraciones más elevadas (100 y 120 μM)

(Artículo 2, figura 2.b). Cuando se utilizó la técnica de citometría de flujo para determinar la viabilidad celular, se obtuvieron resultados similares. A modo de ejemplo, en la figura 2.c del Artículo 2 se muestran los histogramas de intensidad de fluorescencia obtenidos para las células control SKN-AS, células tratadas con RT (20 μ M) y, células co-tratadas con RT (20 μ M) y RP (120 μ M). Estos resultados confirman los efectos neuroprotectores de RP a la concentración de 120 μ M.

A continuación, se estudió el potencial terapéutico de RP en el tratamiento de la EP tras la administración crónica de las micropartículas de RP seleccionada (formulación F3), en un modelo animal de Parkinson. Los modelos animales son muy útiles para estudiar la patogénesis y las estrategias terapéuticas desarrolladas para tratar las enfermedades en humanos. En el caso de la EP, un modelo animal ideal debe reproducir los signos clínicos y patológicos típicos de esta enfermedad, tales como la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, la aparición de inclusiones de cuerpos de Lewy (LB) en el cerebro, y la existencia de síntomas de movimiento capaces de revertir con L-dopa (Uversky, 2004). En este sentido, la RT es una de las neurotoxinas capaz de desarrollar neurodegeneración de tipo EP en animales al inhibir el complejo I y activar la caspasa-3 (Sherer y col., 2002; Uversky, 2004). Así, la RT se utiliza ampliamente en modelos animales que simulan los síntomas de parkinsonismo en animales (Fernández y col., 2012). Varios estudios han demostrado que los animales tratados con RT son capaces de desarrollar neurodegeneración dopaminérgica, daño oxidativo, formación de inclusiones citoplasmáticas de tipo LB, así como trastornos del movimiento, tales como bradiquinesia y rigidez (Betarbet y col., 2000).

Los animales utilizados en el estudio fueron divididos en cinco grupos, con siete animales en cada grupo (Artículo 2, tabla 2):

- Grupo 1 (G1): animales que recibieron diariamente (45 días) únicamente el vehículo de las formulaciones: aceite de girasol (n=3) o solución salina (n=4).

- Grupo 2 (G2): animales que recibieron RT (2,0 mg/kg/día) durante 45 días (n=4) o RT junto con microesferas no cargadas (75 mg/kg) los días 15 y 30 del estudio (n=3).

- Grupo 3 (G3): animales que recibieron RT (2,0 mg/kg/día) durante 45 días y microesferas cargadas con RP, en una cantidad equivalente a 15 mg/kg de RP los días 15 y 30.

- Grupo 4 (G4): animales que recibieron RT (2,0 mg/kg/día) durante 45 días y microesferas cargadas con RP, en una cantidad equivalente a 7,5 mg/kg de RP los días 15 y 30.

- Grupo 5 (G5): animales que recibieron RT (2,0 mg/kg/día) durante 45 días y, a partir del día 15, RP en solución salina (1 mg/kg/día) hasta el día 45 del ensayo.

Los estudios que se han realizado en los animales de experimentación incluyen: estudios histológicos e inmunohistoquímicos de cortes cerebrales, así como pruebas de comportamiento motor.

Los cuerpos de Nissl, gránulos de Nissl o también denominada sustancia cromófila, son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas. Estos cuerpos pueden disolverse y reducirse en situaciones como la EP. Por ello, el método histológico de tinción de Nissl se utiliza ampliamente para estudiar la morfología y la patología de las neuronas, y comprender la citoarquitectura de áreas cerebrales (Pilati y col., 2008), ya que el colorante empleado (cresil violeta) se une al ADN de las núcleos de las células y al ARN que se encuentra altamente concentrado en retículo endoplásmico rugoso y en los ribosomas del citoplasma. Tras la tinción de Nissl, la evaluación de los cortes histológicos de la sustancia nigra (SN) del grupo control muestra que los vehículos, tanto el aceite de girasol como el suero salino, no causan muerte neuronal. La administración de RT produjo claros signos de daño neuronal a nivel de SN en los animales tratados con la neurotoxina RT (grupo G2). Las neuronas dopaminérgicas en esta zona se redujeron aproximadamente un 40% con respecto al grupo control (Artículo 2, figura 3.a). Además, y en concordancia con otros autores, dicha reducción va acompañada de una alteración evidente en la morfología celular, ya que las células aparecen elongadas (Artículo 2, figura 3.b). En cuanto a los efectos de RP, se ha observado que el tratamiento con este agonista dopaminérgico redujo significativamente la muerte celular inducida por la RT a nivel de la SN. Este efecto protector se observó tanto después de la administración de RP administrado en solución salina como encapsulado en las micropartículas. Al aplicar un análisis estadístico, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls, no se observan diferencias significativas en la muerte neuronal entre los tres grupos que reciben tratamiento con RP (G3, G4 y G5).

La proteína fibrilar ácida de la glía, también llamada filamentos gliales o proteína gliofibrilar ácida (GFAP), es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de las células gliales. Por ello, y con el fin de evidenciar si se produce una posible activación astrocítica asociada a la neurodegeneración de la RT, se realizaron estudios de inmunohistoquímica no-cuantitativa de la GFAP). Como cabe esperar, en el grupo control no se observaron modificaciones en la gliosis (G1). La administración de RT a la dosis de 2mg/Kg/día durante 45 días (G2) produjo una intensa gliosis (Artículo 2, figura 4). Además, se pudo observar que esta respuesta astrocítica revertió casi completamente en el grupo de animales que recibieron la dosis más alta de microesferas cargadas con RP (grupo G3) (Artículo 2, figura 4). En los otros dos grupos de animales tratados con RP (G4 y G5), se observó también una mejora de la respuesta astrocítica, si bien resultó ser menos acusada (Artículo 2, figura 4).

La neurodegeneración suele asociarse con la activación de las células gliales. Esta gliosis reactiva parece desempeñar un papel esencial en la producción de daño neuronal temprano, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Thomas y col., 2004). Así, después de un ataque cerebral, una respuesta astrocítica lenta puede mantener la activación de microglia y eventualmente conducir a una lesión cerebral crónica. Por otra parte, se ha demostrado que la exposición a la neurotoxina RT produce activación astrocítica tanto *in vitro* (Swarnkar y col., 2012) como *in vivo* (Tapias y col., 2013).

La prueba de inmunohistoquímica del enzima tirosina hidroxilasa (TH) es una herramienta importante en la investigación de la EP. Esta técnica permite cuantificar el grado de pérdida de células dopaminérgicas en cerebros post mortem de individuos diagnosticados de Parkinson (Kubis y col., 2000). Por otra parte, diversos estudios (Lapointe y col., 2004, Basani y col., 2014) han indicado que la RT provoca una reducción moderada de las neuronas inmunorreactivas de TH en la sustancia nigra pars compacta (SNpc). En nuestro caso y de acuerdo con los resultados obtenidos, la inmunoreactividad TH en SNpc se redujo muy ligeramente en los animales tratados con RT (G2) (Artículo 2, figura 5). Esta reducción revirtió en los animales tratados con microesferas cargadas con RP (grupos G3 y G4), si bien la administración de RP en solución salina (G5) provoca solamente una reversión muy leve (Artículo 2, figura 5). Estos hechos confirman el interés potencial del nuevo sistema de administración controlada desarrollado para RP.

La figura 6.a. del Artículo 2 muestra la evolución del peso de todos los grupos de animales incluidos en nuestro estudio. Los animales del grupo control (G1) experimentaron un aumento gradual y constante del peso durante todo el ensayo. Los tratados con la neurotoxina RT (G2) mostraron una clara disminución de peso entre los días 13 y 25, que puede estar relacionada con el desarrollo de la neurodegeneración. En los animales tratados con RP (G3, G4 y G5) se observó la misma evolución durante los primeros 15-20 días. Este hecho es debido a que en estos grupos el tratamiento con RP (microesferas o solución) no comenzó hasta el día 15.

A partir del día 20 de iniciado el tratamiento con RP, en esos tres grupos se observó una clara mejoría en la evolución del peso.

La reducción de la actividad dopaminérgica causa fundamentalmente, los siguientes síntomas motores: rigidez, bradiquinesia y aquinesia. El efecto de la administración de RP, ya sea en microesferas o solución, se evaluó en los animales mediante los siguientes pruebas de comportamiento: catalepsia (rejilla y barra), aquinesia, rotarod y natación.

Los resultados obtenidos en la prueba de catalepsia (rejilla y barra) a los 15, 30 y 45 días se muestran en las figuras 6.b y 6.c del Artículo 2. A todos los tiempos analizados se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de latencia en los animales tratados con RT (G2), cuando se comparan con el grupo control (G1). Asimismo, los resultados demuestran la eficacia del nuevo sistema de liberación controlada desarrollado para RP, ya que en los grupos que recibieron las microesferas de RP (G3 y G4), la latencia mejoró claramente a los 30 y 45 días de tratamiento. La administración diaria de RP en solución salina (G5) también produjo una mejora en la latencia, si bien al final del ensayo (45 días) los mejores resultados se obtuvieron en el grupo G3, que corresponde a los animales que recibieron la dosis más alta de microesferas de RP. Por tanto, la formulación desarrollada presenta un gran interés potencial en el tratamiento de la EP.

Las pruebas de aquinesia realizadas en los días 15, 30 y 45 pusieron de manifiesto que la administración crónica de RT provoca en los animales claros síntomas de aquinesia, lo que se traduce en un marcado aumento del tiempo de latencia, si se compara con los animales control (Artículo 2, Figura 6.d., G2 vs. G1). Los animales de este grupo (G2) mostraron claros síntomas agudos de temblor. A partir del día 30 de ensayo, en todos los grupos de animales tratados con RP (G3, G4 y G5) se observó una ligera reversión de la latencia. En estos grupos, al final del estudio (45 días) se produce una clara mejoría, con independencia del tipo de formulación y/o la dosis administrada.

La coordinación motora ha sido evaluada también utilizando la prueba del rotarod. Esta prueba se utiliza ampliamente en roedores, y es especialmente sensible a la detección de pérdida neuronal. Los resultados de esta prueba para los distintos grupos de animales que participaron en el estudio (G1-G5) se muestran en la figura 6.e. del Artículo 2. A los 15 días de iniciado el estudio, para el grupo de animales tratados con RT (G2) se obtuvieron tiempos de permanencia en el rotarod significativamente menores que los obtenidos para el grupo control (G1), con una reducción de aproximadamente el 75%. Sin embargo, una vez iniciada la administración de RP, ya sea encapsulado o en solución, y después de 30 y 45 días, los animales mostraron claros signos de recuperación, lo que fue especialmente evidente para el grupo G3.

La prueba de natación es sensible a varios agentes neuroprotectores (ácido salicílico, bromocriptina) (Muraslikrishnan y Mohanakumar, 1998;

Mohanakumar y col., 2001), y permite evaluar la eficacia de los tratamientos diseñados para restaurar la función dopaminérgica en el modelo de rotenona (Sindhu y col., 2005). El ensayo de natación se realizó a los 15, 30 y 45 días, de acuerdo con el método descrito por Haobam y col. (Haobam y col., 2005), manteniendo el agua a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ para evitar el posible estrés que el agua fría provoca en los animales. En nuestro estudio, la capacidad de nadar de los animales tratados con RT (G2) disminuyó notablemente en comparación con los animales control ($p < 0,05$)(G1) (Artículo 2, Figura 6.f). A partir de dicho tiempo (día 15), los animales que recibieron RP (G3, G4 y G5) mostraron mayores puntuaciones en la prueba de natación que el grupo G2. En los grupos de animales que recibieron las microesferas de RP (G3 y G4), las puntuaciones de natación mejoraron claramente al final del experimento (45 días) logrando, en ambos grupos de animales, puntuaciones superiores a 2, mientras que en el grupo G5 las puntuaciones de natación no superaron el valor medio de 1,8.

3. ARTÍCULO 3

LIBERACIÓN DE ROPINIROL BASADA EN LA NANOTECNOLOGÍA PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La absorción oral del ropinirol tras su administración en comprimidos de liberación inmediata es rápida y completa, presentando una biodisponibilidad de aproximadamente el 50%, debido al extenso

metabolismo de primer paso hepático que sufre (Bhatt y col., 2011). Esta baja biodisponibilidad limita la cantidad de ropinirol que podría tener acceso al cerebro. La liberación sostenida del fármaco reduce la frecuencia de las administraciones, puede minimizar los efectos secundarios, mejorar la eficacia terapéutica y puede prevenir el metabolismo hepático de primer paso, mejorando la biodisponibilidad del fármaco. Pero en el caso del RP, al comparar ambas formulaciones, comprimidos de liberación inmediata y comprimidos de liberación prolongada, se obtienen valores de biodisponibilidad relativa del 100% sin observar cambios clínicos relevantes (Tompson y Vearer, 2007; Jost y col., 2008; Stocchi y col., 2008). Para tanto, en ambos tipos de formulaciones, la mayor parte del RP administrado no tiene acceso al cerebro, al ser metabolizado parcialmente por el hígado. Esta utilización ineficiente del ingrediente activo hace necesario recurrir a dosis más elevadas, que pueden producir efectos adversos. Por otra parte, cuando se administra RP en comprimidos de liberación prolongada (1 vez al día), las concentraciones nocturnas puede ser menores que cuando se administra en comprimidos de liberación inmediata (3 veces al día). Asimismo, se ha postulado que los periodos “off” entre el atardecer y el amanecer podrían ser más severos cuando se administra RP en la fomulación de liberación prolongada en comparación con la de liberación inmediata (Tompson y col., 2007). Además, en las primeras horas de la mañana, la duración del periodo “off” puede ser más larga cuando se administra la formulación de liberación prolongada (Yun y col., 2013).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, y dado que no existe un tratamiento definitivo para la EP, es necesario impulsar la investigación en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Las nanopartículas se

consideran uno de los sistemas de administración de fármacos más prometedores y versátiles para mejorar el acceso de los fármacos al cerebro. Para ello, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un nuevo sistema de liberación controlada, que consiste en nanopartículas biodegradables de PLGA cargadas con RP y destinadas a tratar la EP. El nuevo sistema de administración se caracterizó *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal de EP.

Las nanopartículas de RP se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación. Para lograr el objetivo propuesto, se prepararon formulaciones con diferentes cantidades de RP: 4,5; 5; 8 y 10 mg. En todos los casos, el polímero utilizado fue el PLGA 502 en una cantidad de 50 mg (Artículo 3, tabla 1).

El diámetro de las nanopartículas, medido por dispersión dinámica de la luz, para todas las formulaciones (NPRP-1 a NPRP-4) fue inferior a 200 nm (Artículo 3, tabla 1), tamaño que resulta adecuado para lograr su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Las nanopartículas poliméricas fabricadas con polímeros biodegradables, como es el PLGA, con tamaños del orden de 250 nm, alcanzan diferentes áreas del cerebro, desapareciendo del lugar una vez que el ingrediente activo ha sido liberado (Hillaireau y col., 2009; Suchlfart y col., 2012).

Los valores medios del rendimiento del proceso para todas las formulaciones elaboradas (NPRP-1 a NPRP-4) osciló entre $47,3\pm 2,7\%$ y $56,6\pm 5,5\%$ (Artículo 3, tabla 1).

La eficacia de encapsulación aumentó al hacerle la cantidad de RP empleada en la preparación de las nanopartículas y en el intervalo de 4 a 8 mg. Este incremento no se observó al usar 10 mg de RP. El valor más alto de eficacia de encapsulación se obtuvo para la formulación elaborada con 8 mg de RP ($74,8\pm 8,2\%$). Interesan valores altos de eficacia de encapsulación para minimizar la cantidad de partículas a administrar y para reducir la cantidad del polímero, a fin de evitar su posible toxicidad (Pinto Reis y col., 2006a, Pinto Reis y col., 2006b). Para ello, hemos seleccionado la formulación NPRP-3 para continuar el estudio. Esta formulación corresponde a nanopartículas preparadas con 8 mg de RP y 50 mg de PLGA 502.

Las nanopartículas correspondientes a la formulación seleccionada (NPR-3) muestran forma esférica, tal como se aprecia en la figura 1.A del Artículo 3. En los estudios de cesión de dicha formulación (Artículo 3, figura 1.B), se observa una liberación rápida durante las primeras 24 horas, con un burst inicial (1 hora) próximo al 20%. Esta cesión fue seguida de una liberación lenta del RP, que se ajusta a partir de las 24 h a una cinética de orden 0, con valores medios de constante de cesión de $4,13\pm 0,17 \mu\text{g/h}$ para 10 mg de nanopartículas durante 5 días.

La determinación del potencial zeta de los nanosistemas es de gran interés desde el punto de vista tecnológico, ya que condiciona la estabilidad de la suspensión y su paso a través de la BHE. Las nanopartículas con carga positiva pueden interactuar con células superficiales negativas, lo cual es un inconveniente de este tipo de partículas. Además, las partículas cargadas negativamente en bajas concentraciones no producen alteración en la BHE (Lockman y col., 2004). En nuestro caso, el potencial zeta fue de $-14,25 \pm 0,43$ mV, valor que resulta adecuado para favorecer el paso a través de BEH. Por otra parte, permite que las partículas sean resuspendidas fácilmente en el vehículo utilizado para su posterior administración a los animales de experimentación.

La formulación seleccionada (NPRP-3) se evaluó en un modelo animal de Parkinson inducido por RT. Este modelo, tal y como se ha indicado anteriormente, y a diferencia de otros, produce la mayoría de las características de la EP, incluyendo la formación de cuerpos de Lewy en las neuronas nigrales (Sindhu y col., 2005). Además, en el modelo, la lesión que produce la RT es global, gradual y uniforme en el sistema nigro-estriatal, a diferencia de lo que ocurre en el modelo inducido unilateralmente en rata con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que causa degeneración local de las neuronas (Huang y col., 2010, Mercanti y col., 2012).

Los animales de experimentación (ratas) utilizados en el estudio fueron divididos en 4 grupos con 8 animales en cada grupo (Artículo 2, tabla 2):

- Grupo 1 (G1): animales que recibieron diariamente (35 días) únicamente el vehículo (el aceite de girasol, n=4) o solución salina (n=4).

- Grupo 2 (G2): animales que recibieron RT (2 mg/kg/día) durante 35 días (n=4) (G2A), o RT con nanopartículas no cargadas (alrededor de 8 mg/kg, según peso del animal) cada 3 días, a partir del día 15 de iniciado el estudio (n=4) (G2B).

- Grupo 3 (G3): animales que recibieron RT (2 mg/kg/día) durante 35 días y, a partir del día 15 y cada 3 días, nanopartículas cargadas con RP en una cantidad equivalente a 1 mg/kg de RP.

- Grupo 4 (G4): animales que recibieron RT (2 mg/kg/día) durante 35 días y, a partir del día 15, RP en solución salina (1mg/kg/día).

Ninguna rata de los dos subgrupos control, que recibieron aceite de girasol (G1A) o solución salina (G1B), ni de los grupos tratados con RT y RP murió (G3 y G4). El porcentaje de mortalidad fue del 14,3% en los subgrupos de animales tratados sólo con RT o con RT y nanopartículas no cargadas (G2A y G2B).

La evolución del peso en todos los grupos de animales incluidos en nuestro estudio se realizó a los siguientes tiempos; 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días (Artículo 3, figura 2.A). Los animales de los grupos control (G1A y G1B), que corresponden a los que recibieron los vehículos (aceite de girasol o solución salina, respectivamente), experimentaron un aumento de peso gradual y constante durante todo el ensayo. Entre ambos subgrupos no se observaron diferencias significativas en la evolución del peso ($p>0,05$).

Tampoco se observaron diferencias significativas en los grupos G2A y G2B ($p > 0.05$). Por ello, los distintos subgrupos fueron englobados en sus correspondientes grupos; G1 y G2. Los animales tratados con RT (G2, G3 y G5) mostraron un ligero aumento de peso entre el inicio del ensayo y el día 15, que puede estar relacionado con el desarrollo de la neurodegeneración. La misma evolución se ha observado entre los días 15 y 35, en los grupos tratados con RP, pero no en el grupo G2 que recibió sólo rotenona o rotenona con nanopartículas no cargadas. En este grupo G2 el peso se redujo significativamente entre los días 15 y 25. Por lo tanto, el tratamiento con RP produjo una clara mejoría en la evolución del peso.

Los estudios realizados en los animales de experimentación para evaluar el nuevo sistema desarrollado incluyen: pruebas de comportamiento motor y estudios histológicos e inmunohistoquímicos de cortes cerebrales. Para la evaluación del comportamiento motor se han realizado las siguientes pruebas; catalepsia (rejilla y barra), aquinesia, rotarod y natación.

En la figura 2.B y 2.C del Artículo 3 se muestran los resultados de la prueba de catalepsia (rejilla y barra) a los distintos tiempos del estudio (15, 22, 29 y 36 días). No se obtuvieron diferencias significadas en la latencia ($p > 0,05$) en los animales tratados con ambos vehículos, ni tampoco entre los subgrupos G2A y G2B. A todos los tiempos del ensayo se obtuvieron diferencias significativas entre los animales tratados con RT (G2) en comparación con el grupo de control (G1) ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de las nanopartículas cargadas con RP

(G3), ya que en este grupo G3, y a partir del séptimo día de iniciado el tratamiento con RP (22 días de iniciado el estudio), se observa una clara mejora de la latencia. Este mismo comportamiento se obtuvo en el grupo de animales tratados con RP en solución salina (1 mg/Kg/días) (G4). Al final del estudio (36 días), los mejores resultados se manifestaron en el grupo G3, que recibió las nanopartículas de RP, lo que pone de manifiesto el interés del nuevo sistema nanoparticulado desarrollado para RP.

En la figura 2.D del Artículo 3 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de aquinesia para los diferentes grupos de animales. No se han encontrado diferencias significativas entre los dos subgrupos control (G1A y G1B), ni entre los subgrupos G2A y G2B. La administración de RT sola (G2A) o con nanopartículas no cargadas (G2B) prolongó significativamente la latencia en comparación con el grupo control (grupo G2 frente a G1). Los mejores resultados se lograron en el grupo tratado con nanopartículas cargadas con RP (G3). Al final del estudio (36 días), los valores de latencia para este grupo (G3) fueron similares a los del grupo control (G1). La administración de RP en solución salina produjo, a partir del día 22, una reversión significativa de la latencia, si bien al final del ensayo, los valores de latencia obtenidos en este grupo fueron mayores que los encontrados en el grupo control.

La prueba de rotarod se realizó a los 15, 22, 29 y 36 días de estudio (Artículo 3, figura 2.E). No se observaron diferencias significativas en los resultados de esta prueba entre los dos subgrupos control (G1A y G1B) ($p > 0,05$), ni entre los subgrupos G2A y G2B ($p > 0,05$). La administración de

RT provocó una reducción significativa en los tiempos que los animales permanecen en el rotarod, en comparación con los grupos control ($p < 0,05$) (G2 frente a G1) (Artículo 3, figura 2.E). Esas marcadas diferencias son indicativas del desarrollo de la neurodegeneración producida por la neurotoxina. La administración de RP encapsulado en nanopartículas o en solución salina, mejoró la coordinación motora. Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo G3, para el cual, al final del estudio, el tiempo en rotarod fue similar al que presentaron los animales del grupo control (G1).

La figura 2.F del Artículo 3 recoge los resultados obtenidos en la prueba de natación. A los tiempos ensayados, los subgrupos control (G1A y G1B) obtuvieron la puntuación máxima (3). La capacidad de nadar que demostraron los animales de los grupos G2A y G2B fue similar, por lo que ambos subgrupos fueron englobados en un único grupo (G2). En este grupo (G2), la capacidad de nadar de los animales disminuyó en comparación con los animales control (Figura 6.F, Artículo 3; G2 vs G1). Los animales que recibieron RP, bien encapsulado o en solución salina (G3 y G4), obtuvieron las puntuaciones más altas en la prueba de natación. Los mejores resultados correspondieron al grupo G3. Desde el día 22 hasta el final del estudio, las puntuaciones obtenidas en este grupo fueron las mismas que las del grupo control (G1) y, corresponden a la puntuación máxima.

El método histológico de tinción de Nissl se utiliza ampliamente para estudiar la morfología y la patología de las neuronas, al permitir estudiar la citoarquitectura de los somas neuronales (Pilati y col., 2008), ya que el

colorante utilizado se une al ADN de los núcleos y al ARN del citoplasma de las células.

La tinción de Nissl mostró signos de daño neuronal en la SNpc en los cortes cerebrales de las ratas tratadas con RT pero no con RP. Así, la RT provocó una reducción significativa en el número de neuronas en la SNpc como se puede observar en la figura 3 del Artículo 3. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores que han estudiado el efecto de la RT en células cerebrales (Tapias y col., 2013; Swarnkar y col., 2013). La administración de RP, en solución salina o encapsulado en nanopartículas de PLGA, previene la muerte celular inducida por RT en SNpc. Este efecto resultó ser más marcado cuando RP se administró en forma de nanopartículas (Artículo 3, figura 3).

La neurodegeneración se asocia frecuentemente con activación de las células gliales. Esta gliosis reactiva parece desempeñar un papel esencial en la producción del daño neuronal temprano, al aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (Thomas y col., 2004; Gao y col., 2013). Los mecanismos implicados en el daño cerebral inducido por los astrocitos activados son múltiples; incluyendo el estrés oxidativo generado por la producción de especies reactivas de oxígeno (Thomas y col., 2004), y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Gómez y col., 2007; Choi y col., 2015). La RT es una neurotoxina que provoca daño neural por activación astrocítica, tanto *in vivo* como *in vitro* (Tapias y col., 2013).

Con el fin de evidenciar si se produce una activación astrocítica asociada a nuestro modelo de RT, que pueda evitarse o paliarse al administrar RP, hemos realizado un estudio inmunohistoquímico, no cuantitativo, de la GFAP. En los cortes cerebrales de los animales tratados con RT que no recibieron RP, se ha observado una intensa respuesta astrogliar (Artículo 3, figura 4). Esta respuesta se caracterizó por una fuerte hipertrofia y engrosamiento de los cuerpos celulares (Artículo 3, figura 4), que son características típicas de astrogliosis reactiva (Sofroniew y Vinters, 2010). El RP redujo significativamente la astrogliosis reactiva inducida por RT, produciendo un marcaje de la GFAP similar al obtenido en el grupo control (Artículo 3, figura 4). No se observaron diferencias significativas entre las dos formulaciones de RP ensayadas (nanopartículas o en solución salina).

Diferentes autores han indicado que en el parkinsonismo inducido por RT se observa una reducción de inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa (TH) en las neuronas de la SNpc (Betarbet y col., 2000; Sherer y col., 2003; Moreira y col., 2012; Bassani y col., 2014). En nuestro estudio, y de acuerdo con estos autores, en el grupo de animales que recibieron RT pero no RP se observó una marcada reducción de la inmunorreactividad de la TH (Artículo 3, figura 5.A). Al final del ensayo, la reducción de la intensidad de fluorescencia en la SNpc fue del 30% (Artículo 3, figura 5.B) en dicho grupo (G2). Esta disminución revirtió completamente cuando se administraron nanopartículas de RP (Grupo 3). Sin embargo, este efecto no se manifestó en el grupo de animales que recibieron RP en solución salina (G4).

4. BIBLIOGRAFIA

- **Anampally, S., Mankala, S.K., Gogu, P.K., Aukunuru, J.** Development of Ropinirole (free base) transdermal patch using blends of hidroxypropyl methylcellulose/eudragits and its in vitro/in vivo characterization. *AJPRHC*, 3: 89–98, 2011.
- **Anderson, J.M., Shive, M.S.** Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 28: 5-24, 1997.
- **Azeem, A., Iqbal, Z., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Talegaonkar, S.** Development and validation of a stability-indicating method for determination of ropinirole in the bulk drug and in pharmaceutical dosage forms. *Acta Chromatogr.*, 20: 95–107, 2008.
- **Bassani, T.B., Gradowski, R.W., Zaminelli, T., Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Boschen, S.L., da Cunha, C., Lima, M.M., Andreatini, R., Vital, M.A.** Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain. Res.*, 1593: 95-105, 2014.
- **Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T.** Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.*, 12: 1301-1306, 2000.
- **Bhatt, D., Nisha Ajmeri, N., Mandal, S., and Rajesh, K.S.** Nanoparticle: design, characterization and evaluation for oral delivery of ropinirole hydrochloride. *Elixir Pharmacy*, 39: 4687-4689, 2011.

- **Bhosale, N.R., Hardikar, S.R., Bhosale, A.V.** Formulation and evaluation of transdermal patches of ropinirole HCl. *RJPBCS.*, 2:138–148, 2011.
- **Choi, W.S., Kim, H.W., Xia, Z.** JNK inhibition of VMAT2 contributes to rotenone-induced oxidative stress and dopamine neuron death. *Toxicology*, 328: 75-81, 2015.
- **Fernández, M., Barcia, E., Fernández-Carballido, A., Garcia, L., Slowing, K., Negro, S.** Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease. *Int. J. Pharm.*, 438: 266-278, 2012.
- **Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C.B., Cai, J.** Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.*, 48: 690-701. 2013.
- **Gómez, C., Bandez, M.J., Navarro, A.** Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Front. Biosci.*, 12: 1079-1093, 2007.
- **Haobam, R., Sindhu, K.M., Chandra, G., Mohanakuma, K.P.** Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav. Brain Res.*, 163, 159-167, 2005.
- **Hillaireau, H., Couvreur, P.** Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery cell. *Mol. Life Sci.*, 60: 2873-2896, 2009.
- **Huang, R.Q., Ke, W.L., Liu, Y., Wu, D.D., Feng, L.Y., Jiang, C., Pei Y.** Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in a rotenone-induced chronic Parkinson model. *J. Neurol. Sci.*, 290: 123–130, 2010.

- **International Commission for Harmonization (ICH).** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH topic Q2 (R1). 2005.
- **Jost, W.H., Buhmann, C., Fuchs, G., Greulich, W., Hummel, S., Korchounov, A., Müngersdorf, M., Schwarz, M., Spiegel-Meixensberger, M.** Initial experience with ropinirole PR (prolonged release). *J. Neurol.*, 5: 60-63, 2008.
- **Kothapalli, L.P., Chrodhari, M.E., Thomas, A.B., Nanda, R.K., Deshpande, A.D., Gaidhani, P.S.** Validated RP-HPLC and spectrophotometric determination of ropinirole hydrochloride in bulk and in pharmaceutical dosage forms. *Der. Pharma. Chemica*, 3: 1–9, 2011.
- **Kubis, N., Faucheux B., Ransmayr, G., Damier, P., Duyckaerts, C., Henin, D., Forette, B., Le Charpentier, Y., Hauw, J.J., Agid, Y., Hirsch, E.C.** Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. *Brain*, 123: 366-373, 2000.
- **Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M.G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C., Cicchetti, F.** Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J.* 18: 717-719, 2004.
- **Lockman, P.R., Koziara, J.M., Mumper, R.J., Allen, D.D.** Nanoparticle surface charges altering blood-brain barrier integrity and permeability *J. Drug Target.*, 12: 635-641, 2004.
- **Mercanti, G., Bazzu, G., Giusti, P.** A 6-hydroxydopamine in vivo model of Parkinson's disease. *Methods Mol. Biol.*, 846: 355–364, 2012.
- **MohanKumar, P.S., MohanKumar, S.M, Quadri, S.K., Voogt, J.L.** Effects of chronic bromocriptine treatment on tyrosine hydroxylase

- (TH) mRNA expression, TH activity and median eminence dopamine concentrations in ageing rats. *J. Neuroendocrinol.*, 13:261-269, 2001.
- **Moreira, C.G., Barbiero, J.K., Ariza, D., Dombrowski, P.A., Sabioni, P., Bortolanza, M., Da Cunha, C., Vital, M.A., Lima, M.M.** Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: a new approach for an old neurotoxin. *Neurotox. Res.*, 21: 291-301, 2012.
 - **Muralikrishana, D., Mohanakumar, K.P.** Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *FASEB J.*, 12: 905-912, 1998.
 - **Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., Hamann, M.** A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J. Histochem. Cytochem.*, 56: 539-550, 2008.
 - **Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A., Veiga, F.** Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine*, 2: 53–65, 2006b.
 - **Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A., Veiga, F.** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. Mar., 2: 8-21, 2006a.
 - **Samala, A., Sowmya, M., Sasikala, M., Chatlapelli, K.** Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of ropinirole hydrochloride in tablet dosageforms. *J. Chem. Pharm. Res.*, 6: 1178–1182, 2014.

- **Sherer, T.B., Betarbet, R., Kim, J.H., Greenamyre, J.T.** Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 341: 87–90, 2003.
- **Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R., Greenamyre, J.T.** An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha synuclein metabolism and oxidative damage. *J. Neurosci.*, 16: 7006-7015, 2002.
- **Sindhu, K.M., Saravanan, K.S. y Mohanakumar, K.P.** Behavioral differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. *Brain. Res.*, 1051: 25-34, 2005.
- **Sofroniew, M.V., Vinters, H.V.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta. Neuropathol.*, 119: 7-35, 2010.
- **Stocchi, F., Hersh, B.P., Scott, B.L., Nausieda, P.A., Giorgi, L.** Ease PDMSI: Ropinirole 24-hour prolonged release and ropinirole immediate release in early Parkinson's disease: a randomized, double-blind, non-inferiority crossover study. *Curr. Med. Res. Opin.*, 24: 2883–2895, 2008.
- **Suchlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J.** Transport of drug across the bloodbrain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release*, 161: 264-273, 2012.
- **Swarnkar, S., Goswami. P., Kamat, P.K., Patro, I.K., Singh, S., Nath, C.** Rotenone-induced neurotoxicity in rat brain areas: a study on neuronal and neuronal supportive cells. *Neuroscience*, 230:172-183, 2013.

- **Swarnkar, S., Singh, S., Goswami, P., Mathur, R., Patro, I.K., Nath, C.** Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem. Res.*, 37: 2178-89, 2012.
- **Tapias, V., Greenamyre, J.T., Watkins, S.C.** Automated imaging system for fast quantitation of neurons, cell morphology and neurite morphometry in vivo and in vitro. *Neurobiol. Dis.*, 54: 158-168, 2013.
- **Thomas, D.M., Walker, P.D., Benjamins, J.A., Geddes, T.J., Kuhn, D.M.** Methamphetamine Neurotoxicity in Dopamine Nerve Endings of the Striatum Is Associated with Microglial Activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311: 1-7, 2004.
- **Tompson, D.J. and Vearer, D.** Steady-state pharmacokinetic properties of a 24-hour prolonged-release formulation of ropinirole: results of two randomized studies in patients with Parkinson's disease. *Clin. Ther.*, 29: 2654-2666, 2007.
- **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 38-NF 33).** Rockville, MD, USA, 2014.
- **Uversky, V.N.** Neurotoxicant induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell. Tissue. Res.*, 318: 225–241, 2004.
- **Yun, J.Y., Kim, H.J., Lee, J.Y., Kim, Y.E., Kim, J.S., Kim, J.M., Jeon, B.S.** Comparison of once-daily versus twice-daily combination of ropinirole prolonged release in Parkinson's disease. *BMC Neurol.*, 13: 113, 2013.

VII. CONCLUSIONES

1. El método de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución y detección UV, puesto a punto y validado para la cuantificación simultánea de ropinirol base y clorhidrato de ropinirol, es lineal en el rango de concentraciones de 2,5 µg/ml a 50 µg/ml, para ambos compuestos; exacto, preciso, robusto y selectivo, por lo que resulta adecuado para cuantificar el contenido de ropinirol en los sistemas multiparticulados desarrollados, y en los ensayos de cesión.

2. El método de elaboración de micropartículas, por la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A, es apropiado para encapsular ropinirol base.

3. Las micropartículas elaboradas con 400 mg de polímero PLGA 502 y 120 mg de ropinirol, son las que presentan una mayor carga de ingrediente activo, una eficacia de encapsulación del $83,20 \pm 4,16\%$, un tamaño de partícula adecuado, y son capaces de liberar ropinirol a una velocidad constante de 78,23 µg/día/10 mg de microesferas durante 19 días, por lo que, de todas las formulaciones desarrolladas, es la más adecuada para lograr el objetivo planteado; ampliar el intervalo de dosificación.

4. La determinación por citometría de flujo de la viabilidad celular de células de neuroblastoma humano (SKN-AS), expuestas a una concentración de neurotoxina (rotenona) de 20 µM, y co-tratadas con concentraciones crecientes de ropinirol (10 a 120 µM), han puesto de

manifiesto una marcado efecto neuroprotector del ropinirol a las concentraciones más elevadas ensayadas (100 μ M y 120 μ M).

5. La formulación de micropartículas de ropinirol seleccionada se ha evaluado en un modelo animal de Parkinson, tras la administración de rotenona a ratas, a una dosis de 2 mg/día durante 45 días por vía i.p. Los resultados obtenidos en los ensayos histológicos e inmunohistoquímicos (tinción de Nissl, proteína ácida fibrilar glial, y tirosina hidroxilasa), y en las pruebas de comportamiento (catalepsia, aquinesia, rotarod y natación), han demostrado la eficacia del ropinirol, administrado tanto en solución como formulado en micropartículas biodegradables, en la reversión de la sintomatología inducida por la neurotoxina rotenona. Los mejores resultados se han obtenido en los animales que recibieron microesferas cargadas con ropinirol a la dosis más alta ensayada, confirmando así la capacidad de este nuevo sistema de liberación controlada en la reversión de los síntomas parkinsonianos inducidos por rotenona en animales de experimentación.

6. El método de elaboración de nanopartículas, por la técnica de nanoprecipitación, resulta adecuado para encapsular ropinirol base. De las formulaciones elaboradas, las nanopartículas preparadas con 50 mg de polímero PLGA 502 y 8 mg de ropinirol, son las que presentan una mayor carga de ingrediente activo, una eficacia de encapsulación del $74,8 \pm 8,2\%$, un tamaño medio de partícula de $152,2 \pm 31$ nm, un valor de potencial zeta de $-14,25 \pm 0,43$ mV, y son capaces de ceder ropinirol durante 5 días, con una velocidad de cesión de orden cero de $4,13 \pm 0,17$ μ g/h/10 mg de

nanopartículas, por lo que dicha formulación resulta ser la más adecuada para facilitar el acceso de ropinirol al sistema nervioso central.

7. Los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento y en los análisis histológicos e inmunohistoquímicos realizados en un modelo animal de Parkinson, demuestran la eficacia de la nanopartículas de ropinirol en la reversión de la sintomatología inducida por rotenona.

8. Las formulaciones de micropartículas y nanopartículas de ropinirol desarrolladas presentan un elevado interés potencial en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

VIII. ABREVIATURAS

5-HT1A: 5-hidroxitriptamina subtipo 1A.

ANOVA: análisis de la varianza.

AUC: área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo.

CH₂Cl₂: diclorometano.

C_{máx}: concentración máxima en plasma.

COMT: catecol-O-metiltransferasa.

COX-2: ciclo oxigenasa tipo-2.

CYP1A2: citocromo p450 1A2.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

EE: eficacia de encapsulación.

EP: enfermedad de Parkinson.

GFAP: proteína ácida fibrilar de la glia.

HPLC-UV: cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta.

IFN- γ : interferón gamma.

IL-17: interleuquina 17.

IL-1b: interleuquina 1b.

IL-6: interleuquina 6.

K₀: constante de velocidad de cesión de orden 0.

LB: cuerpos de Lewy.

LRRK2 (PARK8): gen de la dardarina.

MAO: monoamino-oxidasa.

MAO-B: Monoamino-oxidasa tipo B.

MHC-1: complejo de histocompatibilidad de clase 1.

MHC-2: complejo de histocompatibilidad de clase 2.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NFκB: factor nuclear *kappa beta*.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

PARK1: gen de la α-sinucleína.

PARK2: gen de la parkina.

PARK6 (PINK1): gen de la serin-treoninquinasa.

PARK7: gen de la proteína DJ-1.

PET: tomografía de emisión de positrones.

PLGA: ácido poli-láctico-co-glicólico.

R.S.D: desviación estándar relativa.

ARN: ácido ribonucleico.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RP: ropinirol.

RT: rotenona.

SEM: microscopía electrónica de barrido.

SN: sustancia nigra

SNC: Sistema nervioso central.

SNpc: sustancia nigra pars compacta.

TH: tirosina hidroxilasa.

tmáx: tiempo al que se alcanza la concentración máxima en plasma.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TSH: terapia de sustitución hormonal.