



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Nanopartículas funcionalizadas  
para favorecer su paso por la BHE (II)**

Autor: Marta Rodríguez Torrado

Tutor: Ana Fernández Carballido

Convocatoria: Junio 2016

## **Resumen**

Tras una revisión bibliográfica de distintas publicaciones científicas, se ha llevado a cabo una descripción de la estructura de la barrera hematoencefálica (BHE) y de las alteraciones que sufre en pacientes con Alzheimer. Debido a que la BHE tiene una importante función protectora, muchos de los principios activos que podrían ser empleados en esta patología no son capaces de atravesarla. El empleo de vectores, como nanopartículas poliméricas, que contienen distintos agentes activos encapsulados, consigue favorecer el paso de los mismos al tejido diana (cerebro). En este trabajo se abordan los diferentes mecanismos de transporte que pueden ser utilizados por las nanopartículas para atravesar la BHE. Una de las ventajas de estos sistemas es que presentan una elevada área superficial que puede ser modificada o funcionalizada mediante la adición de polímeros y/o otras sustancias. La funcionalización de los nanosistemas permite que sean reconocidos por los mecanismos de transporte de la BHE aumentando el paso a cerebro de una gran diversidad de sustancias terapéuticas. El incremento en las cantidades de activo que llegan a los tejidos diana, junto a la posibilidad de paso de sustancias que, por sus características físico-químicas, no atraviesan la membrana, puede significar una importante mejora en el tratamiento del Alzheimer.

## **Objetivo**

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre la utilización de nanopartículas poliméricas funcionalizadas para el tratamiento del Alzheimer. La funcionalización de los nanosistemas permite que sean orientados específicamente hacia los tejidos diana, al ser reconocidos por los mecanismos de transporte de la barrera hematoencefálica. Para ello, se ha estudiado la estructura de la BHE, las alteraciones que sufre en los pacientes con Alzheimer y los mecanismos habituales que permiten el paso de sustancias al cerebro.

## **Introducción**

Actualmente el tratamiento de las patologías del sistema nervioso central, desde tumores hasta enfermedades neurodegenerativas, pasando por algunos virus; resulta complejo y poco efectivo. Una de las principales razones es el desconocimiento parcial que todavía tenemos sobre los mecanismos y las estructuras del cerebro, así como la

función que estas realizan. Además hay que tener presente que el cerebro es un órgano que está muy protegido mediante la barrera hematoencefálica (BHE). Aún así, cada día aparecen nuevos estudios que nos permiten comprender la estructura de esta barrera protectora un poco mejor y poder desarrollar, gracias a ello, nuevos sistemas de liberación de fármacos que alcancen el cerebro aprovechando los mecanismos de transporte de la propia BHE.

En la actualidad hay varios mecanismos para lograr superar esta barrera, entre ellas se encuentran la alteración osmótica, química o el empleo de ultrasonidos. Otros mecanismos que posibilitan el paso a través de la BHE están dirigidos al aumento del transporte transcelular, al empleo de células del sistema inmune según la estrategia del “caballo de Troya”, o el empleo de vías de administración como la intratecal, intraventricular o intranasal.

Existen distintos tipos de nanopartículas capaces de atravesar la BHE que se están estudiando para el transporte de fármacos y que consiguen la liberación en cerebro. Dentro de estos sistemas podemos indicar: nanopartículas metálicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas funcionalizadas y liposomas. Todas ellas presentan ventajas y desventajas. Sin embargo, en los últimos estudios, las que parecen dar mejores resultados son las poliméricas, por ser menos rígidas y densas que las metálicas y por su gran capacidad de conjugación con otras moléculas permitiendo así una fácil funcionalización y la encapsulación de una gran variedad de principios activos.

Este tipo de formulaciones se están empleando con bastante éxito con fármacos como doxorubicina, loperamida, dalargina; y concretamente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer se estudian rivastigmina y donepezilo, principalmente.

## **Metodología**

La metodología empleada para la realización de este trabajo ha consistido en una revisión e investigación bibliográfica a partir de distintas bases de datos como PubMed, Science Direct, Medline y la base de datos CIMA de la Agencia Española de Medicamentos. Estas bases de datos permiten el acceso a los últimos trabajos de investigación y a revisiones bibliográficas publicados en revistas científicas internacionales. Las publicaciones elegidas para su análisis y estudio están centradas en

el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central que emplean nanopartículas poliméricas, y, más específicamente, de nanopartículas en el tratamiento del Alzheimer.

## **Resultados y Discusión**

### **Barrera hematoencefálica**

La barrera hematoencefálica (BHE) es un elemento del sistema nervioso central cuya principal misión es proteger el cerebro de las sustancias potencialmente tóxicas que puedan pasar desde la sangre al cerebro. Además, la BHE tiene otras funciones de vital importancia como regular un transporte selectivo desde la red capilar al parénquima cerebral y realizar el metabolismo de estas sustancias en su paso de la sangre al sistema nervioso central y viceversa.

#### **Estructura de la BHE**

La BHE se constituye por un conjunto de células que requieren de una alta compenetración para poder llevar a cabo su función de protección. Se compone de células endoteliales, pericitos, pies perivasculares terminales de los astrocitos; así como de otras estructuras más secundarias como son la microglía y la membrana basal.

Son las células endoteliales el componente fundamental de la BHE. Se caracterizan porque cada borde de estas células está íntimamente unido a la célula contigua, con lo que la hendidura intercelular queda sellada y se vuelve impermeable a las sustancias provenientes del capilar cerebral; formando así las denominadas uniones estrechas (tight junctions). Además, al contrario que en el resto de tejidos del organismo que contamos con endotelio fenestrado, aquí se trata de endotelio continuo.

Estas uniones se conforman, desde un punto de vista molecular, por una serie de proteínas:

- Citoplasmáticas: claudina, ocludina y moléculas de adhesión de la unión.
  - o Claudina: es el componente principal de las uniones estrechas. Se unen por su dominio carboxilo terminal a las proteínas citoplasmáticas ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Furuse et al., 1999). Las claudinas 1 y 5 están presentes formando la BHE (Liebner et al., 2000).
  - o Ocludina: los lazos extracelulares de claudina y ocludina procedentes de células vecinas dan lugar a la barrera paracelular (Ballabh et al., 2003). También se asocian con las proteínas ZO. Parece que es una proteína reguladora capaz de alterar la

permeabilidad paracelular (Hirase et al., 1997). Las ocludinas y claudinas se unen en hebras que tienen canales fluctuantes que permiten la difusión selectiva de iones y moléculas hidrofílicas (Matter and Balda, 2003).

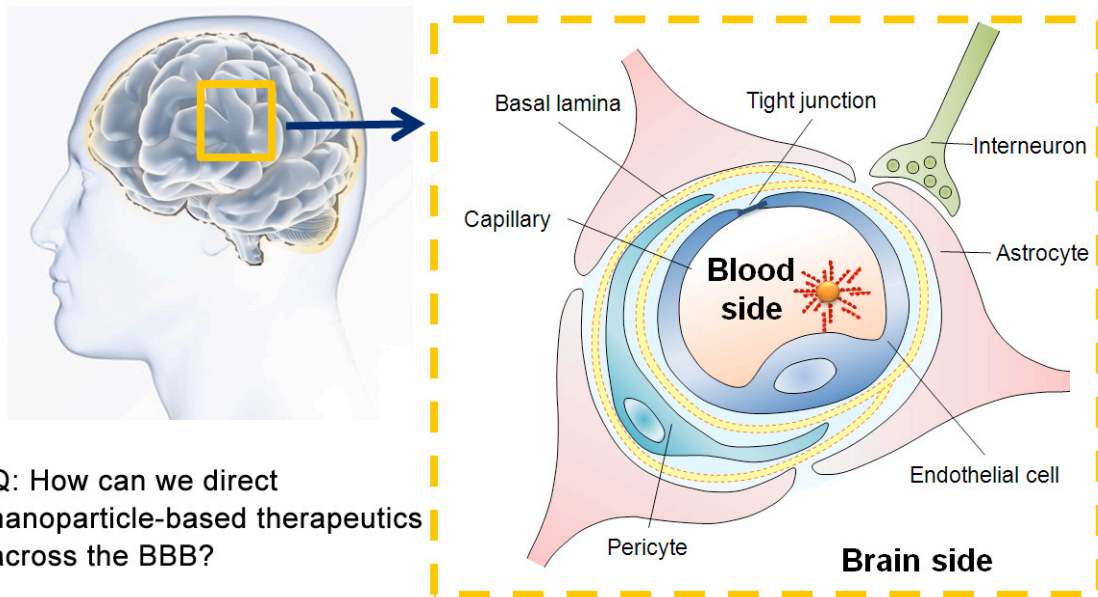
- Moléculas de adhesión de la unión (JAM): participan en la adhesión célula a célula y la trans migración de monocitos a través de la BHE (Aurrand-Lions et al., 2001).

- Proteínas citoplasmáticas: proteínas de la zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), cingulina y 7H6 entre otras.

- Proteínas zonula occludens: sus dominios le permiten participar en la unión de moléculas por lo que tiene un papel en la organización de proteínas en la membrana plasmática. Otro de sus dominios, el PDZ1; los une directamente a las claudinas (Itoh et al., 1999). Mientras que el dominio GUK permite una interacción con la ocludina (Mitic et al., 2000). La actina se une a ZO-1 y ZO-2 dando enlaces que aportan apoyo estructural a las células endoteliales (Haskins et al., 1998).

- Las proteínas citoplasmáticas unen las proteínas de membrana (cadherinas y cateninas) con la actina dando uniones adherentes manteniendo así la integridad estructural y funcional de la BHE.

El resto de células cumplen funciones más bien complementarias respecto a las células endoteliales. Se cree que los pericitos, las estructuras menos estudiadas de la BHE, dan apoyo estructural, estabilidad a la pared vascular y actúan en el proceso de angiogénesis. Varios estudios han demostrado que los pericitos también evitan la apoptosis del endotelio. Los astrocitos tienen una acción protectora al reforzar y colaborar en el mantenimiento de las uniones estrechas del endotelio, actuando, por ejemplo, frente a hemorragias parenquimatosas e intraventriculares. La microglía por su naturaleza como macrófago desempeña funciones importantes en los distintos mecanismos de ruptura de la BHE.



### Mecanismos de transporte

La BHE es una estructura que posee una permeabilidad selectiva que regula el flujo de sustancias entre el cuerpo y el cerebro. Las estructuras más efectivas con que cuenta para ello son las uniones estrechas de las células endoteliales.

De forma general hay cinco vías para atravesar la BHE: mediado por transportadores, transporte de iones, transporte activo de salida, transporte mediado por receptor y mediado por caveolas (Zlokovic, 2008).

Aún así, el principal mecanismo de transporte a través de la BHE es el empleo de transportadores y por tanto será también en el que nos centremos en los siguientes puntos del trabajo para el transporte de fármacos al endotelio cerebral empleando nanopartículas poliméricas biodegradables.

#### • Mediado por transportadores

Este es el mecanismo que emplea el cerebro para la obtención de nutrientes como hexosas, aminoácidos de diferente carga, ácidos monocarboxílicos, nucleósidos, aminas o vitaminas. El gradiente de concentración suele ir en sentido sangre-cerebro permitiendo así la llegada de estos compuestos al cerebro. Incluye transportadores como GLUT1, L1, CNT2 o MCT1 (Pardridge, 2005).

El GLUT1 es el transportador de glucosa del cerebro y resulta de vital importancia ya que, la glucosa, es su principal fuente de energía. Recientes estudios han revelado que en el declive cognitivo asociado a la vejez se produce una reducción de la entrada de glucosa en determinadas zonas del cerebro (Hunt et al., 2007). Este declive cognitivo suele evolucionar a Alzheimer. De hecho, se ha visto que la reducción del nivel de glucosa empleado por el hipocampo durante un envejecimiento normal puede predecir el declive cognitivo del paciente años antes de poder tener un diagnóstico clínico (Mosconi et al., 2008).

La entrada de cuerpos cetónicos, otra importante fuente de energía para el cerebro en casos extremos; está mediada por el transportador MCT1. Este MCT1 también se encarga de la entrada de lactato u otros monocarboxilatos (Zlokovic, 2008).

La entrada de aminoácidos esenciales está regulada por dos transportadores, L1 y  $y^+$ . Concretamente el L1 permite el acceso al cerebro de aminoácidos esenciales neutros grandes, como tirosina, isoleucina o fenilalanina. Por otro lado, el acceso de aminoácidos catiónicos, tanto esenciales como no esenciales; está mediado por el sistema  $y^+$  (Zlokovic, 2008).

El transporte de vitaminas se realiza por distintos transportadores no únicamente pertenecientes a la BHE. Pero hay alguna excepción como, por ejemplo, el transporte de biotina o ácido pantoténico, que son transportados por el transportador multivitamínico dependiente de sodio (Zlokovic, 2008).

- Transporte de iones

La BHE tiene una gran cantidad de mitocondrias por lo que requiere gran cantidad de energía. Ésta se obtiene mediante transportadores dependientes de ATP como la bomba de sodio-potasio. También posee co-transportadores de sodio-potasio-dos cloros que permite la entrada de estos iones desde la sangre al cerebro.

Los sistemas de intercambio como el de sodio-hidrógeno o cloro-bicarbonato juegan un papel crucial para el mantenimiento del pH en el endotelio cerebral. También hay sistemas de intercambio de sodio-calcio que resultan útiles en situaciones en las que los gradientes de sodio están alterados (Zlokovic, 2008).

- Transporte activo de salida

El mecanismo de expulsión de molécula que posee el cerebro son, principalmente, los transportadores ATP-binding cassette. Siendo uno de los principales la glicoproteína P (P-gp), una bomba ATP dependiente. Junto con esta P-gp, se expresan en los microvasos del endotelio cerebral varias proteínas asociadas multiresistentes a fármacos (MRPs) que colaboran en la expulsión de posibles moléculas tóxicas. Todos estos transportadores colaboran para reducir la entrada de fármacos y su aumentar su expulsión (Zlokovic, 2008).

- Transporte mediado por receptor

Los sistemas de transporte de péptidos 1 y 2 (PTS-1 y PTS-2) median la expulsión de encefalinas y otros péptidos con sentido cerebro-sangre (Banks, 2006).

Las proteínas grandes como transferrina, LDL, insulina, leptina emplean para su ingreso en el cerebro sistemas de transporte mediados por receptores. Estos sistemas de transporte se han intentado emplear para introducir fármacos en el endotelio cerebral mediante la estrategia del caballo de Troya: conjugando las moléculas con anticuerpos monoclonales para cruzar la BHE empleando sus propios receptores (Pardridge, 2007).

- Mediado por caveolas

Las caveolas son unas invaginaciones de la membrana plasmática ricas en proteínas y lípidos cuya función se cree que es la transducción de señales. Estas caveolas controlan la permeabilidad transcelular al regular la endocitosis, transcitosis y señalización en microdominios con base lipídica de la BHE (Parton and Richards, 2003).

Las membranas de las caveolas contienen receptores de transferrina, albumina, interleucinas, HDL, LDL, entre otras. Este hecho indica que puede participar en el transporte de estas sustancias a través de la BHE (Wolburg, 2006).

### Alteraciones de la BHE en Alzheimer

Como todo órgano, el cerebro requiere de un constante y continuo aporte de sangre para su buen funcionamiento. Para ello mantiene un delicado equilibrio entre actividad neuronal y flujo sanguíneo. Se cree que los cambios a nivel vascular cerebral como la degeneración de los capilares cerebrales o la reducción del flujo sanguíneo cerebral en

reposo, son los primeros síntomas de determinadas enfermedades del sistema nervioso central, como Alzheimer, antes incluso que la degeneración de las neuronas.

La enfermedad de Alzheimer cursa con un declive cognitivo progresivo acompañado de alteraciones neurovasculares, aparición de placas neuríticas formadas por péptido  $\beta$ -amiloide tanto en parénquima como en los vasos sanguíneos del cerebro, nudos neurofibrilares; y lesiones intraneuronales.

Este péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) es el factor fundamental del desarrollo del Alzheimer. El péptido  $\beta$ A se acumula en el líquido intersticial cerebral, dando lugar a oligómeros  $\beta$ A tóxicos, seguidamente comienza a acumularse en los capilares y demás tejido vascular, pasando finalmente al estado conocido como angiopatía cerebral amiloidea (CAA).

Se ha observado que en los pacientes de Alzheimer de inicio tardío, la forma más común de esta patología (>99%); el incremento del péptido  $\beta$ A no se produce por un aumento en su producción sino por una disminución en su eliminación (Holtzman and Zlokovic, 2007).

#### ❖ Péptido $\beta$ -amiloide

El principal transportador de entrada de  $\beta$ A es el RAGE. Su interacción con  $\beta$ A produce la entrada de este péptido al cerebro mediante transcitosis, activación del endotelio que culmina en la liberación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión, así como la producción de endotelina 1 que causa una disminución en el flujo cerebral en reposo (Berislav, 2008). Por lo tanto mantener un correcto transporte de este péptido resulta fundamental para el correcto funcionamiento del cerebro.

El principal transportador de salida de  $\beta$ A es el receptor de lipoproteínas de baja densidad asociado a proteína 1 (LRP1). La unión del péptido con este receptor inicia su eliminación del cerebro también vía transcitosis. Se ha visto que durante el envejecimiento natural del cerebro, la expresión del LRP1 va disminuyendo pero cuando su cuando se produce una extremadamente baja expresión del receptor se empieza a producir un acúmulo del péptido.

Sin embargo, se ha visto que otros receptores de lipoproteínas presentes en los astrocitos también contribuyen a la eliminación de péptido  $\beta$ A mediante ApoE (Koistinaho et al., 2004).

#### ❖ Patología vascular

Como se ha comentado anteriormente, una parte también muy importante de esta patología son los cambios a nivel vascular cerebral.

A nivel microvascular se produce un aumento del número de vasos fragmentados y de la irregularidad de la superficie basal, una reducción de la densidad microvascular, cambios en el diámetro de los vasos, así como acumulación de colágeno (Bailey et al., 2004).

Por otra parte estudios recientes muestran una angiogénesis anormal causante de la degeneración de las células endoteliales cerebrales. Se ha podido ver que los pacientes con Alzheimer presentan muy bajos niveles del factor de transcripción MEOX-2, que regula la diferenciación de las células vasculares y que está presente en los individuos adultos solamente en el cerebro (Wu et al., 2005). Estos bajos niveles provocan respuestas anormales a los factores angiogénicos como VEGF, así como la eliminación de LRP1 lo que nos lleva, una vez más, al acúmulo de péptido  $\beta$ A. El acúmulo de formas mutantes de  $\beta$ A produce una eliminación acelerada de células musculares lisas vasculares lo que lleva a hemorragias típicas en algunas formas del Alzheimer (Berislav, 2008).

En resumen, en los primeros estadios de la patología se produce una menor eliminación de péptido  $\beta$ A y la activación de citoquinas proinflamatorias así como supresores del flujo cerebral en reposo. Todo esto nos lleva a una disfunción sináptica y aparición de nudos neurofibrilares.

El acúmulo progresivo de péptido  $\beta$ A lleva a un estado final en el que la unidad capilar desaparece debajo de las placas de  $\beta$ A y se produce una pérdida neuronal y sináptica.

### Nanopartículas, elaboración y funcionalización

Las nanopartículas constituyen uno de los recursos tecnológicos que se pueden emplear para conseguir una liberación modificada de fármacos al lugar de acción. En este tipo de sistemas la velocidad de absorción del principio activo a la diana terapéutica

es mayor que la velocidad de liberación del mismo. Conseguimos así un control de velocidad (control temporal) de liberación del principio activo y además un control de lugar (control espacial), ya que son capaces de atravesar la BHE.

Las principales ventajas de estos sistemas son que se incrementa la cantidad de fármaco que llega a biofase y presentan una mayor duración de efectos. Además, se consigue mantener niveles de fármaco constantes en el lugar de acción, menos efectos no deseados y se puede proteger al fármaco de la degradación en el organismo.

El control espacial de estos sistemas, también llamado vectorización, se consigue empleando un principio activo y un transportador o vector. Este conjunto llega hasta biofase y ahí se empieza a liberar el principio activo. La liberación del principio activo se puede producir mediante distintos mecanismos pero, en nuestro caso, será por difusión del principio activo y erosión del transportador.

Es importante que estos transportadores presenten una serie de requisitos para no resultar peligrosos para el paciente. Deben estar hechos de biomateriales, ser biocompatibles con la vía de administración y biodegradables.

Dentro de los distintos tipos de transportadores, aquí vamos a analizar los polímeros biodegradables, como poli(D,L- láctico-co-glicólico) PLGA o poli(láctico) PLA. Estos polímeros son unas estructuras de alto peso molecular formadas por la unión sucesiva de monómeros, cuyo metabolismo en el organismo consiste en una hidrólisis y su posterior entrada en el ciclo del Krebs para su eliminación final.

Una vez seleccionados los polímeros que pueden resultar adecuados para elaborar las nanopartículas, debemos proceder a la elaboración y funcionalización de las mismas.

A la hora de elaborar nanopartículas hay que tener en cuenta el tipo de fármaco que se quiere encapsular, para en función de sus características físico-químicas, seleccionar el método de elaboración más adecuado. En este sentido, es diferente la técnica que se emplea para la encapsulación de fármaco lipófilos o hidrófilos. Cuando el fármaco es más lipófilo se disuelve, junto con el polímero, en un disolvente orgánico (acetona o diclorometano). En otros casos, cuando el principio activo es más hidrófilo, se mezcla

con una solución acuosa como por ejemplo HCl al 0,001 N. A continuación, esta disolución, se emulsifica con el polímero disuelto en un disolvente orgánico.

Una vez que tenemos definidas las características físico-químicas que presenta el fármaco, hay diferentes métodos de elaboración. Dentro de estos métodos, la técnica de emulsión evaporación o de nanoprecipitación son las más empleadas.

La técnica de emulsión evaporación consiste en disolver el polímero en diclorometano. Por otro lado, se adiciona el fármaco a una solución que puede ser HCl. Esta se añade sobre la solución de polímero y se emulsifica el conjunto. A continuación, la mezcla se añade a una solución acuosa de polivinil alcohol (PVA) al 1%. El conjunto se agita con un homogenizador de ultrasonidos, durante el tiempo que sea necesario, y después se elimina el disolvente orgánico mediante rotavapor. La nanosuspensión obtenida se filtra o centrifuga y se le adiciona un crioprotector (glucosa o manitol). Finalmente se procede a la liofilización para desecar las nanopartículas y aumentar su estabilidad.

Otra opción posible en la técnica de emulsión evaporación sería emplear seroalbúmina humana (HSA) para la estabilización de la nanopartícula. El conjunto polímero-fármaco se adiciona, en este caso, en una solución al 1% de HSA y se siguen los mismos pasos que en el caso anterior: homogeneizado, eliminación del disolvente, filtración, adición del crioprotector y liofilización.

La técnica de nanoprecipitación, consiste en la disolución del polímero y el fármaco en una mezcla de acetona/alcohol o solamente acetona. A continuación, se adiciona a la mezcla una solución acuosa de PVA o HSA y se agita. Luego, se procede a la centrifugación del conjunto para separar las nanopartículas. Finalmente, y de igual forma que con la técnica de emulsión evaporación; se liofilizan las nanopartículas obtenidas.

Mediante estos procesos habríamos obtenido partículas no funcionalizadas, estas son capaces de atravesar la barrera, si tienen un tamaño inferior a 200nm, en un bajo porcentaje. Para incrementar el paso a través de BHE, se modifica la superficie de las partículas con sustancias capaces de emplear alguno de los mecanismos de transporte previamente descritos. Uno de los recursos empleados para modificar la superficie es la

incorporación de surfactantes o de quitosano, la mezcla de polímero y fármaco se añade a una solución de surfactantes-PVA, quitosano-PVA, surfactantes-HSA o quitosano-HSA. Las ventajas y desventajas de cada sustancia para la funcionalización se explican más adelante.

Es más común el uso de PVA ya que proporciona una gran estabilidad a las nanopartículas ante la agregación. Sin embargo, por problemas de seguridad no se recomienda emplearlo en formulaciones parenterales (Birnbaum et al., 2000), siendo el HSA una mejor opción.

La funcionalización de las nanopartículas consiste en modificar su estructura superficial con diferentes sustancias o ligandos. Este proceso permite mejorar la eficacia terapéutica de muchos fármacos. Con algunos compuestos que se utilizan para la funcionalización, se puede aumentar la vida media de los sistemas en el organismo, dirigir al fármaco a tejidos diana, vectorizar a receptores superficiales de las células e incluso a receptores intracelulares específicos.

Los polímeros biodegradables que empleamos, poli(D,L- láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(butil- cianoacrilato) (PBCA) o poli(alquil- ciano- acrilato) (PACA); se pueden recubrir de distintas sustancias como surfactantes del tipo polisorbato 80 (PS80) o poloxamer 188 (P188); polisacáridos como quitosano, también conocido como chitosan (CS), o incluso péptidos. Con este recubrimiento funcionalizamos las nanopartículas y así una mayor cantidad de estas consiguen atravesar la BHE cumpliendo con su objetivo terapéutico.

Al emplear polisorbato 80 (PS80) se han obtenido resultados de alta eficacia de paso a través de la BHE con distintos tipos de nanopartículas como PLGA, PACA, HSA o nanopartículas de lipídicas. Esta capa de PS80 es capaz de adsorber en su superficie ciertas proteínas plasmáticas de forma selectiva, concretamente ApoE y ApoB. Así es capaz de promover una endocitosis mediada por receptor y atravesar las células endoteliales que componen la BHE (Kreuter et al., 2002).

Su gran eficacia se demostró en un estudio de glioblastomas en ratas empleando doxorubicina junto con las mencionadas nanopartículas con PS80 (Steiniger et al., 2004).

Otros estudios realizados con poloxamer 188 (P188) también obtuvieron un efecto antitumoral elevado, demostrando así la eficacia de este tipo de recubrimiento (Ambruosi et al., 2006). Se cree que el éxito de estas nanopartículas se debe a que también adsorben ApoA-1 en su superficie y realizan, del mismo modo que con PS80; una endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, algunos autores han encontrado que la tasa de eliminación del parénquima cerebral de nanopartículas funcionalizadas con P188 era mayor incluso que con nanopartículas no recubiertas (Tahara et al., 2010). Esto supondría un fracaso en este tipo de tratamientos.

En un estudio realizado con PLGA se vio que las nanopartículas funcionalizadas con quitosano (CS) presentaban mayores niveles de entrada al cerebro que las elaboradas con P188; y similares a los de nanopartículas con PS80. Sin embargo, con CS solo se adsorbían en las células endoteliales y no eran transportadas hasta el tejido cerebral.

De forma similar, las nanopartículas con P188 y las no recubiertas se quedaban retenidas en los vasos sanguíneos cerebrales. Mientras que aquellas con PS80 sí aparecían en el parénquima cerebral más allá de las células endoteliales pudiendo así generar un efecto terapéutico (Tahara et al., 2010).

En lo referente a su permanencia en el sistema circulatorio, P80-PLGA fueron las que mostraron mayor tiempo en circulación sanguínea. Este puede ser uno de los factores por lo que su eficacia general resulta mayor que otro tipo de nanopartículas. Por otro lado, CS-PLGA presentan alta concentración en el cerebro, sin llegar a tejido; pero tienen una rápida eliminación de la sangre (Tahara et al., 2010).

En lo referente a la posible citotoxicidad de estas combinaciones de sustancias, y en especial al uso de surfactantes, hay que añadir que solo son peligrosas cuando la concentración de surfactante supera la concentración crítica micelar. Como todas estas

nanopartículas no llegan a formar micelas no hay riesgo de citotoxicidad (Tahara et al., 2009).

Es necesario hacer una breve mención a la vía de administración de todas estas nanopartículas. En los estudios revisados para este trabajo se compararon la vía intravenosa y la administración a través de arteria carótida. Resultó ser más efectiva la opción de la arteria carótida ya que se teoriza con que los fármacos administrados por esta vía se distribuyen primero en cerebro y después en el resto de órganos (Tahara et al., 2010).

En resumen, de todos los surfactantes mencionados, la combinación de poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) con polisorbato 80 (PS80) sería la más efectiva para el transporte de fármacos al sistema nervioso central a través de la BHE (Tahara et al., 2010).

Los diferentes estudios han demostrado que la funcionalización de las nanopartículas y el tipo de sustancia empleado, es el punto clave para lograr el éxito.

### Nanopartículas y su empleo en tratamiento del Alzheimer (paso a través de la BHE)

El Alzheimer es una de las patologías del sistema nervioso central más comunes. Su principal grupo de afectados son los mayores de 65 años aunque cada vez hay más casos de una versión de inicio temprano que afecta a individuos más jóvenes.

La aparición de las placas de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ) y los nudos neurofibrilares provocan un efecto tóxico que da lugar a la pérdida en número y funcionalidad de neuronas colinérgicas. Esto se traduce en una disminución de síntesis y liberación de acetilcolina, alteraciones de la función de los receptores muscarínicos y nicotínicos, lo que finalmente se manifiesta en una serie de síntomas que resultan muy característicos y, generalmente, fácilmente identificables. Entre ellos destacan la pérdida de memoria, la creciente dificultad para resolver tareas cotidianas, desorientación, afasia o alteraciones del habla y pérdida de interés o motivación por formar parte de actividades sociales.

Actualmente la mayoría de estudios de formulaciones de nanopartículas para el tratamiento del Alzheimer han empleado rivastigmina principalmente y donepezilo. La rivastigmina es un inhibidor de la acetil-butilcolinesterasa de tipo carbamato, mientras que el donepezilo es inhibidor específico y reversible de la acetilcolinesterasa. Es decir, ambos mejoran la neurotransmisión colinérgica al disminuir la velocidad de la degradación de la acetilcolina liberada por neuronas colinérgicas funcionales.

El estudio realizado por Avachat et al., analiza el empleo de nanopartículas de seroalbúmina humana (HSA) y rivastigmina. Estas nanopartículas fueron recubiertas con polisorbato 80 (PS80) para facilitar su paso a través de BHE. Los resultados obtenidos mostraron un tamaño de partícula adecuado con un elevado porcentaje de fármaco encapsulado. Esos autores llegaron a la conclusión que estos sistemas constituyen un buen transportador para la administración de rivastigmina.

Zhang et al. desarrollaron nanopartículas de huperizina A (inhibidor de la acetilcolinesterasa) para el tratamiento del Alzheimer. Las nanopartículas se elaboran con PLGA-PEG y son funcionalizadas con aprotinina. La formulación se administró a un modelo animal de ratas con Alzheimer conjuntamente con borneol para potenciar el paso a través de BHE. Los resultados obtenidos mostraron una importante mejora en la eficacia de la huperizina A encapsulada en las nanopartículas funcionalizadas si se administran conjuntamente con borneol.

Li et al. realizaron un estudio para conseguir el paso del péptido H102 (neuroprotector) a través de la BHE y utilizarlo en el tratamiento del Alzheimer. Estos autores elaboran nanopartículas de PLA que son funcionalizadas simultáneamente con dos péptidos diferentes: TGN y QSH. Los resultados obtenidos mostraron un importante incremento en el paso del péptido H102, cuando se emplean las nanopartículas conjugadas con ambos péptidos, respecto a las cantidades de péptido capaces de pasar la BHE con las nanopartículas sin funcionalizar o funcionalizadas únicamente con TGN.

## **Conclusión**

El empleo de nanopartículas, especialmente las formadas por polímeros, está cada vez más cerca de ser una realidad como técnica de administración de fármacos de forma directa al cerebro para el tratamiento de patologías del sistema nervioso central. Con

cada nuevo estudio que se realiza se obtienen mejores resultados que demuestran su eficacia terapéutica y, además, permiten ir seleccionando las combinaciones más adecuadas entre fármaco, polímero y recubrimiento para lograr el mejor resultado posible.

Hay que tener en cuenta que esta nueva herramienta que representan las nanopartículas poliméricas, se debe apoyar siempre en los estudios farmacológicos y la búsqueda de nuevos modelos para así alcanzar un completo conocimiento del mecanismo de funcionamiento del cerebro y cómo le afectan estas patologías.

### **Bibliografía**

[1] Hersh, D.S., Wadajkar, A.S., Roberts, N.B., Perez, J.G., Connolly, N.P., Frenkel, V., Winkles, J.A., Woodworth, G.F., Kim, A.J., 2016. Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 000-000

[2] Escobar, A., Gómez, B., 2008. Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia* Septiembre-Octubre, 9(5): 395-405

[3] Wohlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J., 2012. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 161, 264–273.

[4] Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E.H, Kalbacher, H., Wolburg, H., 2000a. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100(3), 323 – 331.

[5] Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 1999b. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147, 185–194.

[6] Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* 16, 1–13.

[7] Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., Rubin, L.L., 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 110, 1603–1613.

[8] Matter, K., Balda, M.S., 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 4, 225–236.

[9] Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., Imhof, B.A., 2001. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98, 3699–3707.

[10] Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., Dejana, E., Brockhaus, M., 2000. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 275, 30970–30976.

[11] Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S., 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147, 1351 – 1363.

[12] Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G250–G254.

[13] Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., Stevenson, B.R., 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141, 199 – 208.

[14] Zlokovic, B.V., 2008. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201.

[15] Pardridge, W.M., 2005. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol. Biotechnol.* 30, 57–70.

[16] Hunt, A., Schonknecht, P., Henze, M., Seidl, U., Haberkorn, U., et Schroder, J., 2007. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 155, 147–154.

[17] Mosconi, L., De Santi, S., Li, J., Tsui, W.H., Li, Y., Boppana, M., Laska, E., Rusinek, H., et de Leon, M.J., 2008. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiol. Aging*, in press. Published online January 10 2007. 10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.008.

[18] Pardridge, W.M., 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12, 54-61.

[19] Parton, R.G., and Richards, A.A., 2003. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4, 724–738.

[20] Wolburg, H., Prof. Dr. Dermietzel, R., Prof. Dr. Spray D.C., et Prof. Dr. Nedergaard, M., 2006. The Endothelial Frontier. In *Blood-Brain Interface: From Ontogeny to Artificial Barriers*, eds. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH), pp. 77–109.

[21] Holtzman D.M., and Zlokovic, B.V., Sisodia, S., et Tanzi, E.R., 2007. Role of Ab transport and clearance in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology*, eds. (New York: Springer), pp. 179–198.

[22] Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R., et al., 2004. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat. Med.* 10, 719–726.

[23] Bailey, T.L., Rivara, C.B., Rocher, A.B., and Hof, P.R., 2004. The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 26, 573–578.

[24] Wu, Z., Guo, H., Chow, N., Sallstrom, J., Bell, R.D., Deane, R., Brooks, A., Ka-nagala, S., Rubio, A., Sagare, A., et al., 2005. Role of MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Med.* 11, 959–965.

[25] Gelperina, S., Maksimenko, O., Khalansky, A., Vanchugova, L., Shipulo, E., Abbasova, K., Berdiev, R., Wohlfart, S., Chepurnova, N., Kreuter, J., 2010. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 157–163.

[26] Birnbaum, D., Kosmala, J., Brannon-Peppas, L., 2000. Optimization of preparation techniques for poly(lactic acid-co-glycolic acid), *J. Nanoparticle Res.* 2, 173–181.

[27] Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R., 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood–brain barrier, *J. Drug Target.* 10, 317–325.

[28] Steiniger, S.C., Kreuter, J., Khalansky, A.S., Skidan, I.N., Bobruskin, I.N., Smirnova, Z.S., Severin, S.E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K.D., Gelperina, S.E. 2004. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles, *Int. J. Cancer* 109, 759–767.

[29] Tahara, K., Miyazaki, Y., Kawashima, Y., Kreuter, J., Yamamoto, H. 2010. Brain targeting with surface-modified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

delivered via carotid artery administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77, 84–88.

[30] Ambruosi, A., Gelperina, S., Khalansky, A., Tanski, S., Theisen, A., Kreuter, J. 2006. Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model, *J. Microencapsul.* 23 (2006) 582–592.

[31] Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., Kawashima, Y., 2009. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells, *Int. J. Pharm.* 382, 198–204.

[32] Tahara, K., Miyazaki, Y., Kawashima, Y., Kreuter, J., Yamamoto, H., 2011. Brain targeting with surface-modified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles delivered via carotid artery administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77 84–88.

[33] Avachat, AM., Oswal, YM., Gujar, KN., Shah, RD., 2014. Preparation and characterization of rivastigmine loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Current Drug Delivery*, Vol 11, Pages 359-370.

[34] Zhang L1, Han L, Qin J, Lu W, Wang J., 2013. The use of borneol as an enhancer for targeting aprotinin-conjugated PEG-PLGA nanoparticles to the brain. *Pharm Res.* ;30(10):2560-72.

[35] Zhang, C., Zheng, X., Wan, X., Shao, X., Liu, Q., Zhang, Z., Zhang Q., 28 October 2014. The potential use of H102 peptide-loaded dual-functional nanoparticles in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, Volume 192, Pages 317–324

[36] Confaloni, A., Tosto, G., Tata, A., 2016. Promising therapies for Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, Vol 16, pages 1-1.