



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS  
PARA FAVORECER SU PASO A TRAVÉS DE LA  
BHE ENFOCADO EN EL GLIOMA**

Autor: CARLOS HERNÁNDEZ GARRIDO

D.N.I.: 50242797X

Tutor: ANA FERNÁNDEZ CARBALLIDO

Convocatoria: JUNIO

## **Resumen**

La barrera hematoencefálica (BHE) es la superficie que separa la sangre y el encéfalo, además es uno de los mayores obstáculos que tienen los fármacos para poder actuar a nivel del sistema nervioso central. Sólo permite el paso de moléculas pequeñas y lipófilas mediante transporte pasivo, por otro lado hay ciertas moléculas que pueden atravesarla mediante transporte activo ya sea mediado por receptor o mediado por carrier entre otros mecanismos.

Los gliomas son un grupo de tumores que se desarrollan en las células gliales del sistema nervioso central, para tratarlos con fármacos hay principalmente dos inconvenientes: la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica y conseguir una elevada selectividad hacia el tumor. Una de las posibles estrategias para poder acceder a estos tumores es usando nanopartículas, sistemas de liberación de fármacos de tamaño inferior a un micrómetro, cuya superficie se puede modificar añadiendo distintas moléculas capaces de interactuar con los diferentes receptores presentes en la BHE y en el glioma solventando de este modo los dos problemas principales, esta técnica se conoce como funcionalización.

Se proponen cuatro estrategias de funcionalización de nanopartículas que consisten en conjugar con Angiopep que se une a LRP, con Péptido-22 que se une a LDLR, con CRT que se une al complejo transferrina-receptor de transferrina y por último con 2-deoxy-DGlucosa que se une a los receptores GLUT estando todos estos receptores sobreexpresados en barrera hematoencefálica y en ciertas células gliales. De cada nanopartícula funcionalizada se va a analizar técnica de elaboración, caracterización, ratio de transporte a través de la barrera, consumo tumoral y liberación de paclitaxel obteniendo así resultados que permiten demostrar que en mayor o menos medida se cumplen los objetivos propuestos de atravesar BHE y aumentar la selectividad hacia el glioma.

En conclusión, la funcionalización de nanopartículas es una línea de investigación muy prometedora en el tratamiento de tumores del sistema nervioso central ya que se consiguen buenos resultados de paso a través de la barrera hematoencefálica y se aumenta la presencia de fármaco en la zona del tumor alcanzando concentraciones terapéuticas.

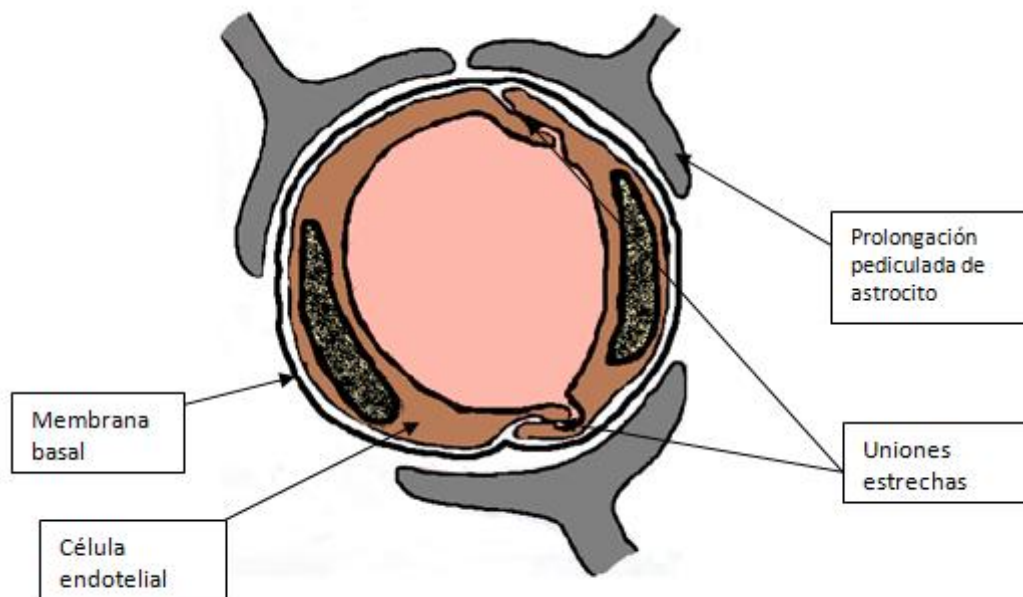
## **1. Introducción y antecedentes**

Las nanopartículas son sistemas coloidales de tamaño inferior a una micra y generalmente de naturaleza polimérica. Suelen fabricarse con polímeros sintéticos destacando los poliésteres de carácter hidrofóbico como el poliácido láctico y los copolímeros de éste con el ácido glicólico (PLGA) [1]. La superficie de las nanopartículas se puede modificar

incorporando distintas moléculas para hacerlas más específicas de una diana en concreto, es lo que se conoce como funcionalización [2].

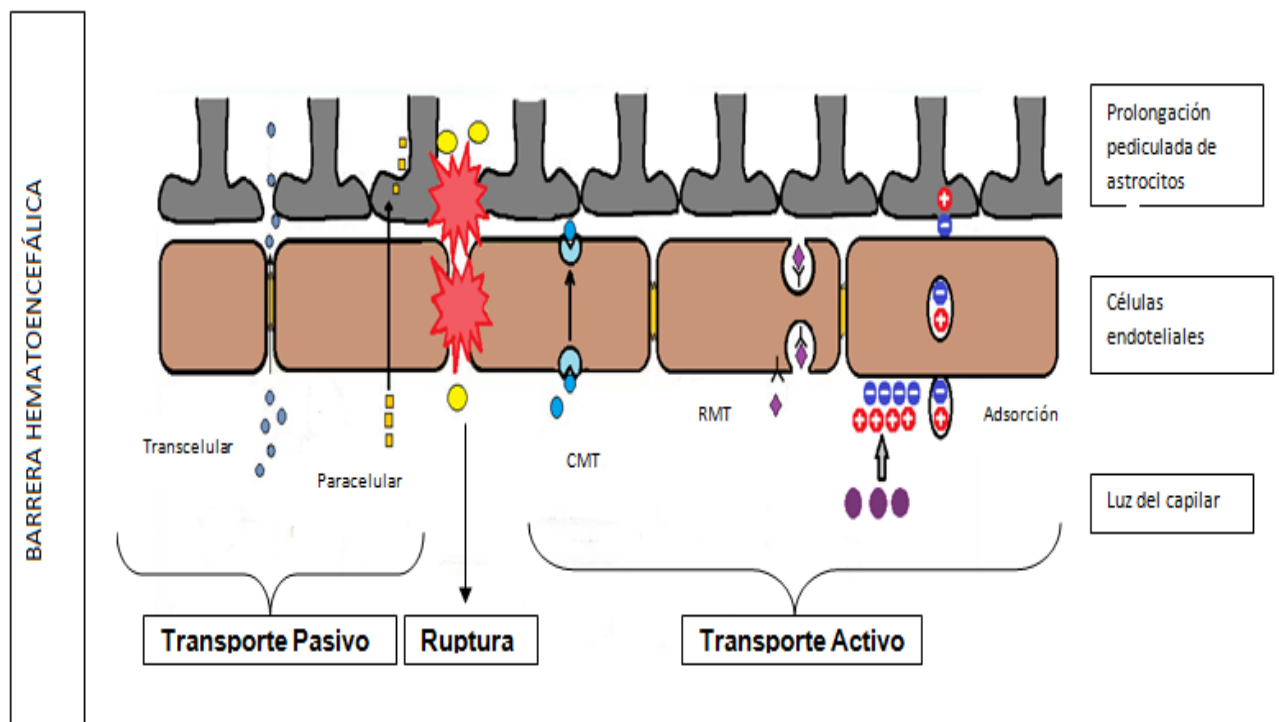
En este trabajo se van a analizar algunas de las estrategias que se emplean para la funcionalización de las nanopartículas que permitan facilitar su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y poder actuar así sobre algunas patologías habituales en el sistema nervioso central como el glioma.

La barrera hematoencefálica (BHE) es la superficie de contacto que separa la sangre y el encéfalo [3]. Estructuralmente está compuesta por células endoteliales de la pared capilar estrechamente unidas entre sí sin permitir la formación de poros, es una membrana basal continua que rodea el capilar por fuera de las células endoteliales y las prolongaciones pediculadas de los astrocitos [4]. Estos astrocitos se adhieren a la superficie externa de la pared del capilar, como se puede observar en la Figura 1, y contribuyen al menos al mantenimiento de las características de la BHE, incluyendo las uniones estrechas entre las células [5]. En términos moleculares, la barrera hematoencefálica es una bicapa lipídica continua que rodea las células endoteliales y aísla el tejido encefálico de la sangre [4].



**Fig. 1** Capilar del SNC

La Barrera hematoencefálica tiene tres funciones principales: proteger al cerebro de compuestos y moléculas circulantes en el torrente sanguíneo; permitir el transporte selectivo, desde la sangre hasta el cerebro, de moléculas necesarias para el funcionamiento del cerebro (oxígeno, glucosa, aminoácidos, nutrientes esenciales) y metabolizar elementos de la sangre hacia el tejido nervioso y viceversa [6].



**Fig. 2:** Mecanismo de transporte a través de BHE

Debido a las características que presenta la BHE, solamente el agua, gases y determinadas sustancias liposolubles y de pequeño peso molecular son capaces de atravesar la barrera. El resto de las sustancias, necesitan el uso de receptores o transportadores específicos para conseguirlo (figura 2). En la tabla 1 se muestran los mecanismos de transporte que se pueden emplear para el paso a través de BHE.

Transporte	Descripción	Tipo	Ejemplo	Ref.
T. Pasivo	Condicionado por peso molecular y lipofilia. El peso molecular debe ser inferior a 600 Da	Transcelular	Pequeñas moléculas lipófilas	[7]
		Paracelular	Pequeñas moléculas hidrófilas	[7]
T. Activo	Transporte a través de la BHE con gasto de	Mediado por receptor (RMT)	Endocitosis o transcitosis del complejo ligando-receptor: LRP	[7]

	energía. Transporte muy selectivo	Mediado por carrier (CMT)	La sustancia se une a molécula transportadora: Glucosa se une a GLUT 1	[7]
		T. activo de salida	Glucoproteína P(gp-P)	[7]
		Adsorción* (AMT)	Moléculas cationizadas que entran con vesículas: algunos anticuerpos	[7]
Ruptura	Se crean aperturas en la barrera que permiten el pasos de sustancias	Química	Manitol: es un agente osmótico que deseca las células y separa las uniones	[7]
		Biológica	Algunas citocinas como la IL1B	[7]
		Física	Ultrasonidos, láser, campos eléctricos	[7]

**Tabla 1.** Diferentes mecanismos de transporte a través de la BHE

\*La superficie de la Barrera hematoencefálica está cargada negativamente. Algunas moléculas que normalmente no la cruzan son cationizadas aumentando la interacción con la barrera formando complejos capaces de cruzar mediante vesículas.

El conocimiento de los diferentes mecanismos de transporte posibilita el diseño de distintas estrategias para favorecer el paso a través de BHE. En este sentido, la incorporación a la superficie de las nanopartículas de ligandos específicos, que puedan ser reconocidos por receptores y/o transportadores, ha permitido el paso de numerosas sustancias que se encuentran encapsuladas en los nanosistemas y que, debido a sus característica físico-químicas, no son capaces de alcanzar el cerebro.

Este trabajo está enfocado a las estrategias que se emplean para la funcionalización de nanopartículas destinadas al tratamiento del glioma, un grupo heterogéneo de tumores que se desarrollan en las células gliales del sistema nervioso central. Dentro de los tipos de glioma, el glioblastoma es el más común y más agresivo de los tumores cerebrales primarios [8].

## **2. Objetivos.**

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica que permita comparar las diferentes estrategias empleadas para la funcionalización de nanopartículas en el tratamiento de tumores cerebrales. Para seleccionar la estrategia más adecuada, las nanopartículas deberán atravesar eficazmente la barrera hematoencefálica y alcanzar de forma selectiva el tejido tumoral en el cerebro.

## **3. Metodología.**

Para alcanzar los objetivos propuestos, se ha realizado una revisión bibliográfica empleando distintas bases de datos: PubMed, ScienceDirect, Google académico y Bucea. Estas bases de datos están disponibles en la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid a través de internet.

La búsqueda se realizó en castellano y en inglés, siendo mucho más relevante la información obtenida en este segundo idioma debido a que la mayoría de artículos en éste área se encuentran publicados en este idioma. Se introdujeron numerosos términos de búsqueda obteniendo los resultados más relevantes con los siguientes: "Blood-Brain Barrier", "Target drugs BBB", "Nanoparticles BBB", "Nanoparticles glioma", "Glioma nanoparticles modified", "Dual targeting nanoparticles", "Glioma nanoparticles therapy", "Nanoparticles Paclitaxel", "BBB funtionalization". A partir de estos términos, se obtuvo una gran cantidad de artículos que fueron revisados y seleccionados para ser incluidos en esta revisión.

Por otro lado, para obtener información de términos más básicos, se ha recurrido a realizar una búsqueda en libros especializados. Conceptos como: barrera hematoencefálica, nanopartículas o glioma han sido consultados en libros de fisiología, tecnología farmacéutica y medicina neurológica respectivamente.

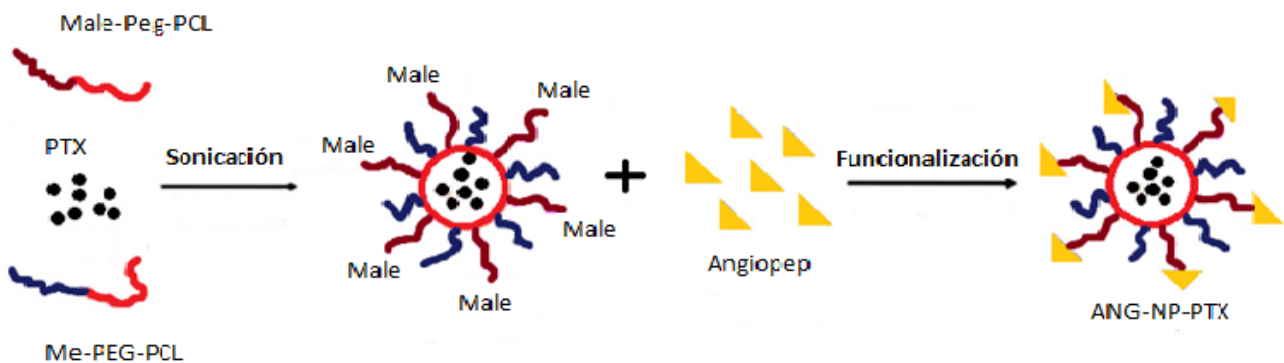
## **4. Resultados y discusión**

Se van a exponer cuatro estrategias diferentes de funcionalización de nanopartículas analizando los componentes de la formulación y con qué técnica están fabricadas, el mecanismo de paso a través de la barrera hematoencefálica, la selectividad sobre las células tumorales y los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

#### 4.1 Elaboración de las nanopartículas

La técnica que usan todos los autores para elaborar las nanopartículas es la de ultrasonidos. En primer lugar los polímeros se disuelven en diclorometano, posteriormente se añade lentamente una solución de sodio colato y se realiza la sonicación de la mezcla. Se forma una emulsión O/A que se dispersa en un volumen de sodio colato y se mantiene en agitación unos minutos con agitador magnético para eliminar parte del diclorometano y favorecer la solidificación de las nanopartículas. A continuación, se pasa la mezcla por un rotavapor para evaporar los restos de disolvente orgánico formándose una suspensión de nanopartículas que son centrifugadas y lavadas con agua desionizada, las nanopartículas resultantes se resuspenden en una solución tampón para su posterior funcionalización [9].

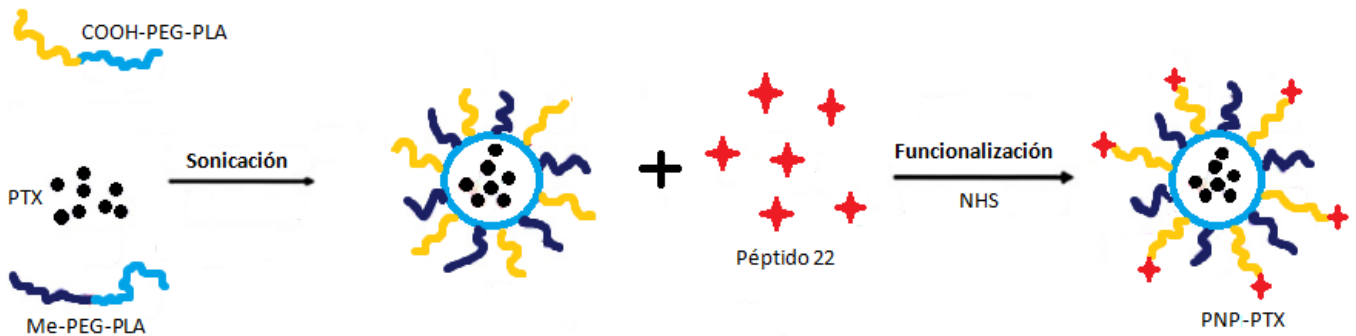
Xin y col. preparan nanopartículas con Polietilenglicol-co-Policaprolactona (PEG-PCL) [9]. En primer lugar se parte de Metoxi-PEG (MePEG) y Maleimide-PEG que actúan como iniciadores de la reacción, estos polímeros se unen a la caprolactona (PCL) mediante polimerización por apertura de anillo, de este modo obtenemos MePEG-PCL y Maleimide-PEG-PCL que son los polímeros que se utilizan para elaborar las nanopartículas, la técnica de elaboración es la sonicación [10]. Una vez obtenidas las nanopartículas, se funcionalizan con Angiopep (ANG). Se añade Angiopep a la solución tampón que contiene las nanopartículas durante 8 horas bajo flujo de Nitrógeno. Los grupos externos de Maleimide reaccionan con los grupos tiol del Angiopep formando las nanopartículas funcionalizadas (ANG-NP) [9].



**Fig 3.** Elaboración de ANG-NP-PTX

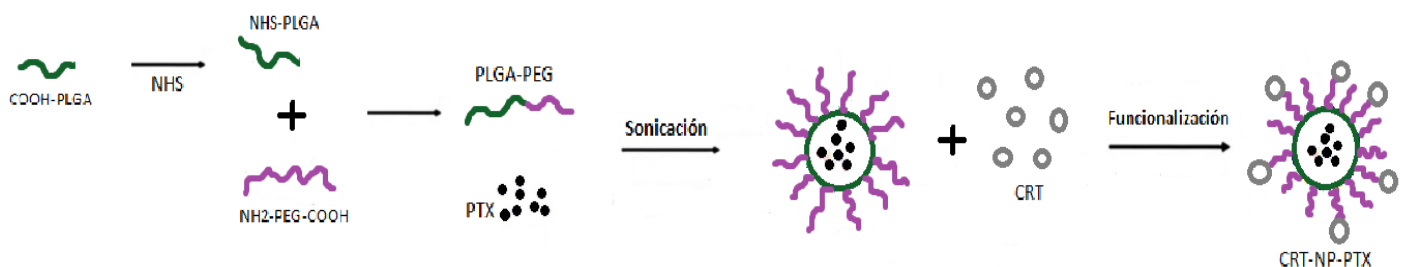
Zhang y col elaboran sus nanopartículas con polietilenglicol-co-ácido poliláctico (PEG-PLA). Se realiza la técnica de sonicación partiendo de MPEG-PLA y COOH-PEG-PLA obteniendo las nanopartículas preparadas para ser funcionalizadas, en este caso con un

péptido 22 [11]. Las nanopartículas se suspenden en agua desionizada y se incuban en exceso de etilcarbodiimida (ETC) y de N-hidroxy-succinimida (NHS), como resultado se obtienen nanopartículas activadas que se hacen reaccionar con un péptido (P-22) bajo agitación magnética formándose las nanopartículas cubiertas de péptido 22 (PNP) [11].



**Fig4.** Elaboración PNP-PTX

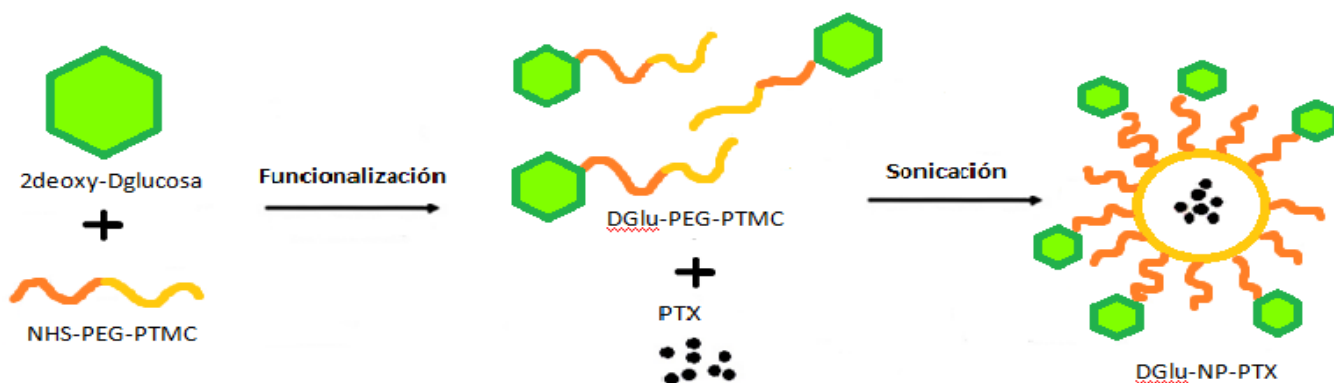
Kang y col se preparan nanopartículas de Poliláctico-co-glicólico-b-poliétilenglicol (PLGA-PEG). Se parte de PLGA que presenta grupos COOH y se disuelve en diclorometano, a continuación se añade un exceso de NHS para obtener NHS-PLGA previo secado a vacío. Este PLGA activado se hace reaccionar con NH<sub>2</sub>-PEG-COOH obteniendo finalmente el polímero deseado PLGA-PEG. Para preparar las nanopartículas a partir de ese polímero se usa el método de sonicación anteriormente descrito [12]. En este caso las nanopartículas se van a funcionalizar con un péptido CRT. Las nanopartículas previamente formadas y resuspendidas se incuban con NHS para obtener nanopartículas activadas, a continuación se hacen reaccionar con el péptido CRT bajo agitación magnética en una proporción de 1:1 obteniendo las nanopartículas funcionalizadas con CRT (CRT-NP) [12].



**Fig5.** Elaboración CRT-NP-PTX

Jiang y col elaboran las nanopartículas y directamente las funcionalizan. Para ello, emplean 2-deoxy-Dglucosa (DGlu) conjugada con polietilenglicol-co-politrimetilencarbonato

(PEG-PTMC). En primer lugar se parte de NHS-PEG-PTMC y 2-amino-2deoxy-Dglucosa que se disuelven en dimetilsulfóxido, se deja que se produzca la reacción durante 48 horas y se obtiene DGlu-PEG-PTMC. El siguiente paso es formar las nanopartículas usando la sonicación. Con este método empleado por estos autores, las nanopartículas ya se forman con los restos de Dglucosa en su superficie, por lo tanto ya se encuentran funcionalizadas [13].



**Fig6.** Elaboración de DGlu-NP-PTX

En todos los casos, los autores emplean como principio activo el paclitaxel (PTX), un citostático muy utilizado en el tratamiento del glioma. Para la elaboración de las nanopartículas cargadas los autores siguen el mismo método que para elaborar las nanopartículas inertes. La incorporación del paclitaxel se realiza al comienzo de la elaboración de las nanopartículas al disolver los polímeros en diclorometano se añade una cantidad adecuada de activo. Posteriormente se funcionalizan con las técnicas ya descritas [9, 11-13].

<b>Autor</b>	Xin y col	Zhang y col	Kang y col	Jiang y col
<b>Polímero</b>	PEG-PCL	PEG-PLA	PLGA-PEG	PEG-PTMC
<b>Técnica de elaboración</b>	Sonicación	Sonicación	Sonicación	Sonicación
<b>Funcionalización</b>	Angiopep	Péptido 22	Péptido CRT	2-deoxy-DGlucosa
<b>Fármaco</b>	Paclitaxel	Paclitaxel	Paclitaxel	Paclitaxel
<b>Tamaño promedio</b>	<100 nm	124,7 nm	136,3nm	71nm
<b>Eficacia de</b>	-	35,8%	63,89%	-

<b>conjugación</b>				
<b>Potencial Zeta</b>	-3,28±0,75 mV	-29,2±,8 mV	-18,43±2,54 mV	-
<b>Referencia</b>	[9]	[11]	[12]	[13]

**Tabla 2:** características de las nanopartículas funcionalizadas y cargadas de PTX

Como se observa en la tabla 2 las nanopartículas formadas presentan tamaños muy diferentes. El tamaño de partícula es una propiedad importante que afecta al paso a través de la BHE a cerebro, un tamaño inferior a 200 nm favorece el paso de los nanosistemas [14]. Además, el tamaño también influye sobre la retención en el tejido tumoral siendo mayor para las nanopartículas más pequeñas [9, 13]. En todos los casos, los autores elaboran nanopartículas con un tamaño adecuado para pasar la BHE, sin embargo el pequeño diámetro de ANG-NP-PTX y de DGlu-NP-PTX puede proporcionar unas mejores propiedades para su los objetivos planteados.

Las nanopartículas elaboradas por Kang y col son las que mayor eficacia de conjugación tienen, esto quiere decir que hay más cantidad de péptido que se une al polímero en comparación con otras técnicas. En las nanopartículas de Angiopep y de Dglucosa no se estudia la eficacia de la conjugación debido a que la funcionalización se lleva a cabo a la vez que la formación de nanopartícula.

El potencial zeta se usa para caracterizar la carga superficial. Las nanopartículas con un potencial zeta superior a  $\pm 30\text{mV}$  han demostrado ser más estables en suspensión [15], esto indica que ninguna de las nanopartículas elaboradas es totalmente estable en esta forma.

#### 4.2 Estrategia de paso a través de la BHE y selectividad hacia el tumor

Las nanopartículas de Xin y col se unen al receptor de lipoproteínas de baja densidad asociado a proteínas (LRP). LRP está muy presente en la BHE y facilita la endocitosis a través de la barrera de diversas moléculas, por otro lado, este receptor, está muy sobreexpresado en ciertas líneas celulares de glioma lo que lo convierte en una diana adecuada para el tratamiento del tumor [16].

Las nanopartículas de PEG-PCL se funcionalizan con Angiopep, un péptido que actúa como ligando de LRP. Este péptido posee una elevada capacidad de penetración a través de la BHE y, además, es capaz de unirse a los receptores de las células U87MG, línea celular de glioma [17].

Las nanopartículas elaboradas por Zhang y col. se conjugan con el péptido P-22. Este péptido sintético ha sido optimizado, para mostrar una especial afinidad por el receptor de

lipoproteínas de baja densidad (LDLR) sin que se produzca una competición con LDL endógenos y, para ser rápidamente transportado al sistema nervioso central [18]. El péptido P-22 tiene otras características interesantes como: bajo peso molecular, buena estabilidad, sencillo de sintetizar y apenas produce inmunogenicidad [19]. Las nanopartículas funcionalizadas atraviesan la BHE por endocitosis uniéndose a LDLR sobreexpresado en la barrera [20]. Por otro lado, la selectividad hacia el tumor se demuestra en células C6 de glioma que tienen una elevada cantidad de LDLR en su membrana [11, 21]. Sin embargo, en otras líneas celulares en tejido cerebral normal, como son las células H92c, no expresan esa cantidad de LDLR [11, 22] y por tanto, las nanopartículas de Péptido-22, no se unen a ellas.

Kang y col. Conjugan las nanopartículas con CRT, un péptido cíclico capaz de imitar el hierro y unirse al complejo que forma la transferrina (Tf) con el receptor de transferrina (TfR) [23]. Este péptido (CRT), presenta tres ventajas: evita la competición con transferrina endógena, es capaz de atravesar la BHE mediante transcitosis mediada por receptor al unirse al complejo Tf-TfR y es capaz de entrar en el glioma por el mismo mecanismo [12]. En este sentido, actuar sobre el receptor de transferrina es una buena estrategia, debido a que está muy expresado en las células endoteliales de los capilares cerebrales y, en el glioma, que necesita el hierro para su proliferación [12, 24].

Jiang y col se basan en la gran cantidad de receptores GLUT que hay en la BHE y en las células del glioma. Este receptor, de glucosa endógena, se encuentra en una cantidad elevada para que las células obtengan energía. Las células del tumor necesitan más cantidad de energía que las células normales para continuar con la proliferación, por lo tanto tienen que captar más glucosa [13, 25]. Las nanopartículas se funcionalizan con 2-deoxy-Dglucosa para que sean capaces de unirse a los receptores GLUT de la BHE. Una vez unidas, podrán atravesar la BHE mediante endocitosis mediada por receptor. De este modo las nanopartículas, cargadas con el fármaco, pueden llegar al tumor y liberarlo.

En la tabla 3 se muestra a modo de resumen las diferentes estrategias propuestas.

<b>Autor</b>	Xin y col	Zhang y col	Kang y col	Jiang y col
<b>Estrategia de paso de la BHE</b>	Endocitosis mediada por receptor	Endocitosis mediada por receptor	Endocitosis mediada por receptor	Endocitosis mediada por receptor
<b>Receptor al que se une la</b>	LRP	LDLR	Complejo Tf-TfR	GLUT

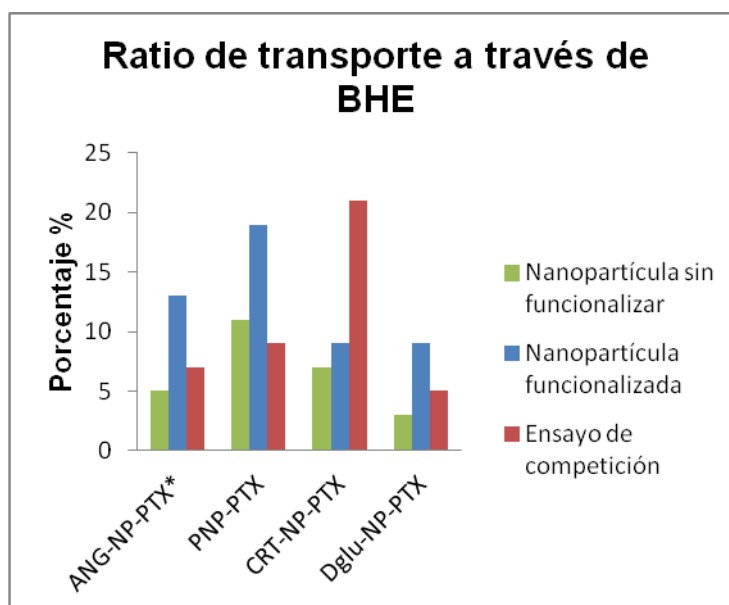
<b>nanopartícula</b>				
<b>Línea celular del glioma estudio <i>in vitro</i></b>	U87MG	C-6 y H9c2	C-6	RG-2
<b>Animal estudio <i>in vivo</i></b>	Ratón desnudo	Ratón desnudo	Ratón desnudo	Ratón desnudo
<b>Referencia</b>	[9]	[11]	[12]	[13]

**Tabla 3:** Selectividad de las nanopartículas y estudios *in vitro* e *in vivo*.

#### 4.3 Ensayos realizados

##### *Paso a través de BHE y ensayo de competición*

Los cuatro autores realizan un ensayo *in vitro* en cultivos celulares para comprobar la eficacia en el paso de las nanopartículas a través de la BHE. En la figura 7 se observa que en todos los casos las nanopartículas funcionalizadas aumentan su ratio de paso a través de la barrera con respecto a los nanosistemas sin funcionalizar, este efecto es poco significativo en CRT-NP-PTX lo que indica que en este caso la funcionalización por sí misma no ejerce un gran efecto en el paso a través de la BHE, mientras que en las elaboraciones restantes el efecto es muy significativo aumentando en gran medida el ratio de transporte [9, 11-13].



**Fig 7.** Ratio de transporte de las nanopartículas en diferentes condiciones. [9, 11-13]

\* El tiempo que transcurre para realizar las tres medidas de las nanopartículas ANG-NP-PTX es 24 horas, mientras que en el resto de nanopartículas es 12 horas.

Por otro lado los autores también realizan un ensayo de competición en el que quieren comprobar cómo disminuye el porcentaje de nanopartículas que atraviesan la BHE si hay otras moléculas en el medio capaces de unirse a los mismos receptores tal y como se muestra en la figura 7. Xin y col realizan el ensayo incluyendo Angiopep que compite con sus nanopartículas y disminuye el ratio de transporte a través de la barrera [9]. Por otro lado Zhang y col añaden exceso de P-22 en el medio del ensayo, el péptido se une a los receptores LDLR impidiendo que lo hagan las nanopartículas [11]. Las nanopartículas elaboradas por Kang y col tienen la característica de que aumentan significativamente el ratio de paso en el ensayo de competición al añadir exceso de transferrina libre, esto se puede explicar mediante el mecanismo de entrada de estos nanosistemas en el cual se necesita que la transferrina y el receptor de transferrina se unan para que CRT se pueda acoplar al complejo y atravesar la barrera, se puede concluir que estas nanopartículas necesitan un aporte extra de transferrina para obtener los mejores resultados de paso a través de la barrera [12]. Por último Jiang y col hacen competir sus nanopartículas con exceso de moléculas de glucosa, obteniendo como resultado una reducción significativa del ratio de paso [13].

#### *Internalización de nanopartículas en células tumorales in vitro*

Los autores realizan ensayos para determinar si realmente las nanopartículas son capaces de penetrar en las células tumorales, para ello unen la partícula con una molécula fluorescente, de este modo comparan la fluorescencia que emiten las células tumorales tratadas con nanopartículas sin funcionalizar y con nanopartículas funcionalizadas. Las partículas usadas para emitir fluorescencia son Rhodamine-B-isotiocianate (RBITC) y Coumarin 6, ambas moléculas son usadas con frecuencia en este tipo de ensayos [26, 27].

Los resultados obtenidos por Xin y col muestran que la fluorescencia emitida por las células tratadas con nanopartículas funcionalizadas y unidas a RBITC es significativamente superior a la emitida por las células tratadas nanopartículas solas [9]. Los resultados obtenidos por Jiang muestran las mismas conclusiones, un 71,2% de las células mostraron fluorescencia al ser tratadas con nanopartículas desnudas mientras que el porcentaje de células que emitieron fluorescencia al ser tratadas con Dglu-NP es del 91,2% [13]. Zhang y col, de igual modo, unen sus nanopartículas a RBITC y realizan su ensayo obteniendo un resultado similar

al obtenido por los autores anteriormente mencionados, la fluorescencia emitida por las nanopartículas unidas a Péptido 22 es mucho mayor comparado con los nanosistemas sin funcionalizar, por otro lado, este autor incluye una diferencia en el ensayo, lo realiza también sobre células sanas H9c2 en las que se observa una fluorescencia similar en partículas conjugadas y no conjugadas confirmándose que las células sanas no presentan una sobreexpresión de receptores LDLR y por lo tanto no tienen afinidad por PNP [11]. Por último Khan y col realizan el ensayo de forma totalmente diferente, unen sus nanopartículas a Coumarina 6 y miden la penetración de las nanopartículas en células C6 de glioma, las nanopartículas sin funcionalizar penetran 51,6 $\mu$ m, las nanopartículas conjugadas con CRT penetran 82,55 $\mu$ m y al añadir transferrina al medio la distancia de penetración aumenta a 144,7 $\mu$ m [12].

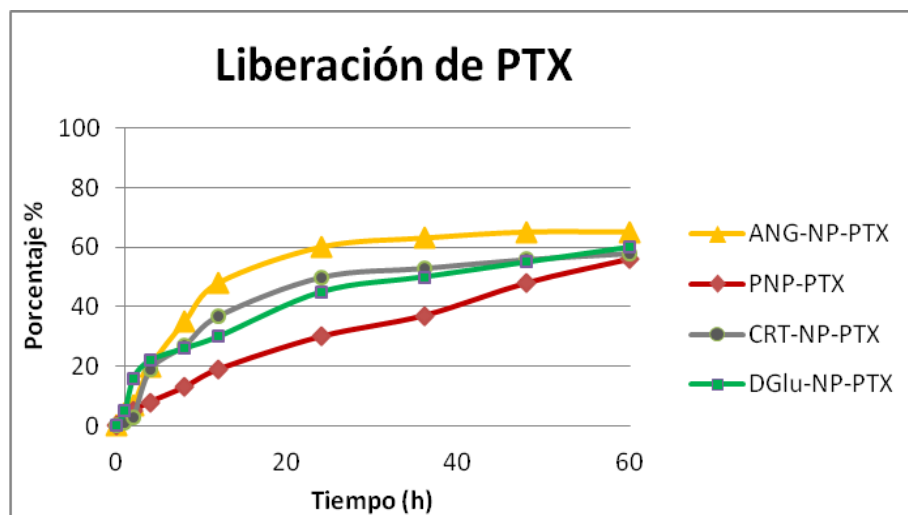
Los cuatro autores demuestran con estos ensayos que sus nanopartículas son selectivas para el tumor y que sus mecanismos de funcionalización aumentan significativamente la entrada de las partículas en las células en comparación con los sistemas desnudos.

#### *Liberación de Paclitaxel*

Los autores realizan ensayos de cesión para evaluar la liberación de Paclitaxel, de este modo demuestran que la funcionalización de sus nanopartículas no influye en el porcentaje de fármaco liberado ya que todos obtienen unos resultados de liberación similares al obtenido por las nanopartículas sin funcionalizar [9,11-13].

En la figura 8 está representada una curva de liberación de Paclitaxel por cada una de las nanopartículas funcionalizadas analizadas. Se puede destacar que PNP-PTX sigue una liberación lineal, es decir, liberando cantidades constantes de fármaco durante todo el tiempo que dura el ensayo. Sin embargo el resto de las formulaciones de nanosistemas desarrolladas liberan una elevada cantidad de fármaco en las primeras 12 horas y en las horas posteriores la liberación se estabiliza.

Por otro lado en la figura 8 se observa como las nanopartículas funcionalizadas con Angiopep presentan un mayor porcentaje de fármaco liberado desde las 8 horas hasta el final del ensayo. A las 60 horas esta formulación ha liberado el 65% de su carga.



**Fig 8.** Porcentaje de liberación de PTX por cada nanopartícula. [9,11-13]

### Viabilidad celular

Los autores realizan un estudio *in vitro* en líneas celulares tumorales, para evaluar la viabilidad que presentan las células al ser tratadas con las nanopartículas funcionalizadas y cargadas con Paclitaxel.

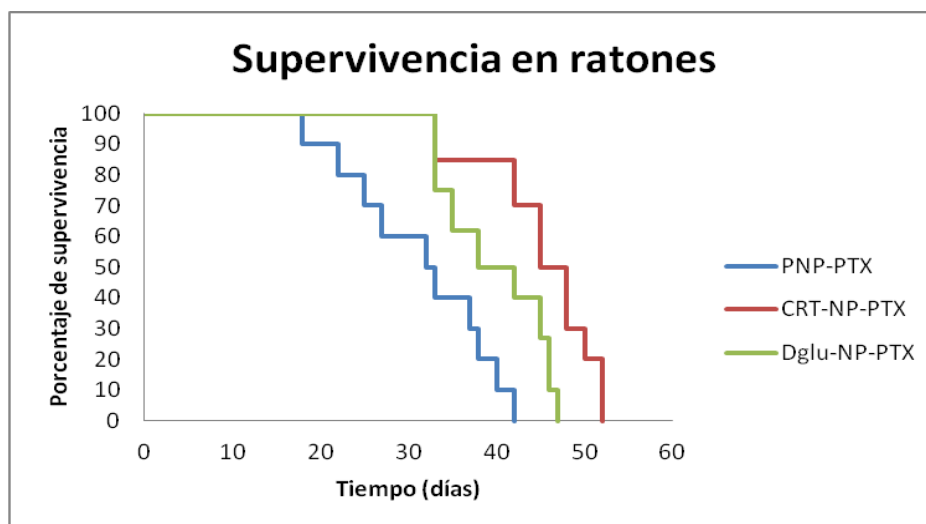
Xin y col al igual que Jiang y col realizan el ensayo haciendo pasar las nanopartículas por un modelo de las células de la barrera hematoencefálica antes de entrar en contacto con las células tumorales obteniendo resultados de viabilidad de célula tumoral y además resultados de especificidad en el paso por la barrera. El porcentaje de células tumorales viables al ser tratadas con ANG-NP-PTX es de 48%, un valor inferior al 59% obtenido al realizar el ensayo con NP-PTX, estos resultados demuestran que la funcionalización potencia el transporte a través de la BHE además de la entrada y liberación de paclitaxel en las células tumorales [9]. Por otro lado al realizar el mismo ensayo con las nanopartículas DGlu-NP-PTX se obtiene un porcentaje de inhibición del 50%, muy similar al obtenido por ANG-NP-PTX, sin embargo en estas nanopartículas la disminución de la viabilidad es más notoria debido a que el resultado obtenido al realizar el ensayo con nanopartículas sin funcionalizar es de 75% demostrándose nuevamente que la funcionalización ayuda al paso por la BHE y a la entrada al tumor [13]. Ambos autores utilizan una concentración de nanopartículas de 10 $\mu$ g/ml.

El ensayo realizado por Kang y col no incluye un modelo de BHE, solo mide la viabilidad celular a diferentes concentraciones de nanopartículas cargadas de paclitaxel y de nanopartículas inertes, los resultados obtenidos indican que para que la viabilidad celular descienda notablemente es necesario añadir transferrina libre al medio.

### Ensayos en modelos animales

Los autores miden la supervivencia de ratones a los que se les ha inducido el glioma. Se inyectan las nanopartículas funcionalizadas y cargadas de paclitaxel en la vena de la cola de los ratones y se va observando el porcentaje de supervivientes en los días consecutivos.

Como se observa en la figura 9 los tres tipos de nanopartículas con las que se realiza este ensayo ofrecen resultados diferentes, por un lado tenemos las nanopartículas de Péptido 22 que aumentan la supervivencia de los ratones de 14 días (ratones tratados con suero) a 32 días. En segundo lugar se encuentran DGlu-NP-PTX que eleva la supervivencia media de 29 días a 38 días. Por último, las nanopartículas de CRT son las que ofrecen una mayor supervivencia (46 días), siendo de 21,5 días los tratados con suero. En base a estos resultados se observa que las nanopartículas elaboradas por Kang y col son las que mayor incremento consiguen en la supervivencia media sobre la población de ratones. [11-13].



**Fig 9.** Porcentaje de supervivencia de ratones\* [11-13]

\*No se dispone de datos de ANG-NP-PTX

### Conclusión

Las cuatro estrategias empleadas para para funcionalizar nanopartículas, consiguen favorecer su paso a través de la barrera hematoencefálica y aumentar su selectividad hacia el glioma.

Aunque todos los autores logran elaborar nanopartículas que atraviesan eficazmente la barrera hematoencefálica, las nanopartículas funcionalizadas con CRT-NP-PTX han demostrado ser el sistema que más eficazmente atraviesa la BHE con una mayor

internalización en células tumorales. Los resultados in vivo, muestran un incremento significativo en la supervivencia de los ratones con CRT-NP-PTX sobre todo cuando se incluye transferrina en los cultivos.

La funcionalización de nanopartículas constituye una estrategia muy prometedora en el tratamiento de los gliomas al conseguir concentraciones terapéuticas de fármaco en el lugar de acción y permitir disminuir los efectos adversos derivados de los tratamientos antineoplásicos.

## Bibliografía

- [1] Vila Jato J, Lastres García J. Tecnología farmacéutica. Madrid: Síntesis; 1999.
- [2] Mout R, Moyano D, Rana S, Rotello V. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(7):2539.
- [3] de Boer A, Gaillard P. Blood–brain barrier dysfunction and recovery. *Journal of Neural Transmission*. 2006;113(4):455-462.
- [4] Snell R. Neuroanatomía clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- [5] Koziara J, Lockman P, Allen D, Mumper R. In Situ Blood–Brain Barrier Transport of Nanoparticles. *Pharm Res*. 2003;20(11):1772-1778.
- [6] Escobar A, Gómez González B. Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2008;9(5):395-405.
- [7] Milojkovic Kerklaan B, van Tellingen O, Huitema A, Beijnen J, Boogerd W, Schellens J et al. Strategies to target drugs to gliomas and CNS metastases of solid tumors. *Journal of Neurology*. 2015;263(3):428-440.
- [8] Lombardi G, Della Puppa A, Di Stefano AL et al. Gliomas. *BioMed Research International*. 2014.
- [9] Xin H, Jiang X, Gu J, Sha X, Chen L, Law K et al. Angiopep-conjugated poly (ethylene glycol)-co-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials*. 2011;32(18):4293-4305.
- [10] Pang Z, Lu W, Gao H, Hu K, Chen J, Zhang C et al. Preparation and brain delivery property of biodegradable polymersomes conjugated with OX26. *Journal of Controlled Release*. 2008;128(2):120-127.
- [11] Zhang B, Sun X, Mei H, Wang Y, Liao Z, Chen J et al. LDLR-mediated peptide-22-conjugated nanoparticles for dual-targeting therapy of brain glioma. *Biomaterials*. 2013;34(36):9171-9182
- [12] Kang T, Jiang M, Jiang D, Feng X, Yao J, Song Q et al. Enhancing Glioblastoma-Specific Penetration by Functionalization of Nanoparticles with an Iron-Mimic Peptide Targeting Transferrin/Transferrin Receptor Complex. *Mol Pharmaceutics*. 2015;12(8):2947-2961.
- [13] Jiang X, Xin H, Ren Q, Gu J, Zhu L, Du F et al. Nanoparticles of 2-deoxy-d-glucose functionalized poly(ethylene glycol)-co-poly(trimethylene carbonate) for dual-targeted drug delivery in glioma treatment. *Biomaterials*. 2014;35(1):518-529.
- [14] Hu K, Li J, Shen Y, Lu W, Gao X, Zhang Q et al. Lactoferrin-conjugated PEG–PLA nanoparticles with improved brain delivery: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Controlled Release*. 2009;134(1):55-61.
- [15] Oropesa Nuñez R, Jáuregui Haza U. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *CENIC Ciencias Biológicas*. 2012;43(3).
- [16] Yamamoto M, Ikeda K, Ohshima K, Tsugu H, Kimura H, Tomonaga M. Expression and cellular localization of low-density lipoprotein receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor in human glioblastoma in vivo. *Brain Tumor Pathol*. 1998;15(1):23-30.
- [17] Ke W, Shao K, Huang R, Han L, Liu Y, Li J et al. Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials*. 2009;30(36):6976-6985.

- [18] Malcor J, Payrot N, David M, Faucon A, Abouzid K, Jacquot G et al. Chemical Optimization of New Ligands of the Low-Density Lipoprotein Receptor as Potential Vectors for Central Nervous System Targeting. *J Med Chem.* 2012;55(5):2227-2241.
- [19] Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers.* 2002;66(3)
- [20] Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol.* 1994;126(2)
- [21] Maletinska L, Blakely EA, Bjornstad KA, Deen DF, Knoff LJ, Forte TM. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res.* 2000;60(8)
- [22] Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* 1999;19
- [23] Staquicini F, Ozawa M, Moya C, Driessen W, Barbu E, Nishimori H et al. Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. *Journal of Clinical Investigation.* 2011;121(1):161-173.
- [24] Recht L, Torres C, Smith T, Raso V, Griffin T. Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for brain-tumor immunotherapy. *Journal of Neurosurgery.* 1990;72(6):941-945.
- [25] Gorin F, Harley W, Schnier J, Lyeth B, Jue T. Perinecrotic glioma proliferation and metabolic profile within an intracerebral tumor xenograft. *Acta Neuropathologica.* 2004;107(3):235-244.
- [26] Shi H, He X, Wang K, Yuan Y, Deng K, Chen J et al. Rhodamine B isothiocyanate doped silica-coated fluorescent nanoparticles (RBITC-DSFNPs)-based bioprobes conjugated to Annexin V for apoptosis detection and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2007;3(4):266-272.
- [27] Finke J, Richter C, Gothsch T, Kwade A, Büttgenbach S, Müller-Goymann C. Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy?. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2014;116(9):1234-1246.