

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Nanopartículas de Morin funcionalizadas con fenilalanina para
el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Alonso González

Directoras

Ana María Fernández Carballido

Emilia María Barcia Hernández

Madrid

© Mario Alonso González, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

NANOPARTÍCULAS DE MORIN FUNCIONALIZADAS CON FENILALANINA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Alonso González

DIRECTOR

Ana María Fernández Carballido y Emilia María Barcia Hernández

*A mis padres y a mi hermana,
por su apoyo y cariño.*

Han ocurrido muchas cosas desde que comencé el largo camino que finaliza con la firma de esta memoria hace ya 5 años. Durante este tiempo, el número de personas que me han mostrado su apoyo o han participado activamente en algún punto de esta tesis es enorme. A todas ellas me gustaría darles las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, las Dras. Ana M. Fernández Carballido y Emilia M. Barcia Hernández, el apoyo que me han brindado desde el primer instante que puse un pie en este departamento, antes incluso de haber terminado la licenciatura. Durante estos años me habéis permitido organizarme como prefiriese y siempre habéis estado allí para aconsejarme o sacarme de un apuro; al igual que para darme ánimos cuando mi motivación ha estado más baja y me han ayudado a superar el escollo (recordemos aquella sucesión de incidentes con el HPLC, que ahora parecen tan lejanos).

A Ana no puedo si no agradecerle su buen humor y disposición siempre positiva. Ha sido capaz de ver los puntos fuertes del mayor de los contratiempos, no puedo olvidar tampoco que fue ella quien me animó a emprender este camino. A Emilia, su buena disposición e infinita paciencia; siempre ha aportado un punto de coherencia a un doctorando algo caótico en sus qué haceres.

Me resulta imposible no mencionar a continuación a Mónica C. Villa, compañera de laboratorio que ha estado trabajando conmigo, codo con codo, a las buenas y a las malas, desde el máster del departamento y con quien he fraguado una gran amistad. Los “grandes momentos de la tesis” quedan en el recuerdo para demostrarlo.

Quisiera, también, agradecer a todos los profesores del departamento que me han apoyado de distintas formas a lo largo del camino. Me gustaría hacer hincapié en el apoyo recibido por la Dra. Sofia Negro durante estos años. Tampoco me puedo olvidar de la Dra. Ana I. Torres, quien me ha brindado la oportunidad de probar otros aspectos de la investigación en este departamento. A los Drs. Manuel y Damián Córdoba, que siempre me han acogido con cariño y aconsejado como si fuese uno de sus propios doctorandos y a los que debo muchas de las costumbres que he adquirido con el HPLC. Si hablamos de profesores del departamento es imposible olvidarse de la Dra. Ana I. Fraguas, quien desde siempre se ha mostrado dispuesta a echarme una mano, no importaba lo ocupada que estuviese. Y por supuesto, debo agradecer al Dr. Santiago Torrado, que siempre me recibe del mejor humor y está dispuesto a ayudarme con cualquier traba que se me presente (sin olvidar que en no pocas ocasiones me ha ahorrado el trayecto en metro).

Igualmente me gustaría agradecer a la Dra. Consuelo Montejo del CEU, siempre dispuesta a ayudar, aun después de finalizar mi estancia en esa universidad. Gracias a ella, en la San Pablo CEU me he sentido como en mi *alma mater*.

También he de agradecer al Dr. Luis García, por la paciencia y el apoyo que ha mostrado tanto durante los ensayos en animales como durante mis estudios en el edificio pluridisciplinar. En ese sentido he de agradecer también a Rubén, sin cuya habilidad para

la manipulación de los animales muchos de los estudios realizados en esta tesis hubiesen sido imposibles.

Igualmente he de agradecer al Dr. Juan F. González. Siempre ha estado dispuesto a echarme un cable, pese a lo ocupado que pudiese estar. Además, su ayuda ha sido indispensable para la elaboración de una de las formulaciones que se proponen en esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio:

Somos muchos los miembros de este departamento y a la mayor parte de vosotros os tendría que agradecer muchas cosas, pero permitidme que reduzca un poco el texto.

Desde el máster de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, he tenido el privilegio de contar con la amistad Carlos Torrado y de Víctor Guarnizo (aunque haya emigrado al otro lado del charco), al igual que con Nicola Paccione., Verónica García, Yvonne Del Val y Teresa Gallego o con nuestro técnico de laboratorio Pablo Notivoli. Con todos ellos las risas, cafés cervezas y comidas han sido continuas. Vuestro apoyo y presencia ha sido indispensable para sobrellevar los más y los menos del periodo predoctoral.

No puedo olvidarme de Patricia quien me ayudó a dar mis primeros pasos en este departamento y me facilitó el contacto con la farmacia que me permitiría mantener mis estudios sin preocuparme por el trabajo. En esta farmacia tuve el placer además de coincidir con María, antigua compañera de unidad y con Nuria quienes me han apoyado y brindado su amistad desde entonces.

Aunque nuestro contacto haya sido más corto, también debo agradecer a todos los que cariñosamente he puesto el apodo de “*Minion*” pues me habéis dado la oportunidad participar en vuestro aprendizaje y a su vez habéis aportado algo a mi propia formación: Rafa, Patri, Jenny y Ana.

Aunque nuestra interacción ha sido breve también me gustaría mencionar a aquellas personas que habéis aportado algo de alegría al día a día de mi tesis: Kim, nuestra alumna belga, con quien mantengo aún contacto a pesar de la distancia y los años. Natalia, decidida a sacar tanto el doctorado como un trabajo en industria. A Carmen y a Teresa, a quienes siempre liamos para un café o una cerveza y me han alegrado el día con su compañía. O a Sara, que siempre tenía una frase de ánimo. A nuestra compañera de laboratorio Mahdieh quien, aunque debido a la pandemia hemos interactuado menos, siempre ha sido amable y presta a ayudar.

A mis queridos vecinos de laboratorio: Sergio, David, Javier, Alba, Miriam, Marco, y Alicia. Debo dedicaros un par de palabras de agradecimiento por añadir un poco de emoción a las mañanas en el laboratorio. Haré hincapié en que los datos de pZ. se han podido obtener gracias a Javier.

No todas las personas que me han apoyado o han intervenido en esta tesis están relacionadas con el mundo académico o de la farmacia.

A mis amigos de toda la vida: Sergio, Dani, Carlos y Jaime; a los que he visto menos de lo que debería estos años, pero que sé que siempre estáis ahí para apoyarme. De igual manera agradezco la amistad que Rubén y Javi me han mostrado, aguantándome en los peores y en los mejores días. A Cristina, Jessica y Rebeca también he de hacerles un hueco en estos agradecimientos, pues siempre que hemos coincidido me han animado, no importa si las cosas fueran bien o mal.

De mis amigos de la carrera no puedo olvidarme, pues han estado atentos al progreso de esta tesis, aunque no siempre nos hayamos visto. Entre ellos, a Miguel, a Julia C. a Alberto y a Isa les agradezco haberme ayudado a seguir a flote en los momentos más bajos de estos años. Igualmente agradezco a Alejandro y Estéfano. su amistad, espero poder seguir visitándolos allí donde continúen su carrera en investigación. No obviaré a Jorge J., que ha sido un buen amigo y ha ejercido de válvula de escape en los momentos de tensión. Por supuesto también incluiré a Ana Belén P., quien me ha alegrado los días con sus visitas.

Bajo ningún concepto puedo olvidarme de Irene Ortiz, compañera y amiga desde primero de carrera, que me ha apoyado en los más y los menos de la carrera académica durante más de 11 años. Como futura PhD en veterinaria le deseo lo mejor y sabe que siempre puede contar conmigo y con mi apoyo.

A Carlos Corral, Álvaro Pérez y Gema Díaz, los “*tres mosqueteros*” de mis años de carrera, su apoyo aun después de tantos años.

No me quiero olvidar tampoco de Julia. ni de Alicia., pues han sido importantes durante gran parte del tiempo que ha ocupado esta memoria, siempre os deseare lo mejor.

Por último, pero no menos importante me gustaría agradecer a toda mi familia. Especialmente a mi hermana por recordarme la importancia de lo que hago, sobre todo cuando yo la pierdo de vista. A mi padre, por aportar la calma y la lucidez a la hora de afrontar un contratiempo, de los que han sido más que frecuentes durante este periodo. Y a mi madre, por aguantarme con infinita paciencia, sobre todo en los momentos en los que paciencia es justo lo que a mí me ha faltado.

A todos mis tíos y a mis primos, muchas gracias por vuestro apoyo e interés durante estos años.

La lista de agradecimientos podría seguir casi hasta igualar el número de páginas de esta memoria. Muy a mi pesar, debo terminarla aquí. A todas las personas que han intervenido en ella, de verdad, muchas gracias.

ABREVIATURAS:

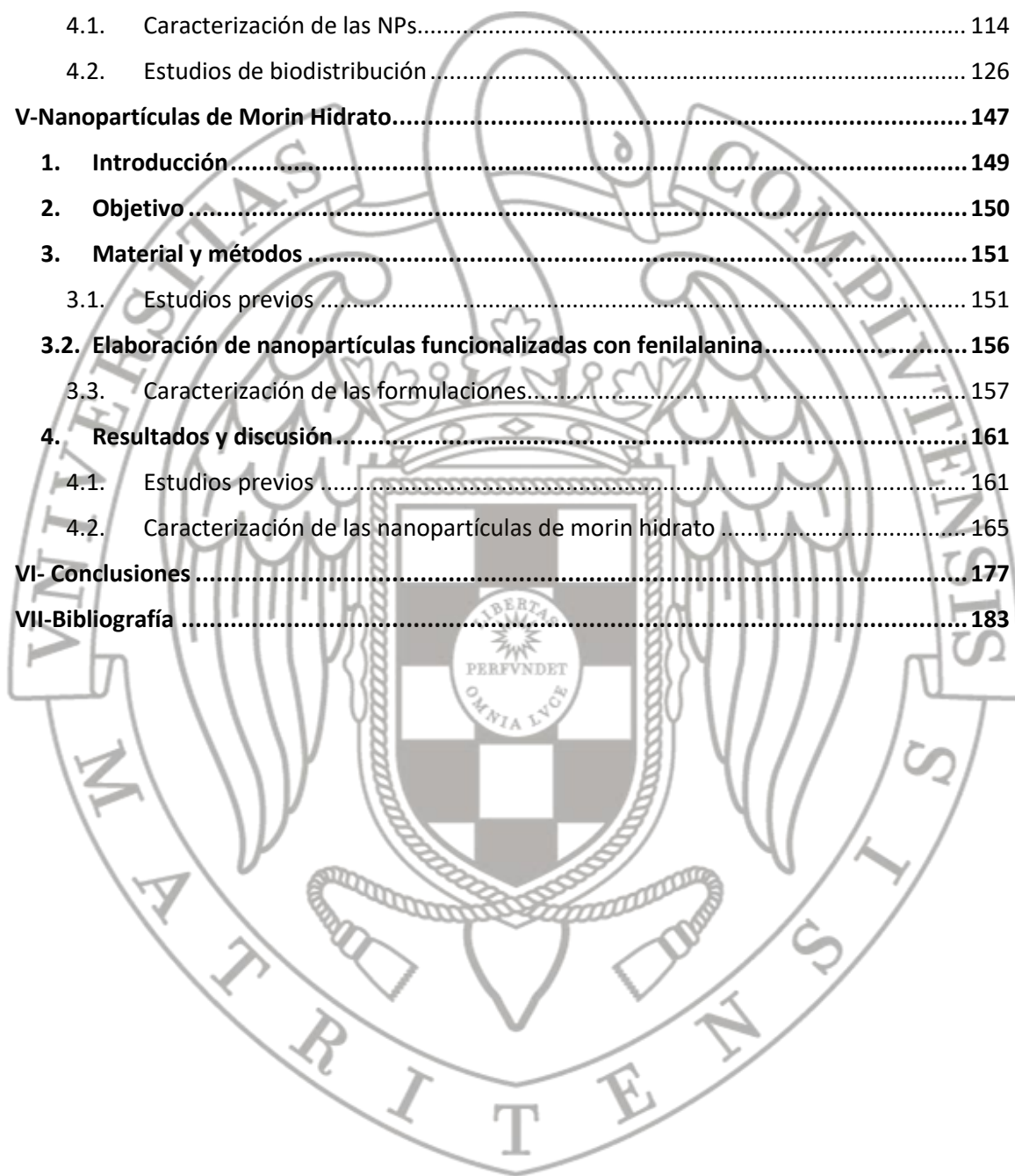
Aa	Aminoácido
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Acetil-CoA	Acetil coenzima-A
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antinflamatorios no esteroideos
AJs	Uniones adherentes
APP	Proteína precursora de amiloide
Aα	α -amiloide
Aβ	β -amiloide.
BACE-1	<i>β-site-APP-cleaving enzyme-1</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BSLCR	Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo
CAMKII	Calmodulin-quinasa II
CV	Coefficiente de variación
DCM	Diclorometano.
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DV	Diámetro volume
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT	Transportadores de glutamato
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreto
EE	Eficacia de encapsulación
EP	enfermedad de Parkinson.
ER	error relativo
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos, EE.UU.
GJs	Uniones Gap
Glut-1	Transportador de glucosa de tipo 1
Glut-3	Transportador de glucosa de tipo 3
Glut-5	Transportador de glucosa de tipo 5
Gly	Glicina
Gp-P	Glicoproteína-P
GSK3β	Glicógeno-sintasa quinasa 3 β
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IC50	Concentración inhibitoria
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IP	Indice de polidispersión
JAM	<i>Junctional adhesion molecules.</i>
LAT-1	Transportador de aminoácidos largos-1
LC	Límite de cuantificación
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LD	Límite de detección
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor related protein</i>

MES	Ácido 2-(4-morfolino)-etanosulfónico
MetOH	Metanol
MH	Morin hidrato
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPs	Nanopartículas
NT	Neurotransmisor
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	fenilalanina-amonio liasa.
PBS	Tampón fosfato
Phe	Fenilalanina
Phe-phe	Dipéptido de fenilalanina
PLGA:	Ácido poliláctico co-glicólico
PLGA-phe-phe	PLGA unido al dipéptido de fenilalanina
p-Tau	Proteína Tau
PVA:	alcohol polivinílico.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
pZ	Potencial Z
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end product</i>
RI	Receptor de insulina
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto.
RTf	Receptor de transferrina
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SI	Sistema Inmune
SNC	Sistema nervioso central
T_{1/2}:	Semivida plasmática.
Tf	Transferrina
TJs	Uniones estrechas
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
tr	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
VIS	visible

ÍNDICE

Resumen	1
Summary.....	9
I- Introducción	17
1. Enfermedad de Alzheimer	19
1.1. Anatomía patológica	20
1.2. Diagnóstico de la EA.....	24
1.3. Tratamiento de la EA.....	25
2. Barrera Hematoencefálica	31
2.1. Componentes de la BHE.....	32
2.2. Transporte a través de la barrera.....	35
2.3. Alteraciones en la BHE en la EA.....	44
3. Flavonoide Morin	45
3.1. Características físico-químicas:.....	49
3.2. Características farmacocinéticas.....	50
3.3. Actividad frente a la Enfermedad de Alzheimer	52
3.4. Morin y barrera	56
3.5. Morin como hepatoprotector	57
II- Objetivos.....	59
III- Determinación analítica de morin	63
1. Introducción	65
2. Objetivos	66
3. Materiales y métodos	67
3.1. Determinación analítica de morin por HPLC.....	67
3.2. Determinación analítica de morin por espectrofotometría UV.....	75
4. Resultados y Discusión	77
4.1. Determinación analítica de Morin por HPLC.....	77
4.2. Resultados de la cuantificación de morin hidrato en tampón PBS por espectrofotometría UV.	91
IV Nanopartículas de PLGA funcionalizadas con un dipéptido de fenilalanina	95
1. Introducción	97
2. Objetivos	98

3. Material y métodos	99
3.1. Elaboración de nanopartículas de Rodamina B.....	99
3.2. Caracterización de las formulaciones.....	105
3.3. Estudios de biodistribución.....	110
4. Resultados y discusión	114
4.1. Caracterización de las NPs.....	114
4.2. Estudios de biodistribución.....	126
V-Nanopartículas de Morin Hidrato.....	147
1. Introducción	149
2. Objetivo	150
3. Material y métodos	151
3.1. Estudios previos	151
3.2. Elaboración de nanopartículas funcionalizadas con fenilalanina.....	156
3.3. Caracterización de las formulaciones.....	157
4. Resultados y discusión	161
4.1. Estudios previos	161
4.2. Caracterización de las nanopartículas de morin hidrato	165
VI- Conclusiones	177
VII-Bibliografía	183



RESUMEN

Introducción

Morin hidrato (MH) es un flavonoide de origen vegetal, que ha demostrado *in vitro* tener actividad frente a mecanismos de neurodegeneración asociados a la enfermedad de Alzheimer (EA), evitando la hiperfosforilación de la proteína Tau, disolviendo los agregados de péptido β -amiloide que forman las placas seniles y reduciendo el estrés oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno. Su potencial uso en clínica está muy limitado debido a su baja biodisponibilidad, rápido metabolismo hepático y escasa capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

Objetivo

El objetivo principal de esta tesis doctoral es incrementar la capacidad de paso de MH a través de la BHE, potenciando así su potencial interés en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas; como el Alzheimer. Para ello, se desarrollan y caracterizan nanopartículas (NPs) biodegradables de PLGA, cargadas con MH y funcionalizadas con el dipéptido fenilalanina-fenilalanina, empleado para favorecer la vectorización al lugar de acción en sistema nervioso central. La funcionalización se realiza, en primer lugar, sobre las nanopartículas ya elaboradas y, en segundo lugar, sobre el polímero antes de la formación de los nanosistemas. Una vez caracterizados *in vitro* las NPs, se estudia su biodistribución *in vivo*. Para la cuantificación de MH se han puesto a punto y validado métodos por HPLC y por espectrofotometría UV.

Parte experimental

- Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de MH: HPLC y espectrofotometría UV.
- Desarrollo y caracterización de nanopartículas sin funcionalizar y funcionalizadas con el péptido phe-phe, y cargadas con el marcador de fluorescencia (rodamina-B).
- Desarrollo y caracterización *in vitro* de nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato.
- Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las nanopartículas en hígado, riñón, pulmón y bazo.
- Evaluación *in vivo* del paso de las nanopartículas a través de la BHE.

Resultados y discusión

Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de MH: HPLC y espectrofotometría UV:

Por HPLC se han puesto a punto y validado dos métodos tratando y sin tratar las muestras con ácido clorhídrico, y un método por espectrofotometría UV. Todos los métodos son lineales, exactos, precisos y selectivos; permitiendo cuantificar el MH encapsulado en las NPs, y el liberado en los estudios de cesión *in vitro*.

Desarrollo y caracterización de nanopartículas funcionalizadas con el péptido phe-phe y sin funcionalizar, cargadas con el marcador de fluorescencia (rodamina-B):

La elaboración de las nanopartículas se ha realizado mediante extracción-evaporación del solvente. La funcionalización sobre las NPs ya elaboradas se realiza por activación con NHS (N-hidroxisuccinimida)/EDC (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodimida hidroclicorato) en tampón MES pH 4,7 (2(N-morfolino)etanosulfónico) y tampón PBS pH 7,4. La funcionalización del polímero PLGA, antes de formar las NPs, se realiza mediante activación con NHS en ausencia de oxígeno. Todas las formulaciones de NPs presentan tamaños de partícula de unos 190 nm y una encapsulación suficiente del marcador fluorescente rodamina-B, como para poder evaluar su comportamiento in vivo.

Desarrollo y caracterización in vitro de nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato:

Se han preparado NPs por nanoprecipitación y extracción-evaporación del solvente, siendo esta última la más adecuada para la encapsulación del MH, y en la que la proporción óptima MH:PLGA es de 1:10. Las formulaciones de NPs presentan un tamaño medio partícula de unos 190 nm, con un perfil de cesión de MH durante al menos 9 días. La eficacia de encapsulación (EE) se ha visto influenciada por el proceso de funcionalización. Así, en la funcionalización PLGA-phe-phe, la EE aumentó del 80% al 96% (antes y después), debido probablemente a la interacción entre el MH y el dipéptido. En la funcionalización realizada sobre las NPs ya formadas, hay una pérdida del 40-50% de MH, que puede ser atribuida a la cantidad presente en la superficie de las NPs.

Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las nanopartículas en hígado, riñón, pulmón y bazo:

Se han preparado tres formulaciones de NPs para su evaluación *in vivo*: NPs sin funcionalizar, NPs funcionalizadas con phe-phe después de su elaboración y NPs elaboradas con péptido unido al polímero PLGA. Todas las formulaciones están cargadas con el marcador de fluorescencia rodamina-B. El estudio de biodistribución se realiza en ratas macho Wistar a las que se administra una dosis de 50 mg/Kg en suspensión de las NPs en la vena de la cola. El sacrificio de los animales se realiza a tiempos 1 hora y 2 horas después de la administración. Al evaluar la fluorescencia del marcador rodamina-B en los órganos, se obtiene que la funcionalización incrementa la presencia de las NPs en bazo, cuando se realiza sobre las NPs ya elaboradas. La tendencia de las formulaciones es a aumentar su presencia en los órganos a las 2 horas, a excepción del bazo, donde tiende a disminuir. En el caso de las NPs con PLGA unido a phe-phe, los niveles en bazo, aun siendo bajos, aumentan con el tiempo.

Evaluación *in vivo* del paso de las nanopartículas a través de la BHE:

Al medir la fluorescencia de la rodamina-B, tanto en cortes de cerebro por microscopía como mediante fluorimetría, se obtiene que la unión de phe-phe incrementa su paso a través de la BHE, si bien el procedimiento de funcionalización afecta de diferente manera a los perfiles de distribución cerebral del marcador.

Conclusiones

1. Los dos métodos de cuantificación de morin hidrato desarrollados por HPLC resultaron ser lineales, selectivos y precisos. El método que emplea HCl en la preparación de las muestras resultó ser más exacto y sensible, disminuyendo los límites de detección y cuantificación del flavonoide.
2. La unión del péptido phe-phe a las NPs es capaz de aumentar su paso a través de la barrera hematoencefálica, condicionando su biodistribución en otros órganos.
3. La unión del péptido phe-phe a la superficie de las NPs supone la pérdida de morin hidrato/rodamina-B en las capas superficiales de las NPs.
- 4.- La interacción del péptido phe-phe unido al polímero con los grupos aromáticos de morin hidrato/rodamina-B forma un complejo altamente lipófilo que se internaliza en el núcleo de las NPs, incrementando significativamente la eficacia de encapsulación.

SUMMARY

Introduction

Morin hydrate (MH) is a flavonoid of plant origin, which has been shown *in vitro* to have activity against neurodegeneration mechanisms associated with Alzheimer's disease (AD), avoiding hyperphosphorylation of the Tau protein, dissolving β -amyloid peptide aggregates that form senile plaques and reducing oxidative stress produced by reactive oxygen species. Its potential clinical use is very limited due to its low bioavailability, rapid liver metabolism, and poor ability to cross the blood-brain barrier (BBB).

Objective

The main objective of this doctoral thesis is to increase the ability of MH to cross the BBB, thus enhancing its potential interest in the treatment of neurodegenerative diseases; like Alzheimer's. For this, biodegradable PLGA nanoparticles (NPs) are developed and characterized, loaded with MH and functionalized with the phenylalanine-phenylalanine dipeptide, used to promote targeting to the site of action in the CNS. The functionalization is carried out, firstly, on the NPs already prepared and, secondly, on the polymer before the formation of the nanosystems. Once the NPs have been characterized *in vitro*, their *in vivo* biodistribution is studied. For the quantification of MH, methods have been developed and validated by HPLC and UV spectrophotometry.

Experimental

- Development and validation of analytical methods for the quantification of MH: HPLC and UV spectrophotometry.
- Development and characterization of non-functionalized and phe-phe functionalized nanoparticles, loaded with the fluorescence marker (rhodamine-B).
- Development and in vitro characterization of PLGA nanoparticles loaded with morin hydrate.
- In vivo evaluation of the biodistribution of nanoparticles in liver, kidney, lung and spleen.
- In vivo evaluation of the passage of nanoparticles through the BBB.

Results and discussion

Development and validation of analytical methods for the quantification of MH: HPLC and UV spectrophotometry:

Two methods have been developed and validated by HPLC treating and without treating the samples with hydrochloric acid, and one method by UV spectrophotometry. All methods are linear, exact, precise and selective; allowing to quantify the MH encapsulated within the NPs, and that released in vitro.

Development and characterization of non-functionalized phe-phe peptide functionalized nanoparticles, loaded with the fluorescence marker (rhodamine-B):

The elaboration of nanoparticles has been carried out by solvent extraction-evaporation. The functionalization on the NPs already prepared is carried out by activation with NHS (N-hydroxysuccinimide) / EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodimide hydrochloride) in MES buffer pH 4.7 (2 (N-morpholino) ethanesulfonic acid) and PBS buffer pH 7.4. The functionalization of the PLGA polymer, before forming the NPs, is carried out by activation with NHS in the absence of oxygen. All NPs formulations have particle sizes of about 190 nm and enough encapsulation of rhodamine-B to allow for evaluating their behaviour *in vivo*.

Development and in vitro characterization of PLGA nanoparticles loaded with morin hydrate:

NPs have been prepared by nanoprecipitation and solvent extraction-evaporation methods, the latter being the most suitable for encapsulation of MH, and in which the optimal MH: PLGA ratio is 1:10. All NPs formulations have mean particle sizes around 190 nm, with an MH release profile for at least 9 days. Encapsulation efficiency (EE) is influenced by the functionalization process. In PLGA-phe-phe functionalization, EE increased from 80% to 96% (before and after), probably due to the interaction between MH and the dipeptide. In the functionalization carried out on the NPs already formed, there is a loss of 40-50% of MH, which can be attributed to the amount present on the surface of the NPs.

In vivo evaluation of the biodistribution of nanoparticles in liver, kidney, lung and spleen:

Three NPs formulations have been prepared for in vivo evaluation: non-functionalized NPs, phe-phe functionalized NPs after processing, and NPs made with peptide bound to the PLGA polymer. All formulations are loaded with the fluorescence marker rhodamine-B. The biodistribution study is carried out in male Wistar rats to which a dose of 50 mg/Kg in suspension of the NPs is administered in the tail vein. The animals are sacrificed at times 1 hour and 2 hours after the administration. When evaluating the fluorescence of the marker rhodamine-B in the organs, it is found that functionalization increases the presence of the NPs in spleen, when performed on the NPs already formed. The tendency of the formulations is to increase its presence in the organs at 2 hours, with the exception of the spleen, where it tends to decrease. In the case of NPs with PLGA bound to phe-phe, the levels in the spleen, although low, increase with time.

In vivo evaluation of the passage of nanoparticles through the BBB:

The fluorescence of rhodamine-B is measured in brain sections by microscopy and fluorimetry- It is obtained that the binding of phe-phe increases its passage through the BBB, although the functionalization procedure affects differently the cerebral distribution profiles of the fluorescence marker.

Conclusions

1. The two methods of quantification of morin hydrate by HPLC are linear, selective and precise. Treatment of samples with HCl lowers the limits of detection and quantification and increase the accuracy. The quantification method by UV spectrophotometry is linear, exact, selective and precise.
2. Binding of the phe-phe peptide to NPs is able of increasing its passage through the blood-brain barrier, conditioning its biodistribution in other organs.
3. Binding of the phe-phe peptide to the surface of the NPs leads the loss of morin hydrate/rhodamine-B in the surface layers of the NPs.
4. The interaction of phe-phe peptide bound to the polymer with the aromatic groups of morin hydrate/rhodamine-B forms a highly lipophilic complex that is internalized in the nucleus of the NPs, significantly increasing the encapsulation efficiency.

I- INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La OMS define las demencias como “un síndrome, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, que se caracteriza por un deterioro de la función cognitiva más allá de lo que podría considerarse consecuencia de un envejecimiento normal” (OMS, 2013). En 1908, Alois Alzheimer identificó una serie de afecciones en el tejido cerebral de sus pacientes que le permitieron describir lo que hoy conocemos como Enfermedad de Alzheimer (EA).

La EA es hoy en día la patología neurodegenerativa más común (OMS, 2013). Representa entre el 50 y el 75% de los casos de demencia en el mundo (Niu, et al., 2017; Alzheimer’s Association, 2019), ya que afecta a más de 50 millones de personas sólo en 2019 (Alzheimer’s Association, 2019). La incidencia de esta enfermedad se duplica cada 5 años a partir de los 65 años y se estima que más del 30% de las personas mayores de 85 años la padecen.

La gradual pérdida de neuronas asociada a esta enfermedad supone una progresiva reducción de la calidad de vida para el paciente y su familia. Debido al deterioro de las áreas cognitivas del cerebro, responsables del aprendizaje y la memoria, el paciente experimenta dificultades a la hora de expresarse, organizar sus pensamientos o recordar eventos de su vida diaria. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes van requiriendo cada vez de más ayuda, incluso en las tareas más sencillas, como pueden ser atarse los cordones, vestirse, o ya en las últimas etapas, comer. Debido a este fenómeno de dependencia que llega a ser completa, esta enfermedad supone un importante impacto económico y social. A menudo

a las familias les supone un gran esfuerzo verse obligadas a requerir de ayudas externas para poder ocuparse de un pariente que padece la enfermedad y poder pagar, al mismo tiempo, los costes de una medicación crónica. A todo ello hay que sumarle el nada despreciable impacto emocional que genera el deterioro cognitivo de un ser querido.

1.1. Anatomía patológica

Actualmente la EA se considera una enfermedad multifactorial y, si bien sus causas no están del todo esclarecidas, su desarrollo sí parece tener una serie de factores comunes (Varma, et al., 2018). Entre las características propias de esta patología neurodegenerativa podemos destacar la acumulación de péptido β -amiloide ($A\beta$) en el medio extracelular, la formación de ovillos de proteína Tau (p-Tau) en el citoplasma celular, el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la presencia neuroinflamación (O'Brien y Wong, 2011).

- Acumulación de placas de péptido $A\beta$

La hipótesis amiloide sugiere que el proceso de neurodegeneración se produce debido a la acumulación del péptido β -amiloide, que es insoluble en el medio extracelular. Este péptido procede del metabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP), presente en la membrana de la célula.

APP presenta dos vías de metabolización: la vía no amiloidogénica, en la cual interviene una α -secretasa y da lugar a α -amiloide ($A\alpha$) que es interiorizado y degradado por la propia célula y la vía amiloidogénica, en la cual intervienen

BACE-1 (*β -site-APP-cleaving enzyme-1*), una β y una γ -secretasa, en la cual se genera $A\beta$ (Folch, 2015) (figura 1.1).

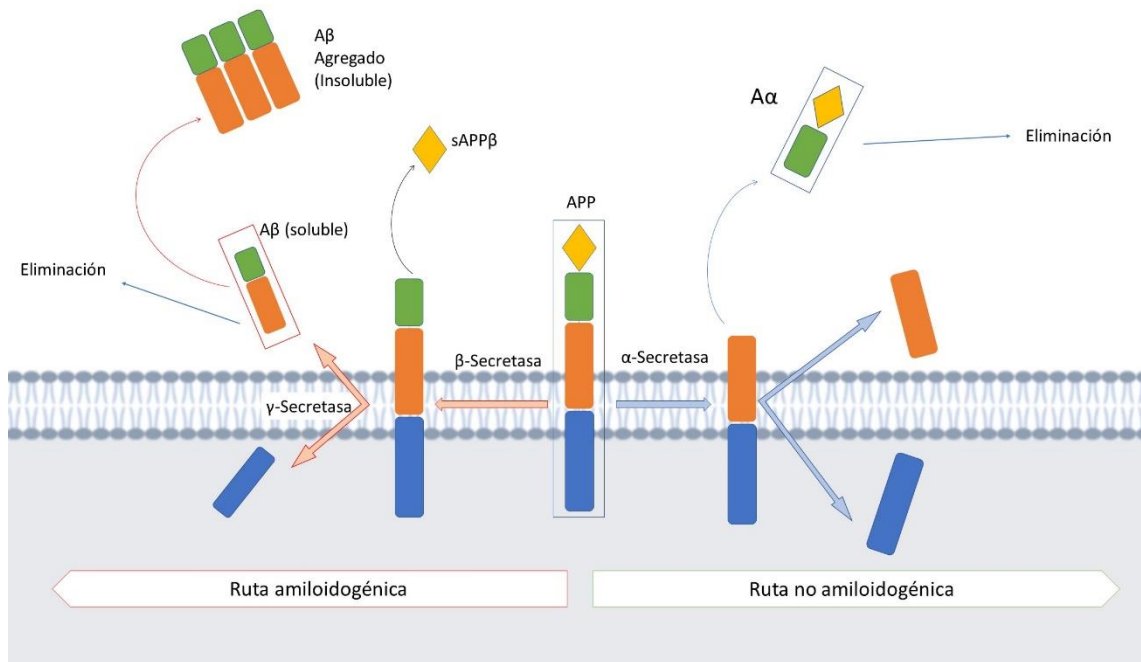


Figura 1.1. Rutas de degradación de APP y formación de $A\beta$.

En condiciones fisiológicas, el metabolismo se produce principalmente por la α -secretasa, mientras que la producción de $A\beta$ se encuentra muy disminuida. $A\beta$ es un fragmento soluble y puede ser retirado por los astrocitos (O'Brien y Wong, 2011; Rajsekhar, et al., 2015). El problema surge cuando durante la EA, BACE-1 se encuentra sobreestimulada así, el proceso se desplaza hacia la formación de $A\beta$. Grandes concentraciones de este péptido amiloide dan lugar a agregados insolubles, que originan las conocidas como "placas seniles", responsables del daño y muerte celular de las neuronas colindantes (Rajsekhar, et al., 2015).

- **Ovillos neurofibrilares de proteína Tau**

La p-Tau es, en ausencia de patología, una proteína que contribuye al normal mantenimiento de la estructura de las neuronas. No obstante, durante la EA se produce un incremento en la actividad de la glicógeno-sintasa quinasa 3β (GSK3 β) y la calmodulin-quinasa II (CAMKII), que introducen gran número de grupos fosfato en los residuos de serina de la proteína p-Tau (Ebrahipour, et al., 2018; Varma, et al., 2018). Esta hiperfosforilación de la proteína genera un cambio en su conformación hacia una β -hélice insoluble (Tang, et al., 2013; Fitzpatrick, et al., 2017). La acumulación en el citoplasma de fibras de p-Tau insoluble altera y daña la membrana celular; se produce así la activación en la neurona una vía apoptótica (Varma, et al., 2018).

- **Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La presencia de precipitados de proteína p-Tau en el citosol produce al mismo tiempo una disfunción en las mitocondrias y altera la cadena de transporte de electrones, por ello incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en el medio intracelular (Chen y Zhong, 2014). El crecimiento intracelular de ROS aumenta a su vez la actividad de la BACE-1 y de GSK3 β , así los niveles de A β y p-Tau se incrementan también. Esto, unido a la peroxidación de los fosfolípidos de las membranas celulares, consecuencia de la presencia de ROS, produce un mayor daño en la mitocondria y se genera un bucle positivo en la formación de especies reactivas (Tönnies, et al., 2017) (figura 1.2). Este ciclo de acumulación de ROS

termina por producir daño en el ADN celular e induce la apoptosis celular por la vía de la caspasa-3 (Tavakkoli, et al., 2019).

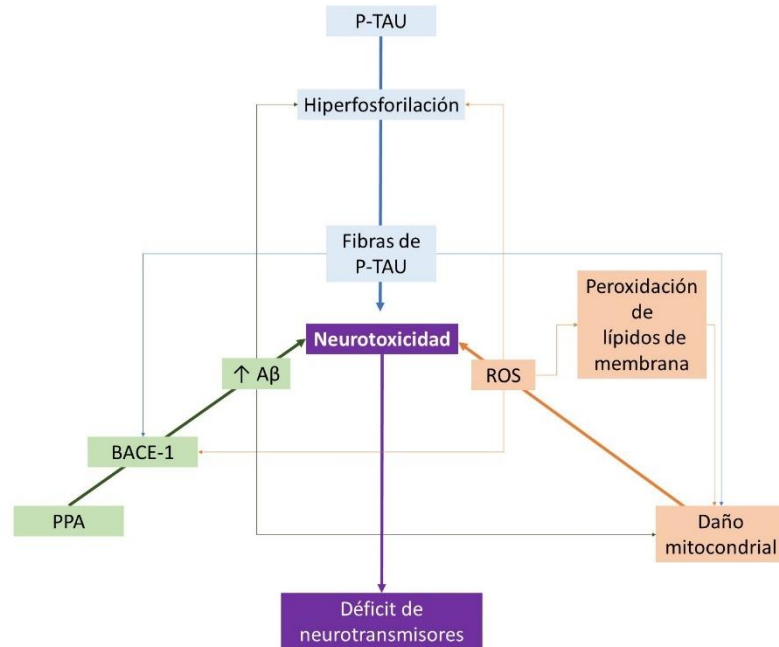


Figura 1.2: Esquema de distintas rutas que llevan a la muerte neuronal en el Alzheimer.

- Neuroinflamación

La neuroinflamación es una respuesta en el SNC caracterizada por la acumulación de células de la glía, evento que aparenta tener gran importancia durante la EA. Tradicionalmente, el cerebro se ha considerado como un órgano con “privilegios inmunes”, es decir, debido a la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE) el cerebro parecía estar aislado de una respuesta inmune convencional (Carson, et al., 2006). No obstante, en la década de 1990 se observó que los fármacos antiinflamatorios podían tener un efecto protector frente a la progresión de la EA (McGeer, et al., 1996).

Como se ha podido ver, ninguno de los procesos destacados en la EA sucede de manera aislada, sino que todos ellos se ven entrelazados y son a la vez causa y consecuencia de los demás (figura 1.2).

1.2. Diagnóstico de la EA

La EA se caracteriza por ser un proceso que, en general, tiene una progresión bastante lenta y pueden pasar años hasta que se manifiestan los primeros síntomas. Esto se debe a que al principio del proceso el cerebro es capaz de suplir la pérdida de algunas de sus neuronas mediante la actividad de las supervivientes. Este dato, que aparenta ser positivo, tiene sin embargo un lado muy negativo: cuando los síntomas de la EA son evidentes el daño cerebral es ya muy avanzado.

Actualmente el diagnóstico de la EA se basa principalmente en la aplicación de criterios clínicos, ya que hasta la fecha no se han establecido marcadores biológicos que permitan su identificación con la fiabilidad y especificidad necesarias (Valls-Pedret, et al., 2010). Esto conlleva dos importantes problemas: el primero, la enfermedad no se puede diagnosticar hasta la aparición de los primeros síntomas, de modo que se presenta un periodo subclínico durante el cual el paciente permanece sin tratamiento; y el segundo, la posibilidad de diagnosticar erróneamente otro tipo de demencia u afección que se corresponda con los síntomas iniciales de la EA (Valls-Pedret, et al., 2010).

1.3. Tratamiento de la EA

La EA carece hoy de un tratamiento eficaz que permita su curación, razón por la cual los que se emplean están orientados a reducir su progresión, disminuir sus síntomas y mantener en lo posible la calidad de vida los pacientes. El tratamiento de la EA puede abarcar desde una terapia de rehabilitación y fisioterapia hasta un tratamiento farmacológico. Dada la temática de esta memoria, abordaremos los tratamientos farmacológicos más habituales.

- **Inhibidores de la acetilcolinesterasa**

Los inhibidores de la colinesterasa son en la actualidad los agentes terapéuticos más utilizados en el tratamiento sintomático de la enfermedad. La acetilcolina es sintetizada en las neuronas presinápticas a partir de sus precursores; colina y acetil-coenzima A que, por acción del enzima acetilcolinesterasa, dan lugar a la acetilcolina. Durante la EA la disfunción neuronal, al igual que la reducción del número de estas células, da lugar a una disminución de este neurotransmisor (NT), ello origina gran parte de los síntomas asociados a la enfermedad.

El uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa busca aumentar los niveles sinápticos de este NT, al disminuir su eliminación mediante la acetilcolinesterasa y la butilcolinesterasa.

Este tipo de terapia, si bien obtiene unos buenos resultados iniciales, presenta dos problemas de gran importancia: en primer lugar, se produce un fenómeno de tolerancia y requiere un incremento progresivo de la dosis. En segundo lugar, presenta un elevado índice de

abandono, ya que son muy numerosos los efectos adversos que ocasiona su administración crónica, principalmente efectos extrapiramidales (Sicras, et al., 2004).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa están principalmente indicados para los primeros estadios de la EA, cuando su actividad permite la reducción de los síntomas. A medida que el daño neuronal progresa, los beneficios de este tipo de terapia se van reduciendo. A este grupo de fármacos pertenecen la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina.

Tacrina

Tacrina es un inhibidor de la colinesterasa a nivel del SNC capaz de actuar como agonista colinérgico indirecto al incrementar, también, la producción de acetilcolina. Fue el primer inhibidor de la colinesterasa aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, bajo el nombre comercial COGNEX[®] (Jarrot, 2017). Aunque presenta cierta selectividad por la colinesterasa a nivel central, este fármaco también inhibe la butilcolinesterasa y da lugar a bastantes efectos adversos.

El clorhidrato de tacrina sufre en el organismo un importante efecto de primer paso después de su administración lo que supone una biodisponibilidad del 5-30%, que aumenta de forma lineal con la dosis. Su semivida de eliminación oscila de 1,5 a 4 horas, y se metaboliza por la enzima CYP1A2 del citocromo P-450 (Samuels y Davis, 1997).

Junto con sus efectos adversos, el principal inconveniente de este fármaco ha resultado ser su toxicidad hepática y la sospecha de poder resultar carcinogénico. Aunque no hay muertes registradas por daño

hepático asociado a tacrina, sí se ha observado que incrementa los niveles de enzimas hepáticas entre un 60 a un 90% en tratamientos prolongados. De hecho, la biopsia del hígado de un paciente de 76 años sin antecedentes de hepatitis B o C en tratamiento de 8 semanas con este fármaco mostró hepatitis lobular (Samuels y Davies, 1997).

Actualmente la tacrina está aprobada para su uso por la FDA, pero no se comercializa en España.

Donepezilo

Es un derivado de piperidina que actúa como inhibidor reversible de la colinesterasa. A diferencia de otros inhibidores, donepezilo actúa principalmente sobre la colinesterasa presente en el SNC y su afinidad es 1.000 veces más potente por esta enzima que por la butilcolinesterasa, que está presente en el sistema nervioso periférico. A diferencia de lo que ocurre con la tacrina, el donepezilo no presenta toxicidad hepática. Este fármaco ha demostrado la misma eficacia clínica que otros inhibidores de la colinesterasa y no es capaz de frenar el avance de la enfermedad, aunque sí retrasa la progresión de sus síntomas (LiverTox, 2012).

La absorción oral del donepezilo permite alcanzar los niveles plasmáticos máximos a las 3-4 horas de su administración (Rogers y Friedhoff, 1998). En su distribución circula unida en un 95% a proteínas plasmáticas, y presenta una semivida plasmática de eliminación prolongada, de unas 70 horas. Se excreta en parte inalterado en orina y también metabolizado por el citocromo P-450 (Tiseo, et al. 1998).

La toxicidad del donepezilo se encuentra principalmente asociada a la sobredosificación y da lugar a crisis colinérgicas que cursan con náuseas violentas, vómitos, salivación, sudores, bradicardia, hipotensión, insuficiencia respiratoria, convulsiones y colapso.

Rivastigmina:

La rivastigmina es un carbamato con actividad inhibitoria de la colinesterasa.

Desde su introducción al uso clínico se ha notificado al menos un caso clínicamente relevante de daño hepático con ictericia leve. Por ello se ha establecido que es un fármaco con potencial de causar daños en el hígado. En la actualidad se desconoce el mecanismo por el cual se produce el daño hepático: se ha descartado la posibilidad de que se deba a un incremento en la actividad metabólica y podría estar relacionado con causas inmunes (LiverTox, 2012).

Galantamina:

La galantamina es un alcaloide que actúa como inhibidor selectivo y reversible de la colinesterasa y, además, como agonista indirecto al estimular la acción de la acetilcolina sobre los receptores nicotínicos, al unirse a un lugar alostérico.

La absorción de la galantamina es relativamente rápida pues permite alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas pasada una hora de su administración oral, con una biodisponibilidad del 88,6%. Su semivida es de 7-8 horas y se metaboliza en un porcentaje elevado

(alrededor del 75%) por el CYP2D6 del citocromo P-450; otra parte se excreta inalterada por orina.

En pacientes con insuficiencia hepática moderada y grave su semivida plasmática de eliminación se ve incrementada significativamente. Puede presentar toxicidad hepática, que en ocasiones conduce a hepatitis, al igual que se puede observar un incremento en las enzimas hepáticas (LiverTox, 2012).

▪ **Memantina**

La memantina es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), con afinidad moderada. Su actividad se centra en modular el efecto causado por el incremento de los niveles de glutamato durante la patología, responsables de causar disfunción neuronal.

Es un fármaco que está indicado para el tratamiento de la enfermedad en sus fases moderadas y avanzadas. Los efectos adversos de la memantina son poco frecuentes y de carácter leve; entre los que se incluyen confusión, mareos, dolor de cabeza y fatiga (Tariot, et al., 2004).

La biodisponibilidad oral de la memantina es prácticamente del 100% y alcanza las concentraciones plasmáticas máximas entre las 3-8 horas. La semivida de eliminación de este fármaco oscila entre las 60-100 horas y es excretada prácticamente en su totalidad por vía renal de forma inalterada.

Está descrito al menos un caso de hepatotoxicidad clínicamente relevante. En él, un paciente en tratamiento con memantina durante 3

semanas sufrió una hepatitis colestásica aguda de gravedad moderada. La afección hepática revertió rápidamente al suspender el tratamiento. Dado que no hubo indicios de afectación inmune y que el fármaco no presenta prácticamente metabolismo hepático, se desconocen las causas del daño en este órgano (LiverTox, 2012).

▪ **Antiinflamatorios**

Tras aceptarse la posibilidad de que el sistema inmune (SI) tenga un importante papel mediador en el desarrollo de la EA, hay cada vez más estudios en los que se propone el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para disminuir la neuroinflamación durante la patología y también, para disminuir el riesgo de padecer la enfermedad (Deardorff, et al., 2017). Se ha postulado también que ciertos AINEs son capaces de reducir la producción del péptido A β y consigue disminuir la formación de las placas seniles (Prade, et al., 2015). No obstante, estudios realizados con metaanálisis no mostraron mejoras significativas entre los pacientes tratados con AINES (ácido acetilsalicílico y otros) y los pacientes que recibieron un placebo (Jaturapatporn, et al., 2012).

▪ **Neuroprotectores**

Actualmente el tratamiento con neuroprotectores, el cual busca reducir la progresión de la enfermedad al disminuir la muerte neuronal, es uno de los objetivos diana en la investigación para la EA. Está orientado principalmente a buscar moléculas con actividad contra la producción del péptido A β , antioxidantes que puedan reducir el estrés oxidativo en las neuronas o disminuir la hiperfosforilación de p-Tau; de forma que aumenta la supervivencia neuronal.

2. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

El sistema nervioso central lo componen algunos los órganos más importantes del cuerpo humano, pero también de los más delicados y sensibles a los xenobióticos. Pequeños cambios en las concentraciones de iones Na^+ , K^+ o aminoácidos, pueden impedir el correcto funcionamiento de las neuronas. Es por ello que el organismo ha desarrollado una serie de barreras que impiden el acceso de sustancias potencialmente dañinas a estos tejidos y el paso de organismos patógenos. Estas barreras únicamente permiten el acceso de los nutrientes esenciales en las cantidades necesarias para el funcionamiento del sistema. La barrera hematoencefálica y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR) son las estructuras que se encargan del mantenimiento de la homeostasis en el SNC y presentan distintos grados de permeabilidad; la BHE es la más restrictiva y la que presenta una mayor superficie (Cipolla, 2009).

La principal característica de la BHE, su selectividad al paso de sustancias, es responsable de la dificultad y baja eficacia del tratamiento de las patologías del SNC (Bhowmik, et al., 2017), ya sean procesos neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, otras tautopatías), oncológicos o infecciosos.

2.1. Componentes de la BHE

Las principales funciones de la BHE son el mantenimiento de la homeostasis en el SNC y la prevención del acceso de sustancias tóxicas para el mismo (Farokhzad y Langer, 2006). Para entender cómo se realizan estas funciones, se debe prestar atención a los componentes que constituyen la BHE. En los capilares cerebrales (figura 1.3) se puede encontrar una capa de células endoteliales rodeada de una membrana basal con pericitos; además, la presencia de astrocitos que recubren aproximadamente el 99% de su superficie, la existencia de células de la microglía y algunas terminaciones neuronales (Helms, et al., 2016).

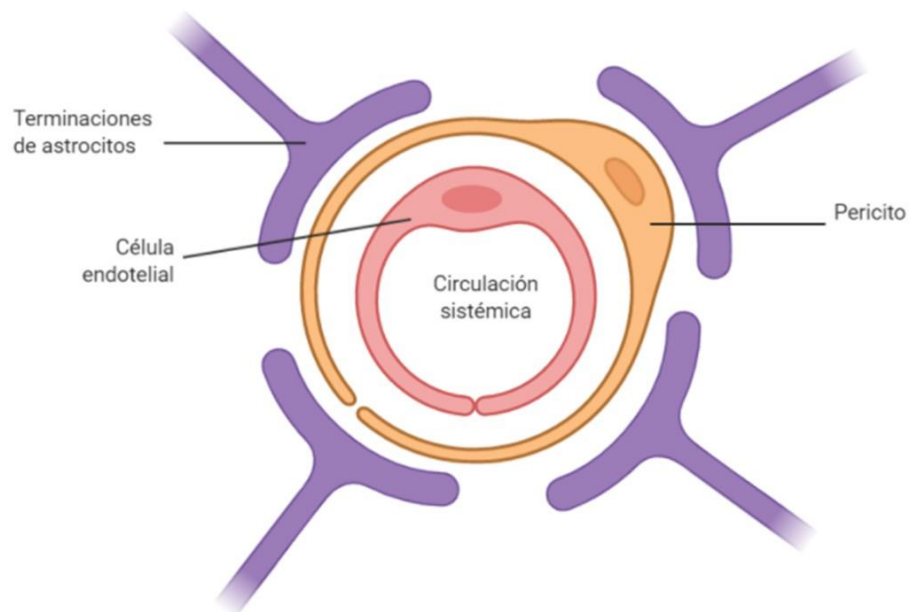


Figura 1.3: Esquema de un capilar cerebral

2.1.1. Células endoteliales

Las endoteliales son las células que componen la primera capa de la BHE y están en contacto directo con la circulación sistémica. A diferencia de las células endoteliales del resto de capilares del organismo, éstas presentan un mayor contenido mitocondrial, ausencia de fenestraciones y una actividad pinocítica mínima (Takakura et al., 1991; Oldendorf et al., 1977), aunque la principal diferencia respecto a otros capilares es que estas células se encuentran íntimamente unidas por la presencia de uniones adherentes (AJs), uniones estrechas (TJs) y uniones Gap (GJs) (Huber, et al., 2001). Las TJs están formadas por múltiples proteínas de adhesión transmembrana, dispuestas en paralelo, en forma de múltiples barreras. (Abbott, et al., 2010). Se pueden encontrar ocludinas y claudinas, proteínas tipo IgG, JAMs (*Junctional adhesion molecules*), entre otras, y es la Claudina-5 el componente mayoritario en la TJs (Martín-Padura, et al., 1998) Las TJs son las que tienen mayor importancia de cara a limitar el paso de sustancias entre las células endoteliales (transporte paracelular), al formar uniones fuertes proteína-proteína con las células adyacentes. Estas uniones generan un gran impedimento al paso de sustancias por tamaño y polaridad y una alta resistencia eléctrica, que restringe el paso libre de iones y moléculas cargadas (Butt, et al., 1990; Abbot, et al., 2006). Por su parte, las AJs presentan una organización similar a las TJs pero se encuentran formadas principalmente por proteínas transmembrana Ca^{2+} dependientes, las Cadherinas, que establecen uniones célula-célula por medio de interacciones homotrópicas (Bazzoni y Dejana, 2004). El último tipo de uniones entre células endoteliales son las GJs, que están formadas por proteínas de la familia de las conexinas. Estas GJs están implicadas en la

comunicación entre células adyacentes y permiten el paso de iones (Langrée, et al., 2003).

- **Pericitos**

Los pericitos son células contráctiles de tejido conectivo, planas y no diferenciadas. No está totalmente esclarecido, pero se postula que su función en la BHE es la de ayudar a regular la proliferación y supervivencia de las células endoteliales (Lai y Kuo, 2005). Se ha observado que en condiciones de hipoxia o trauma cerebral los pericitos migran de su posición natural en la BHE (Gonul, et al., 2002; Dore-Duffy, et al., 2000), lo que puede estar relacionado con el aumento de la permeabilidad de la BHE en estas situaciones.

- **Astrocitos**

Los astrocitos son el tipo de célula más abundante en el SNC pues componen la mayor parte de la sustancia gris. Además, presentan morfología distinta en función de su localización en el SNC (Abbot, et al., 2006). En la BHE, los astrocitos recubren cerca del 99% la superficie luminal de las células endoteliales (Helms, et al., 2016). En la superficie de estas células se encuentran distintos transportadores, como la glicoproteína P (gp-P) que les permite secuestrar sustancias potencialmente dañinas, que pudiesen haber atravesado la capa de células endoteliales (Ronaldson y Davis, 2012). También pueden disminuir la concentración de neurotransmisores u otras sustancias producidas en el SNC que, en altas concentraciones, pudiesen suponer un riesgo para el mismo, como puede ser el caso del glutamato. Los astrocitos expresan en su membrana transportadores de glutamato EAAT1 y EAAT2 que permiten secuestrar este

aminoácido (aa) si se encuentra en exceso, lo que previene que cause excito-toxicidad en el tejido nervioso (Yi y Hazell, 2006).

- **Microglía**

Las células de la microglía son las células inmunitarias encargadas de la respuesta inmune primaria en el SNC. Se encuentran distribuidas por todo el tejido y se activan en respuesta a traumatismos, inflamaciones sistémicas y distintas patologías del SNC. La activación de estas células, en respuesta a una situación de estrés, altera su morfología y adoptan un aspecto ameboide con ramificaciones (Kattenmann, et al., 2011). Esta activación genera una respuesta por parte de las células de la microglía en la que se liberan gran cantidad de mediadores proinflamatorios, como TNF- α y distintas interleuquinas (Ronaldson y Davis, 2012). Estos mediadores pueden a su vez generar daño celular y muerte neuronal y por ello se asocian a la neuroinflamación en distintas patologías como la EA (Labus, et al., 2014).

2.2. Transporte a través de la barrera

La BHE supone un impedimento excelente al paso de sustancias al SNC aunque, debido a su elevada demanda metabólica, ya que consume alrededor del 20% de las necesidades de oxígeno del organismo (Rolfe y Brown, 1997), debe incorporar mecanismos selectivos que permitan el acceso de los nutrientes esenciales.

Las células endoteliales de la BHE, a diferencia de las periféricas presentan un elevado número de uniones estrechas, escaso transporte por pinocitosis o vesículas y muchas menos fenestraciones. El transporte de

sustancias desde el torrente sanguíneo al tejido cerebral depende principalmente del tamaño de la molécula, su liposolubilidad, carga eléctrica o la presencia de transportadores específicos (Moody, 2006). A diferencia de lo que ocurre en la circulación periférica, las características uniones entre las células endoteliales de la BHE dificultan enormemente el paso de sustancias hidrofílicas a través de los espacios intercelulares. Por ello, tradicionalmente se ha empleado el coeficiente de reparto octanol/agua para predecir el comportamiento de una sustancia frente a la BHE. Por ejemplo, la dihidramina, con un elevado coeficiente de reparto, pasa fácilmente la barrera, mientras que la loratadina, con un coeficiente bajo, prácticamente no accede al SNC (Kay, 2000). No obstante, a medida que se ha avanzado en el estudio de la BHE, se ha podido observar que esta aproximación es inexacta, ya que no se ha tenido en cuenta la presencia de transportadores específicos y bombas de eliminación.

Así podemos diferenciar distintos mecanismos de paso a través de la BHE (Figura 1.4): transporte paracelular, difusión pasiva, transporte a través de proteínas transmembrana o canales de transporte, transcitosis, y transcitosis mediada por receptores o a través de bombas de eliminación.

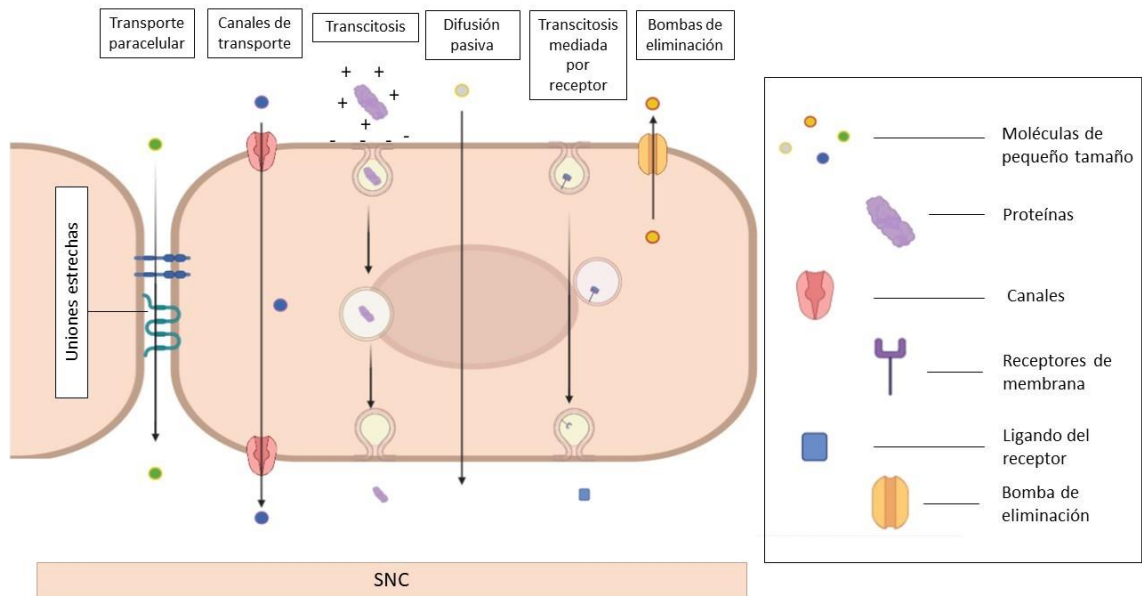


Figura 1.4: Resumen de los tipos de transporte a través de la BHE.

2.2.1. Transporte paracelular

Esta vía de paso implica el acceso al líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de los espacios entre células epiteliales de la BHE. Como ya se ha comentado, esta barrera se caracteriza por presentar espacios intercelulares muy reducidos, y la presencia de TJs en ellos le confiere una elevada resistencia eléctrica al paso de moléculas cargadas, e impide el acceso a moléculas de gran tamaño (Butt, et al., 1990). Por ello, esta vía la pueden emplear sólo sustancias de muy bajo peso molecular y elevada liposolubilidad.

2.2.2. Transporte transcelular

- **Transporte por difusión pasiva**

El acceso al SNC por difusión pasiva está casi exclusivamente reservado a gases, como O₂ o CO₂, que son capaces de atravesar la membrana celular por simple diferencia de gradientes, o a fármacos muy específicos, como la morfina (Abbott et al., 2010; De Gragori, et al., 2012).

- **Transportadores específicos**

La mayor parte de las moléculas cargadas, de tamaño elevado o hidrofílicas que son capaces de alcanzar el tejido cerebral, emplean proteínas transmembrana específicas para lograrlo. Es el caso de la glucosa, que emplea el canal GLUT-1, ya que su elevada hidrofilia y tamaño impiden que pueda acceder de cualquier otra forma, pese a su elevada demanda por parte del SNC (Persidsky et al., 2006). Otros elementos esenciales emplean también canales similares. Así, aminoácidos como la fenilalanina, la tirosina o la isoleucina emplean el transportador de aminoácidos largos de tipo 1 (LAT-1) para atravesar la BHE. Los aminoácidos ácidos, como el ácido glutámico o el aspártico, así como los precursores de ácidos nucleicos, emplean canales diferentes, menos expresados. Los aminoácidos neutros de pequeño tamaño utilizan canales en el polo abluminal de estas células que solamente permiten la circulación de salida.

- GLUT-1

La glucosa es esencial para el correcto funcionamiento de las neuronas, ya que es casi su única forma de obtener energía. En el tejido cerebral se pueden encontrar al menos 3 isoformas del canal de transporte de glucosa, GLUT: GLUT-5, presente en la microglía; GLUT-3, expresado en las neuronas; y GLUT-1, muy expresado en las células epiteliales de la BHE (Mooradian et al., 1997). GLUT-1 es una proteína codificada por el gen SLC2A1, con 12 segmentos α -hélice transmembrana, agrupadas para formar un canal polar a través del cual puede difundir la glucosa.

Durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, se ha podido observar que la expresión de estos transportadores se reduce significativamente (Mooradian et al., 1997; Keaney y Campbell, 2015). Esto parece estar relacionado también con una disminución en el aclaramiento de A β en el SNC (Keaney y Campbell, 2015).

- LAT-1

El transportador de aminoácidos de tipo 1, es un complejo proteico transmembrana que consta de dos subunidades: una cadena ligera (SLC7A5) y una cadena pesada CD98. Se trata de un transportador independiente de Na^+ y pH, el cual permite el paso de L-aminoácidos grandes, neutros, aromáticos o ramificados (leucina, fenilalanina, isoleucina, triptófano, tirosina, metionina o histidina) de la circulación sistémica al SNC a través de la BHE. Este canal no sólo es capaz de permitir el paso de estos aminoácidos, sino también de fármacos como la L-DOPA o la gabapentina (Huttunen, et al., 2019).

Este transportador se expresa tanto en la superficie luminal como abluminal de las células epiteliales de la BHE y en las células que componen su segunda capa (astrocitos, células de la glía y neuronas primarias) (Huttunen, et al., 2019; Boado, et al., 1999). Dado que esta proteína, a diferencia de otros transportadores, no ve reducida su expresión como consecuencia de los procesos inflamatorios en la EA e incluso se puede ver sobreexpresada en otras patologías, como algunos tumores, resulta una diana atractiva para conseguir que distintos profármacos puedan, no sólo atravesar la BHE, sino también acceder al interior de las células cerebrales o emplearse para facilitar la llegada de nanosistemas al SNC (Ong, et al., 2017; Gynther, et al., 2019).

- **Transcitosis y transcitosis mediada por receptores**

Son vías reservadas a aquellas moléculas de mayor tamaño imprescindibles para el correcto funcionamiento de las neuronas, como pueden ser la insulina, la transferrina, el colesterol y algunas proteínas sanguíneas (Fu, 2018). Su mecanismo se puede emplear tanto como medio de ingreso al SNC o como sistema de expulsión de este. La transcitosis no mediada por receptores o transcitosis por adsorción se produce cuando una proteína de carga positiva se adhiere a la superficie de la célula epitelial (con carga negativa). A continuación, se produce la invaginación de esta membrana y el proceso de transcitosis. La transcitosis mediada por receptores es un proceso similar pero que involucra la unión previa de la sustancia a un receptor específico: la figura 1.5 esquematiza el proceso. El inicio se produce cuando un ligando proteico o una molécula vectorizada se une a un receptor específico de la membrana apical de las células epiteliales de la barrera (figura 1.5-1). Como consecuencia de esta unión se produce

una invaginación de la membrana (figura 1.5-2), que forma una vesícula y completa el mecanismo de endocitosis. Esta vesícula con el complejo ligando-receptor en su interior puede dirigirse hacia distintos destinos: en algunos casos la vesícula se reincorpora a la membrana apical, el ligando se expulsa así de nuevo a circulación sistémica (figura 1.5-3). En otros casos, la vesícula será transportada a la membrana basolateral de forma que permite el acceso del ligando al SNC, proceso conocido como transcitosis (figura 1.5-4). La última posibilidad radica en la migración de la vesícula al lisosoma, donde su contenido será degradado por la célula (figura 1.5-5). (Lajoie y Shusta, 2015; Tashima, 2020). Actualmente esta es una prometedora vía de vectorización de fármacos al SNC, bien sea mediante moléculas como la transferrina o al emplear anticuerpos anti-RTf (receptor de transferrina) para mejorar este proceso de transcitosis (Lajoie y Shusta, 2015).

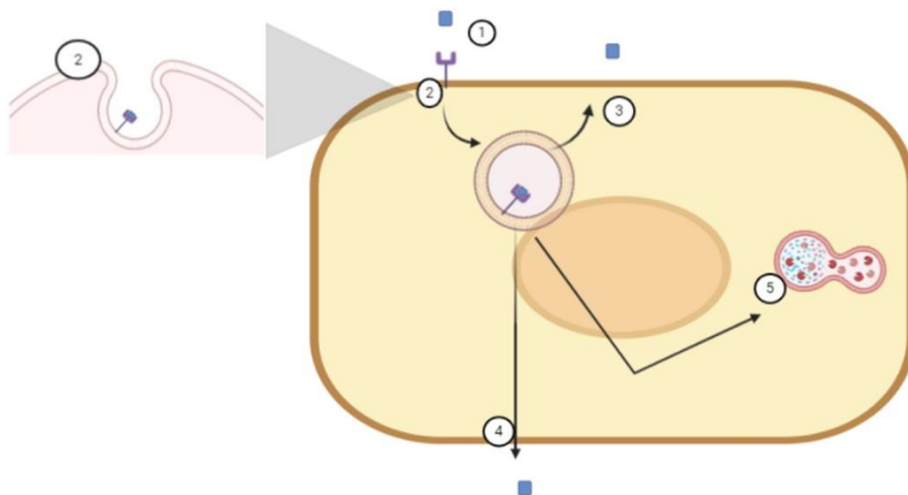


Figura 1.5: Esquema del proceso de transcitosis mediada por receptores

Los receptores más importantes que median esta vía son el receptor de transferrina, el receptor de insulina y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL):

Receptor de transferrina (RTf)

El receptor de transferrina fue uno de los primeros receptores estudiados para la vectorización a través de la BHE. Se trata de un receptor expresado ampliamente en la superficie de las células epiteliales de la barrera y su función es la de modular el acceso de los iones de hierro al cerebro, al unirse a la proteína de transporte de hierro, transferrina (Tf) (Moos y Morgan, 2000).

Actualmente es una de las dianas más empleadas para la vectorización de fármacos y nanosistemas al tejido cerebral. Un estudio realizado por Sharma, emplea liposomas pegilados con un péptido de transferrina y poly-L-arginina unido como ligando para este receptor; consiguió incrementar el acceso de estos sistemas al SNC (Sharma et al., 2013). No obstante, se ha podido observar que en contra de lo que se podría pensar, la Tf no es un ligando óptimo para este receptor. Esto se debe a que esta proteína se encuentra en altas cantidades en la circulación sistémica y sólo accede al tejido cerebral la cantidad necesaria, por ello su afinidad por su receptor es baja. Para suplir este inconveniente, actualmente los ligandos por elección para la vectorización a este receptor son los anticuerpos anti-RTf, ya que resultan mucho más específicos y con alta afinidad por la diana. Un ejemplo de estos estudios son los realizados por Ulbrich, que emplea nanopartículas de albumina con anticuerpos monoclonales anti-RTf (OX26 y R17217) (Ulbrich, et al. 2009).

Receptor de insulina (RI)

El receptor de insulina de la BHE es el encargado de permitir la llegada de esta hormona hasta el tejido cerebral. El transporte de la insulina hasta el SNC se lleva estudiando desde mediados del siglo pasado. Y, a pesar de ser un receptor similar al RTf, no se trata de una buena diana de vectorización por dos razones principalmente: la insulina no es un buen ligando, ya que su administración puede dar lugar a una situación de hipoglucemia (Lajoie y Shusta, 2015) y a que es un receptor cuya actividad es saturable (Rhea, et al., 2018). A pesar de esto hay diversos estudios que han empleado ligandos, principalmente anticuerpos, de este receptor para vectorizar distintos sistemas a través de la BHE (Lajoie y Shusta, 2015).

Bombas de eliminación:

Desde que la BHE es objeto de estudio, se ha podido comprobar cómo sustancias que, por su pequeño tamaño y elevado coeficiente de reparto octanol/agua deberían ser capaces de atravesarla sin problemas, en la práctica apenas lo hacen. Este fenómeno hoy en día se asocia a ciertas proteínas que actúan como bombas de eliminación. El caso más representativo y relevante desde un punto de vista terapéutico es el de la gp-P. Esta proteína se expresa en varios tejidos del organismo, como puede ser el hígado, el páncreas, los túbulos proximales del riñón, la placenta (Juliano y Ling, 1976), así como en las células endoteliales y astrocitos de la BHE (Schinkel et al., 1996). Es una proteína transmembrana de la superfamilia de las ABC (ATP-binding cassette), que presenta una longitud de 1280 aa, distribuidos en dos secciones homólogas de 6 dominios transmembrana cada una, formado entre ellas un canal. La función de la gp-P en el SNC es de protección frente a sustancias potencialmente

neurotóxicas, ya que actúa como bomba de salida y expulsa dichas sustancias del SNC (Gottesman, et al., 1955).

A consecuencia de esta actividad se han descrito numerosos inhibidores de esta proteína (Boesch, et al., 1991; de Gooijer, et al., 2018), con los que se logra aumentar la permeabilidad de fármacos, como la domperidona o el haloperidol al SNC, pero se incrementa de forma sustancial los efectos tóxicos sobre estos tejidos (Schinkel, et al., 1996). Debido a ello, una estrategia interesante podría ser vectorizar con sustancias que no sean sustrato de esta gp-P o emplear inhibidores reversibles.

2.3. Alteraciones en la BHE en la EA

Muchos estudios sugieren que la acumulación de péptido A β en el cerebro produce alteraciones cerebrovasculares (Kawarabayashi, et al., 2001; Hardy, 2009). En condiciones fisiológicas, la proteína P y el LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) son responsables de la disminución de las cantidades de A β , mientras que RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) es el encargado de permitir su acceso al cerebro (Zolezzi e Inestrosa, 2013). En la EA, las altas cantidades de A β producen a su vez una hiperexpresión de RAGE y se genera de esta manera un bucle positivo, que incrementa aún más los niveles de A β y al mismo tiempo genera una respuesta inflamatoria (Deane, et al., 2003). En la EA además, se produce una disminución de la actividad de la gp-P (van Assema, et al., 2012), como se ha podido comprobar en modelos animales, esto favorece el bucle positivo. El proceso inflamatorio resultante produce

alteraciones que dañan las TJs. En este sentido, los modelos en ratón muestran atrofia cerebrovascular y elevados niveles de RAGE que claramente alteran la BHE y modifican su permeabilidad (Hafezi-Moghadam, et al., 2006).

3. FLAVONOIDE MORIN

En los últimos años los flavonoides están siendo objeto de un importante número de investigaciones biomédicas por su potencialidad en el tratamiento de diversas patologías, debido a sus propiedades farmacológicas.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se originan durante los procesos del metabolismo secundario de los vegetales; en concreto a través de la ruta del ácido shikímico (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009). En esta ruta, la fenilalanina (Phe) sufre una reacción de desaminación catalizada por la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) y da lugar al ácido cinámico. A partir de esta molécula, por adición de grupos hidroxilo y otros sustituyentes, y mediante la acción de varias enzimas; se generan los ácidos *trans*-cinámico y *para*-cumárico. Este último, se conjuga con el acetyl coenzima A (acetyl-CoA) y genera a su vez cumaril-CoA. Es aquí donde comienza la primera etapa de la síntesis de los flavonoides: una molécula de cumaril-CoA se condensa con 3 moléculas de malonil-CoA, en una reacción mediada por la calcona-sintasa, esto da lugar a la naringenina-calcona (figura 1.6), que es la molécula precursora de los flavonoides. La acción de una isomerasa sobre esta calcona origina las flavonas y a partir de estas, los distintos flavonoides (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

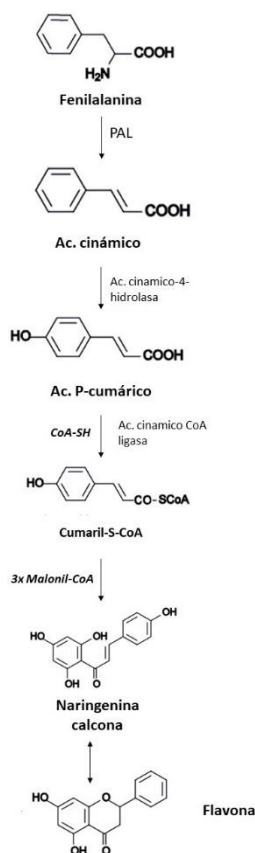


Figura 1.6: Resumen de las primeras etapas de la síntesis de flavonoides.

En función del grado de oxidación, así como de los sustituyentes del anillo C pirano, los flavonoides pueden clasificarse en antocianidinas, flavanoles, flavonas, isoflavonas y flavonoles:

Las antocianidinas se caracterizan por presentar un hidroxilo en posición c3 y dos insaturaciones entre c3-c4 y entre el oxígeno del pirano y el c2. Esto confiere a dichas moléculas una carga positiva, debido a estas insaturaciones. Cuando las antocianidinas presentan un azúcar conjugado con el hidroxilo en c3, se les denomina antocianinas. Los flavanoles, como la catequina, se caracterizan por presentar el c3 hidroxilado, pero carecen de insaturaciones en el anillo C. Las flavonas, por su parte, se presentan un

carbonilo en c4 y no presentan hidroxilaciones en el pirano. Esta característica es común a las isoflavonas, que se distinguen de las anteriores por la posición del anillo B, el cual está unido por c3 en lugar de c2. Por último, los flavonoles representados por la quercetina, entre los que se encuentra el morin, presentan tanto un grupo carbonilo en c4 como una hidroxilación en c3. En muchos casos presentan además, un doble enlace entre c2=c3 (figura 1.7) (Martínez-Flórez, et al., 2002).

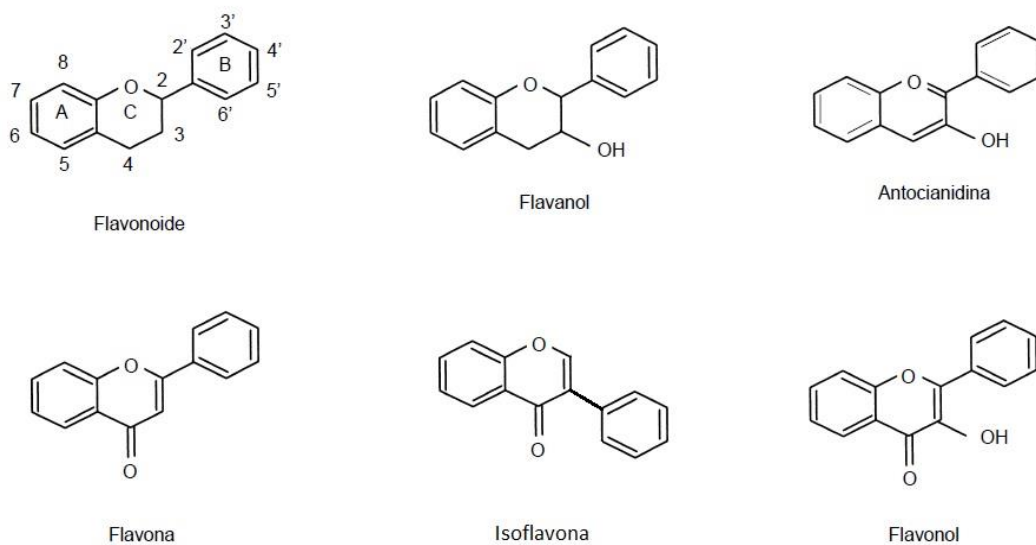


Figura 1.7: Estructura general y tipos de flavonoides.

El morín, que normalmente encontramos como morin hidrato (MH) se clasifica como flavonol y presenta una estructura base común con el resto de flavonoides: 15 carbonos ordenados en un difenilpirano (c6-c3-c6). Esta estructura se compone de dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de uno pirano (C) conjugado (figura 1.7). El anillo B suele estar unido al carbono 2 (c2) del heterociclo, salvo en el caso de las isoflavonas, que se encuentra unido al c3. En esta estructura, los carbonos del heterociclo (A-C) se numeran del 2 al 8; mientras que los carbonos del anillo B se numeran del 2' al 6' (figura 1.7) (Kühnau, 1976).

El MH (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona) (figura 1.8) es un flavonoide de origen natural que se encuentra presente en un gran número de plantas, principalmente pertenecientes a la familia *moraceae* (Abbad, et al., 2015). Normalmente se obtiene en forma de morin hidrato (MH) por extracción hidroalcohólica de las especies *Maclura pomifera*, *Maclura tinctoria* y *Psidium guajava*. Su estructura química permite formar quelatos con iones metálicos di y trivalentes (Panhwar y Memon, 2014) y origina compuestos fluorescentes (Song, et al., 2000). A demás de ello, recientemente se ha comprobado que presenta numerosas actividades farmacológicas.

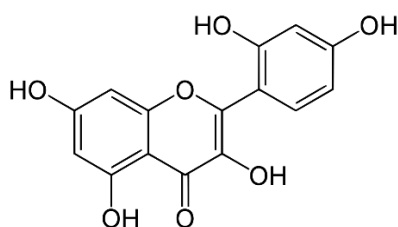


Figura 1.8: Estructura del flavonoide Morin.

Este compuesto presenta una elevada capacidad antioxidante. Además, ha demostrado en diferentes estudios tener actividad antiinflamatoria, antineoplásica (Francis, et al., 1989), neuroprotectora, nefroprotectora y hepatoprotectora (Fang, et al., 2003; Zhang, et al., 2010; Hannasaki, et al., 1994; Ola, et al., 2014; Abbad, et al., 2015). Algunas de estas características han convertido al MH en un candidato interesante con potencialidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson (Zhang, et al., 2010; Waddad, et al., 2013) o distintas tautopatías (Gong, et al., 2011), entre las cuales se encuentra la EA.

3.1. Características físico-químicas:

Morin se presenta como un sólido de color amarillento con punto de fusión de 303,5 °C y peso molecular de 302,23 g/mol. Presenta una baja solubilidad en agua (28,7 µg/mL) a valores de pH inferiores a 7. Para valores de pH superiores a 7,4, aumenta ligeramente (54,86 µg/mL), y a partir de un pH de 9 la solubilidad aumenta acusadamente, hasta valores en torno a 500 µg/mL. A valores de pH de 11, la solubilidad de morin se incrementa hasta los 3 mg/mL (Li, et al., 2019). Este incremento de la solubilidad a pH elevado puede explicarse por la ionización de morin, al producirse la desprotonación de c7-OH del anillo de benzoílo en medio básico (Kumar, et al, 2018).

Al igual que ocurre con otros bioflavonoides, la solubilidad y reactividad de morin aumenta con el pH de la solución, debido a una mayor desprotonación de grupos hidroxilo en el anillo de benzoilo. Sin embargo, el flavonoide, en medio básico (pH 9), se hidroliza con facilidad, degradación que es mínima a pHs ácidos y neutro. Por otra parte, la estabilidad de morin se ve también afectada por la luz (Zhang et al, 2011; Abbad et al, 2015; Bark et al, 2015; Ghosh et al, 2017; Jangid et al, 2018; Kumar et al, 2018; Li et al, 2019; Alonso et al, 2020).

3.2. Características farmacocinéticas

Pese a las prometedoras características farmacológicas de morin, su uso como agente terapéutico se ve condicionado por su baja solubilidad en agua y sus características biofarmacéuticas. La solubilidad es un parámetro muy importante en el desarrollo de nuevos medicamentos, ya que puede condicionar la vía de administración y la forma farmacéutica más adecuada.

En el caso de morin, en estudios realizados en cultivos celulares se ha demostrado que la concentración necesaria obtener un efecto antiinflamatorio, anticancerígeno o antioxidante es de aproximadamente 10-100 μM , por lo que necesitan ser más elevadas en plasma y tejidos para obtener dichos efectos in vivo (Jin et al, 2014; Kuo et al 2007).

Sin embargo, la escasa solubilidad en agua de morin es un factor que condiciona su biodisponibilidad por vía oral. Así, la biodisponibilidad por vía oral de MH es muy baja, con valores que oscilan entre el 0,45% y el 5,28%, debido fundamentalmente a esa limitada solubilidad en fluidos acuosos y escasa permeabilidad a través de membranas biológicas y además, sufre un acusado efecto de primer paso intestinal (Li et al 2019).

La escasa permeabilidad intestinal de morin está condicionada por la acción de transportadores de salida como es el caso de la gp-P, hecho que se ha puesto de manifiesto tanto en estudios realizados en cultivos celulares como en animales de experimentación (Li et al., 2019; Yeon et al, 2015).

La glicoproteína P es un sistema de transporte activo celular perteneciente a la superfamilia de ATPasas tipo ABC, que es capaz de transportar metabolitos endógenos y fármacos al exterior celular mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP. Se localiza en la membrana apical de hepatocitos, células de la corteza adrenal, en la superficie luminal de las células del túbulo proximal renal, en el páncreas riñones y enterocitos, y constituye una barrera frente a la entrada de fármacos y toxinas, por ello puede condicionar la absorción intestinal de compuestos como ocurre con morin (Choi, et al., 2015).

Por otra parte, como les ocurre a todos los flavonoides, morin sufre un extenso metabolismo hepático (Singh, et al., 2018), mediante reacciones de Fase I en las que incorporan más grupos polares y de Fase II, en las cuales se conjuga con glucurónico, sulfatos o glicina; se generan de esta manera metabolitos más polares que son fácilmente excretados en orina (Martínez-Flórez, et al., 2002). La semivida plasmática ($t_{1/2}$) tanto de morin como de sus metabolitos es corta, con valores descritos que oscilan entre 30 minutos (Li, et al., 2018; Li et al., 2019) y 2 horas (Jangid et al, 2019).

Todas estas características dificultan de manera significativa la posibilidad de su uso como agente activo en administración por vía oral, y limita su potencial terapéutico. (Ikeuchi-Takahashi, Ishihara y Onishia, 2016)

3.3. Actividad frente a la Enfermedad de Alzheimer

Aunque el morin ha demostrado tener potencial actividad terapéutica frente a diversas patologías, resulta especialmente interesante su posible utilización para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que puede actuar sobre distintos factores característicos de esta enfermedad:

- **Disminución de las placas A β**

La acumulación y formación de depósitos extracelulares o placas del péptido β -amiloide es una de las lesiones características de la EA (Hooper, et al., 2008; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008). Pues bien, estudios realizados in vitro han puesto de manifiesto que morin es capaz de reducir la formación de estas placas (Hirohata, et al., 2007).

Por otra parte, este flavonoide es capaz de desestructurar las placas A β ya formadas, debido a que se interpone en el núcleo hidrofóbico de la lámina y la desestabiliza y favorece que se solubilice en el medio (Lemkul y Bevan, 2010). El tratamiento de cortes cerebrales de ratones APPswe/PS1dE9 (modelo de ratón que genera placas A β de forma acelerada) con anti-A β ha demostrado que los ratones tratados con este flavonoide presentaban una cantidad significativamente menor de A β tanto en córtex cerebral como en hipocampo (Du, et al., 2016).

▪ **Inhibición de BACE-1**

BACE-1 es una β -secretasa cuya importancia en la EA radica en ser la principal responsable de la escisión del APP y la formación a partir del mismo de $A\beta$, el cual sale al medio extracelular y precipita; se forman de esta manera las placas amiloides. Estudios realizados en cultivos celulares con MH han puesto de manifiesto que es capaz de inhibir esta enzima e impedir su acción sobre el péptido APP (Shimmyo, et al., 2008).

▪ **Inhibición de α -sinucleína**

La proteína α -sinucleína es el componente principal de las inclusiones filamentosas que constituye una de las características de diversos procesos neurodegenerativos, como la EA. Esta proteína se encuentra muy expresada en cerebro, fundamentalmente en terminaciones nerviosas presinápticas. Pues bien, la conversión de una pequeña cantidad de esta proteína en filamentos insolubles se cree que es el principal evento en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas más comunes (Goddert, et al., 1998; Prusiner, 2001). Varios estudios han demostrado que morin presenta concentraciones inhibitorias (IC_{50}) de la agregación de los filamentos de, entre otras, la proteína α -sinucleína en el rango de concentraciones de 1 a 2 μM (Masuda, et al., 2006).

▪ **Disminución de los depósitos de Tau hiperfosforilada**

La proteína Tau, en su forma fosforilada, contribuye a la estabilidad estructural de las neuronas. No obstante, en la EA, la hiperfosforilación de esta proteína causa agregados insolubles de la misma, que conducen finalmente a muerte celular (Karran, et al., 2011). El enzima responsable de este proceso de hiperfosforilación es principalmente la GSK3 β . Así, Kim y col. (Kim, et al., 2005) han demostrado que MH es capaz de inhibir de forma competitiva la actividad de este enzima en cultivos celulares (células HT22 de neuroblastoma murino), a consecuencia disminuye la formación de los ovillos de p-Tau.

Entre las quinasas que fosforilan la proteína Tau, GSK3 β por tanto está fuertemente implicada en la patogénesis de la EA. Pues bien, estudios realizados tanto in vitro (Kim, et al., 2018) como in vivo (Gong, et al., 2011), han puesto de manifiesto que morin es capaz de inhibir esta enzima, mediante la unión del flavonoide al bucle rico en glicina (Gly) de la proteína.

Por otra parte, MH al igual que otros polifenoles con estructura similar, como la miricetina, presenta IC50 de la agregación de los filamentos de la proteína Tau en el rango de concentraciones 1-2 μ M (Masuda, et al., 2006; Alberdi, et al., 2018). Otros estudios realizados en animales de experimentación (ratones JNPL3 que expresan la proteína tau humana mutada P301L), han demostrado que morin es capaz de disminuir las cantidades de p-Tau hiperfosforilada insoluble, con un incremento en los niveles de la fracción soluble de esta proteína, debido posiblemente, a que MH se une a p-Tau

hiperfosforilada, la estabiliza y previene su agregación y precipitación en forma de ovillos (Yu, et al., 2018).

▪ **Protección frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS):**

En la EA las neuronas se ven sometidas a un incremento del estrés oxidativo causado por una mayor presencia de ROS (Chen y Zhong, 2014). Numerosos estudios han demostrado que MH es capaz de incrementar la supervivencia de los cultivos celulares sometidos a estrés oxidativo causado por ROS (Zhang, et al., 2010; Alberdi, et al., 2018; Hannasaki, et al., 1994). Además, es capaz de estabilizar la membrana mitocondrial de la célula dañada y dar lugar a una reducción en los niveles de ROS (Campos-Esparza, et al., 2009).

▪ **Reducción de la neuroinflamación:**

Otro de los factores responsables de la muerte neuronal durante la EA es la inflamación. MH es un flavonoide que ha demostrado en estudios realizados en cultivos celulares un efecto antiinflamatorio (Fang, et al., 2003), que en el caso de su potencial uso en el tratamiento de la EA, puede estar basado en su actuación a nivel de varias vías:

- Modula los niveles de los mediadores de la inflamación a través de la vía de NF- κ B (Heeba y Mahmoud, 2014; Sinha, et al., 2015).
- Reduce de manera indirecta la activación de los astrocitos de la glía al reducir la presencia de A β soluble en el medio extracelular (Du, et al., 2016).

3.4. Morin y barrera

La capacidad de paso a través de la BHE del MH resulta controvertida. Muchos ensayos, principalmente en modelos celulares, defienden que este flavonoide si es capaz de alcanzar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, Youdim et al (Youdim, et al., 2004) defienden que los metabolitos conjugados con glucurónico de este flavonoide son perfectamente capaces de alcanzar el SNC, así son capaces de ejercer su acción neuroprotectora. Efectivamente, el morin es un flavonoide que puede acceder a través de los transportadores de aniones orgánicos, presentes en la BHE. No obstante, este tipo de transportador es mucho más frecuente en los riñones por ello este es el destino principal de los metabolitos del MH (Sekine, et al., 2006). Este hecho explicaría por qué estos metabolitos no exhiben una mejora de las condiciones farmacocinéticas respecto al compuesto original, puesto que presentan una $t_{1/2}$ de 2h 30min (Hou, et al., 2003). Al igual que explica que para alcanzar concentraciones cuantificables y farmacológicamente activas, sea necesario el administrar dosis de 30mg o 50mg/Kg de animal (Singht, et al., 2018). Esto resultaría en que el morin es un flavonoide que en la práctica no es capaz de atravesar la BHE por si mismo (Waddad, et al. 2013) o por lo menos no en cantidades terapéuticamente relevantes (Singht, et al., 2018).

3.5. Morin como hepatoprotector

En este capítulo se ha hablado del papel que presenta el flavonoide morin en el tratamiento de la EA. No obstante, el tratamiento directo de la enfermedad no es el único beneficio que este compuesto puede ofrecer. Como se ha mencionado en el apartado anterior de la EA, la mayor parte de los tratamientos actuales para esta patología presentan un metabolismo hepático. Al tratarse de tratamientos crónicos, pueden suponer un estrés para este hígado a largo plazo. Es más, algunos de estos tratamientos han demostrado presentar posibles complicaciones por hepatotoxicidad.

En este sentido, el MH podría ser capaz de mitigar los problemas asociados. Ya se ha visto que el MH tiene un efecto antioxidante que es de por sí una característica hepatoprotectora. Esto ha sido confirmado con estudios in vivo, en los cuales tratamientos con este flavonoide fueron capaces de disminuir el daño por estrés oxidativo en el hígado de ratas diabéticas (Pandey, et al., 2019).

Pese a este hecho, el rápido metabolismo del MH vuelve a jugar en su contra. Debido a este factor, resulta necesario el uso de tratamientos prolongados para comenzar a observar un aumento en la supervivencia de los hepatocitos (Jayaraj, et al., 2007).

II- OBJETIVOS

El flavonoide morin es un compuesto polifenólico que ha demostrado *in vitro* ser capaz de actuar frente a los principales mecanismos de una la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad supone un importante problema de salud y es la principal causa de demencia en la población de mayores de 65 años. No obstante, su potencial uso en la práctica clínica se ve condicionado por su escasa biodisponibilidad, elevado metabolismo hepático y muy baja capacidad para atravesar la BHE.

El objetivo general de esta memoria experimental es favorecer el acceso del morin hidrato al SNC mediante el uso de nanopartículas funcionalizadas para su vectorización. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo y validación de dos métodos para la determinación de morin hidrato por HPLC que permitan la cuantificación de la cantidad de flavonoide encapsulada en las nanopartículas.
- Desarrollo y validación de un método por espectrofotometría UV, para la cuantificación de las cantidades de morin hidrato liberadas por las nanopartículas en los ensayos de cesión *in vitro*.
- Elaboración de nanopartículas de PLGA cargadas con rodamina-B sin funcionalizar, funcionalizadas con el dipéptido fenilalanina-fenilalanina en superficie, y mediante la funcionalización del polímero PLGA con el dipéptido antes de su formación.

- Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las formulaciones de nanopartículas cargadas con rodamina-B en hígado, riñón, pulmón y bazo.

- Evaluación *in vivo* del paso a través de la barrera hematoencefálica de las diferentes formulaciones de nanopartículas cargadas con rodamina-B

- Desarrollo y caracterización de nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato sin funcionalizar, funcionalizadas con el péptido fenilalanina-fenilalanina en superficie y mediante la funcionalización del polímero PLGA antes de su formación.

III- DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE MORIN

1. INTRODUCCIÓN

La determinación y cuantificación de las cantidades de principio activo es un punto crítico en el desarrollo y preparación de formas farmacéuticas. Por tanto, es necesario disponer de métodos analíticos rápidos, sencillos y precisos para poder garantizar la calidad del producto. No obstante, los métodos empleados para la detección y cuantificación de los flavonoides, en especial del morin hidrato, puede presentar dificultades asociadas a su falta de especificidad y/o selectividad.

Existen pocos estudios que se han centrado en el desarrollo de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección y cuantificación de este compuesto. Ikeuchi-Takahashi (Ikeuchi-Takahashi, et al., 2016) en un trabajo en el que se realiza la encapsulación de morin en nanopartículas lipídicas, describen una metodología para su cuantificación mediante HPLC, para ello se ha empleado una fase móvil de acetonitrilo:agua acidificada con ácido ortofosfórico 0,2% en proporción 27:73 (v/v), no obstante no especifican el rango de concentraciones en el cual trabajan (Ikeuchi-Takahashi, et al., 2016). Otros autores desarrollan también un método por HPLC, pero en un rango de concentraciones elevado, y comprendido entre 50-75 µg/mL (El-Haddad, et al., 2018).

En este capítulo se describe la puesta a punto y validación de los métodos analíticos empleados para la cuantificación del morin. No existe un único modelo para la puesta a punto de métodos analítico, por tanto, se pueden determinar diferentes parámetros en función de los objetivos buscados. En la presente memoria se han puesto a punto dos métodos de

cuantificación por HPLC y un método de detección por espectrofotometría ultravioleta directa (UV).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es el desarrollo y validación de métodos analíticos rápidos, sencillos y precisos para la cuantificación del morin solo o encapsulado en nanosistemas, así como para cuantificar el compuesto en los ensayos de velocidad de liberación *in vitro*. Para alcanzar este objetivo se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo y puesta a punto de una metodología para la determinación de MH por HPLC que nos permita la cuantificación de la cantidad de flavonoide encapsulada en las nanopartículas (NPs).

- Desarrollo y puesta a punto de un método para la determinación de morin hidrato por espectrofotometría UV, para la cuantificación de las cantidades de flavonoide cedidas por las NPs en los ensayos de cesión *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Determinación analítica de morin por HPLC

Para poder realizar la detección y cuantificación de MH encapsulado en las nanopartículas, se ha puesto a punto y validado un nuevo método analítico por HPLC.

Para la validación del método analítico, así como para el posterior análisis, se ha utilizado un HPLC Jasco (Jasco International Co Ltd, Tokio, Japón) equipado con una unidad de gradiente cuaternario LG-2080-04, una bomba PU-2080, un desgasificador DG-2080-54, un inyector automático AS-2050-plus y un detector UV-2070 de ultravioleta/visible. Para este método se optó por utilizar una columna de fase reversa Gemini® 5 µm NX-C18 110 Å con una longitud de 250 x 4,6 mm (Phenomenex®, Torrance, USA). Durante los análisis la columna se mantuvo a una temperatura de 40°C.

Se seleccionó un volumen de inyección de 50 µl y una longitud de onda (λ) de 256 nm. La fase móvil utilizada para la cuantificación de morin consistió en una mezcla de agua:acetonitrilo (73:27) (Fisher Scientific, Madrid, España) la cual se acidificó con ácido fosfórico (Acros Organic, EE. UU.).

3.1.1. Selección de las condiciones cromatográficas para la determinación de MH

Para la selección de las condiciones cromatográficas finales se analizaron diferentes variables: proporciones de agua:acetonitrilo, pH de la fase móvil, flujo y temperatura de la columna (tabla 3.1). Las fases móviles fueron filtradas a través de membranas de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore, Madrid, España) y desgasificadas mediante un baño de ultrasonidos, durante 20 minutos, antes de su uso.

Variables	Valor
pH	2,3
	2,5
	2,6
Flujo (mL/min)	1,2
	1,4
Fase móvil (% acetonitrilo)	20
	27
	30
Temperatura columna ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)	30
	40

Tabla 3.1: Relación de las variables seleccionadas para establecer las condiciones del método de análisis de morin mediante HPLC.

3.1.2. Estudios de Estabilidad

Con el objetivo de detectar si los productos de degradación de morin pueden interferir en la cuantificación del principio activo con el método de HPLC desarrollado, se realizaron estudios de estabilidad MH en las condiciones que se indican en la tabla 3.2. Dado que esta metodología se puso a punto orientada para la determinación de la eficacia de encapsulación del MH en las NPs, ensayo que requiere, como se explica más adelante en esta memoria, del contacto del principio activo con metanol, los estudios de estabilidad se realizaron en todos los casos con el compuesto disuelto en dicho alcohol. Las condiciones ensayadas se recogen en la tabla 3.2. Todas las muestras fueron preparadas por triplicado.

Condiciones de estabilidad

25°C, 24 h

4°C, 24 h

HCl 0,1N, 60°C, 24 h

NaOH 1N, 105°C, 20 min

3% H₂O₂, 24 h

Tabla 3.1: Condiciones experimentales de los estudios de estabilidad.

3.1.3. Preparación de las muestras patrón

Las muestras empleadas para la elaboración de las curvas de calibración se prepararon de acuerdo a dos protocolos:

Protocolo A: se preparó una solución madre en metanol con una concentración de 100 µg/mL; a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones para obtener la curva de calibración en un rango entre 5 y 30 µg/mL de MH en metanol

Protocolo B: Se preparó una solución madre con una mezcla de metanol:HCl 0,1N (50:50 v/v) a igual concentración (100 µg/mL), bajo agitación magnética constante durante dos horas, para asegurar que se formaba el clorhidrato. Esta solución madre fue diluida en metanol para obtener las concentraciones correspondientes para la curva de calibración en un rango entre 1 a 30 µg/mL de MH en metanol:HCl (50:50 v/v).

Análisis estadístico de los resultados

Se han puesto a punto dos métodos analíticos a partir de las muestras patrón obtenidas con ambos protocolos (A y B). En el protocolo A, las muestras del flavonoide morin fueron disueltas en metanol; en el protocolo B, fueron disueltas en una mezcla de metanol y ácido clorhídrico (HCl) en proporción 50:50 (v/v). Las condiciones empleadas, en ambos casos, fueron: fase móvil ACN:H₂O 27:73 (v/v); pH 2,5 ± 0,05; flujo 1,4 mL/min y temperatura de la columna 40°C.

Los resultados obtenidos por ambos métodos se analizaron mediante un análisis de la varianza ANOVA para comprobar la validez de los métodos. Además, se comprobó la linealidad, precisión y exactitud de ambos

protocolos; y se determinaron los límites de cuantificación (LC) y de detección (LD).

Linealidad

La ICH define la linealidad como la capacidad de un procedimiento analítico para obtener, en un rango determinado, resultados directamente proporcionales a la concentración de la muestra de analito (ICH, 2005).

Para el estudio de linealidad, el rango de concentraciones utilizadas fue de 5, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ para el protocolo A, que emplea sólo metanol, y de 1, 5, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ para el protocolo B, con metanol:HCl. Para realizar el estudio de la linealidad se prepararon 3 curvas para cada método en 3 días distintos.

Análisis de la varianza de la regresión

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA de regresión, en el cual se comparan las variaciones debidas a la regresión frente a aquellas debidas a los errores residuales (experimentales y de ajuste), para comprobar si los datos se ajustan a un modelo lineal.

- H_0 (hipótesis nula): El modelo no es lineal ($p > 0,05$).
- H_1 (hipótesis alternativa): El modelo es lineal ($p < 0,05$).

Test de proporcionalidad

Mediante la prueba estadística de la *t de Student* se demuestra, por medio de contraste de hipótesis, si la ordenada pasa o no por el origen:

- H_0 (hipótesis nula): La ordenada en el origen no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).

- H_1 (hipótesis alternativa): La ordenada en el origen difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

Test de regresión

Por medio del mismo estadístico, *t de Student*, se demuestra que la pendiente es distinta de 0 para un nivel de significación del 95%.

- H_0 : La pendiente no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).
- H_1 : La pendiente difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

Resolución de los picos

La *resolución de los picos* (R), es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos y por tanto, de su capacidad para separar dos analitos (1 y 2). Este parámetro se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$R = (\Delta t / (W_{B1} + W_{B2}))$$

Siendo Δt la distancia entre el máximo de los dos picos, W_{B1} y W_{B2} la medida de las bases de los picos 1 y 2, respectivamente. Cuando el valor de R es de 1,5, permite una separación esencialmente completa de los dos componentes. Un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. Valores de R inferiores a 1 indican solapamiento de los picos.

Idoneidad del sistema cromatográfico

Se evaluó la idoneidad del método analítico, a partir del cálculo del factor de asimetría (T) y del número de platos teóricos (N).

- Factor de asimetría (T): proporciona una medida de la simetría del pico cromatográfico, y se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$T = (W_{0,05}/2f)$$

Donde, f es la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del mismo, y $W_{0,05}$ es la anchura del pico correspondiente al 5% de su altura. Cuanto más próximo se encuentre el valor de T a 1, mayor será la simetría del pico.

- Número de platos teóricos (N): medida de la eficacia de la columna, que se puede calcular empleando la siguiente ecuación:

$$N = 16 (tr/W)^2$$

Siendo tr el tiempo de retención del analito y W la anchura del pico en su base. El valor de N indica la eficacia de la columna utilizada y está directamente relacionada con el sistema cromatográfico.

Precisión

La precisión de un método expresa la capacidad de este para obtener resultados lo más semejante posible de múltiples muestreos, cuando se emplean muestras homogéneas o muestras preparadas a la misma concentración. Para ello se emplea la desviación estándar relativa y el coeficiente de variación (CV).

Puede considerarse la precisión a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Debe determinarse mediante el uso de muestras originales y homogéneas.

- Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de trabajo en un corto intervalo de tiempo con un mismo analista, el mismo aparato y los mismos reactivos. Se puede expresar también como precisión intradía.
- Precisión intermedia o interdía: Expresa la capacidad de obtener idénticos resultados al analizar las mismas concentraciones en días distintos.
- Reproducibilidad o precisión instrumental: Expresa la precisión al emplear distintos equipos.

Para los estudios de precisión se seleccionaron 3 concentraciones distintas (5, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se prepararon 5 muestras de cada una. La repetibilidad (precisión intradía), tanto para el método A como del método B, se realizó al analizar tres concentraciones (5, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cinco veces cada una y bajo las mismas condiciones. La precisión intermedia (interdía) se determinó al analizar estas tres concentraciones en 3 días distintos, cada muestra se repitió cinco veces. Por último, la precisión instrumental se evaluó a través de la comparación de 5 inyecciones sucesivas del flavonoide a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresaron como CV.

Exactitud

Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado como verdadero (material de referencia interno, certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado. La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito (MH)(USPNF,2020). Se prepararon, para cada uno de los métodos, soluciones a tres concentraciones conocidas del flavonoide (5, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todas las muestras se prepararon por triplicado. La exactitud del método se

determinó al comparar los resultados obtenidos frente a la concentración real y se expresó como CV.

Límites de detección:

Tanto el LD como el límite de cuantificación LC fueron calculados bajo los criterios establecidos por las guías ICH (ICH, 2005). El cálculo de ambos límites se realizó en base a la desviación estándar de la curva de calibración (σ) y a la pendiente de la misma (S), para ello se emplearon a las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3,3 \times \sigma/S$$

$$LC = 10 \times \sigma/S$$

3.2. Determinación analítica de morin por espectrofotometría UV

Para cuantificar de forma sencilla las cantidades del flavonoide disueltas en tampón fosfato (PBS) a pH 7,4 en los ensayos de cesión, se puso a punto un método analítico por espectrofotometría UV.

En la preparación del tampón PBS se empleó hidrógeno fosfato de disodio (Na_2HPO_4) (Fisher Scientific, Madrid, España) y di-hidrógenofosfato monopotasio (KH_2PO_4) (Fisher Scientific, Madrid, España) en las cantidades indicadas por Farmacopea, y el pH fue ajustado a 7,4. El analito fue morin hidrato (Sigma Aldrich, Madrid, España). El espectrofotómetro empleado fue un Jasco V-730 con detector UV/VIS (Jasco International Co Ltd, Tokio, Japón). Cubetas de cuarzo High Precision Cell de H0Q310H (Hellma Analytics, Paris, Francia.). Para el ajuste de pH se empleó un medidor de pH Accumet® AE150 (Fisher Scientific, Madrid, España).

Se llevó a cabo un barrido de absorción del morin disuelto en PBS a un pH de 7,4 y se seleccionó un máximo de absorción a una longitud de onda $\lambda = 261\text{nm}$. Se evaluó la linealidad y exactitud del método espectrofotométrico de acuerdo con los criterios ICH previamente descritos.

Para los estudios de linealidad se prepararon 5 rectas de calibrado en tampón PBS a pH 7,4, cada una de las cuales se realizaron en diferentes días. Las concentraciones seleccionadas fueron: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se prepararon a partir de una solución patrón de morin hidrato con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

La exactitud del método se determinó a las concentraciones de 5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$. Estas diluciones se prepararon con la incorporación de PLGA a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de polímero para 5 $\mu\text{g/mL}$ de morin en PBS a pH 7,4.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación analítica de Morin por HPLC

4.1.1. Selección de las condiciones cromatográficas para la determinación de MH

Para la selección de las mejores condiciones cromatográficas se modificaron diferentes variables. Los valores obtenidos de porcentaje de recuperación y tiempo de retención quedan recogidos en la tabla 3.3:

Parámetros	Valor	Recuperación (%)	Tr (min)
pH	2,3	109,24	8,02
	2,5	100,56	7,45
	2,6	95,54	7,11
Flujo (mL/min)	1,2	102,56	8,14
	1,4	100,56	7,45
Fase móvil (% acetonitrilo)	20	91,46	18,66
	27	100,56	7,45
	30	115,85	6,10
Temperatura de la columna (\pm 0,5°C)	30	90,77	7,29
	40	99,66	7,45

Tabla 3.3: Relación de los parámetros ensayados para establecer las condiciones del cromatograma. Tr. se corresponde con el tiempo de retención del pico.

Cuando se analizó el efecto del pH, se pudo observar que muy pequeñas variaciones dan lugar a modificaciones en el pico cromatográfico, por ejemplo, a un pH de 2,6 aparece un pico ancho y poco definido, con una cola muy marcada. También valores de 2,3 dan lugar a picos menos simétricos y de menor tamaño. Así, se optó por emplear un valor pH de 2,5,

al cual se obtuvieron los picos más adecuados (figura 3.1A). Esta variable resultó fundamental para obtener un pico bien definido (Alonso, et al., 2020), tal y como se observa en la figura 3.1B.

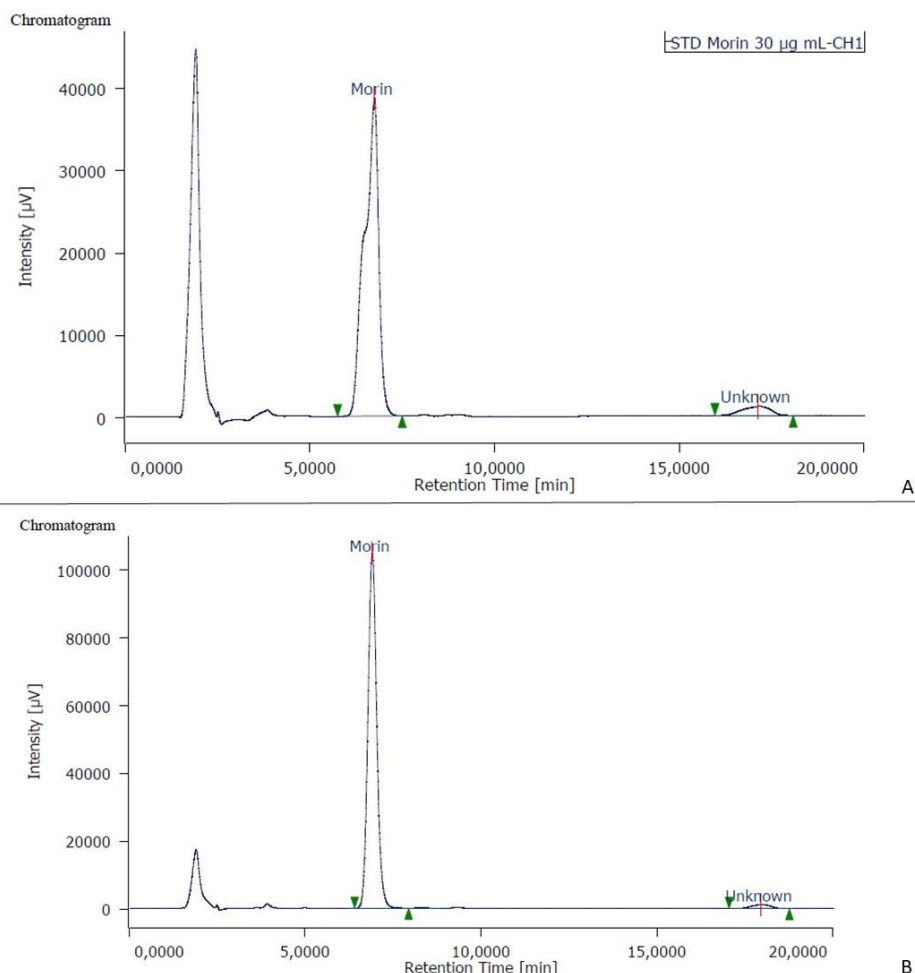


Figura 3.1: (A) Cromatograma correspondiente a una concentración de 30 µg/mL de morin por el método A. (B) Cromatograma correspondiente a la misma concentración de morin por el método B.

Al analizar la proporción de acetonitrilo (ACN) en la composición de la fase móvil, los resultados obtenidos indican que un menor porcentaje del componente orgánico daba como resultado picos con un tiempo de retención muy largo, 18.66 min; mientras que con una proporción superior al 30%, los tiempos podrían ser excesivamente cortos y se acercaban al frente de solvente, se limita así la posible aplicación del método en la detección del compuesto en fluidos biológicos (figura 3.2)

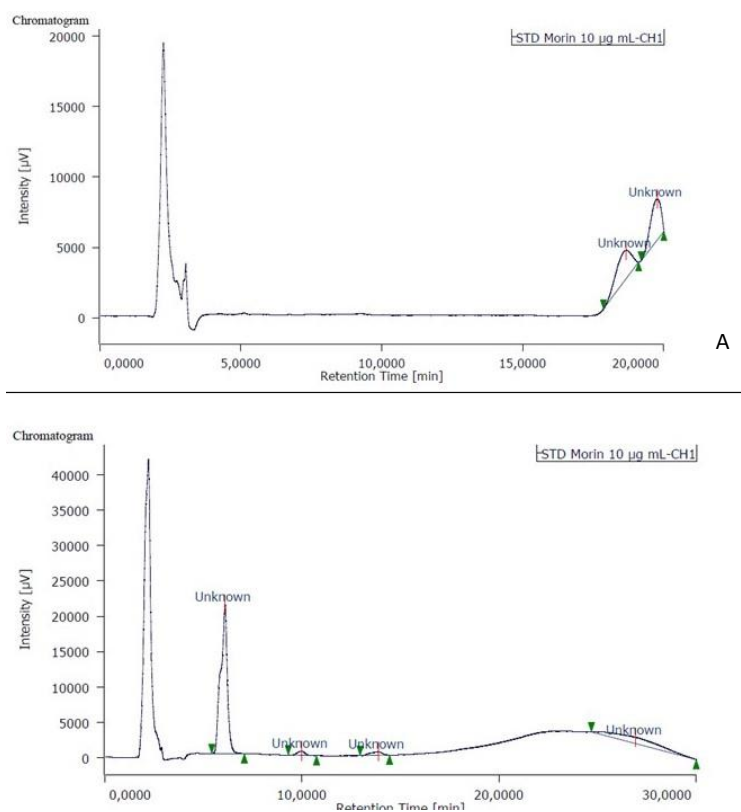


Figura 3.2: Cromatogramas correspondientes al análisis de una solución de morin (concentración 10 µg/mL) en una fase móvil preparada: (A) con un 20% ACN y (B) con un 30% de ACN.

En función de estos resultados se optó por emplear una fase móvil preparada con ACN: H₂O de 27:73 v/v, ajustada a un pH de 2,5±0,05 con ácido fosfórico.

Al analizar las condiciones de flujo se llegó a la conclusión de que entre un flujo de 1,2 mL/min y 1,4 mL/min, el segundo presentaba mejores resultados (tabla 3.3). Por lo que se refiere a la variable temperatura, y dado que el tiempo de retención obtenido fue similar a las dos temperaturas ensayadas (30°C y 40°C), se optó por emplear la más elevada, ya que resultaba más sencillo mantenerla constante independientemente de los factores ambientales a los que se realizase el ensayo.

Por tanto, podemos indicar que las condiciones cromatográficas más adecuadas para la cuantificación de morin mediante HPLC son las

siguientes: Fase móvil ACN:H₂O 27:73 (v/v) a pH de $2,5 \pm 0,05$; flujo 1,4 mL/min; temperatura de 40°C para la columna, y longitud de onda de 256 nm.

4.1.2. Estudios de estabilidad

Para descartar que los productos de degradación de morin puedan interferir en la cuantificación del mismo, cuando se emplea este método de HPLC, se llevaron a cabo estudios de estabilidad forzados y estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento de la materia prima a tiempos cortos. En la tabla 3.4 se recogen los resultados obtenidos, expresados como porcentajes de recuperación del morin, en los estudios de estabilidad bajo las condiciones ensayadas.

Condiciones de estabilidad	Porcentaje de recuperación \pm DE
25°C, 24 h	103,42 \pm 0,57
4°C, 24 h	106,19 \pm 8,03
HCl 0,1N, 60°C, 24 h	214,05 \pm 8,14
NaOH 1N, 105°C, 20 min	2,85 \pm 0,86
3% H ₂ O ₂ , 24 h	73,77 \pm 7,29

Tabla 3.4: Resultados de los ensayos de estabilidad del morin.

En la figura 3.3 se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra patrón de morin (30 $\mu\text{g/mL}$). B corresponde a los 4°C en 24h. C corresponde a 25°C y 24h. D es el cromatograma correspondiente a las condiciones ácidas (HCl 0,1N; 60°C). E se corresponde al medio oxidativo (H_2O_2 3%; 25°C). F: condiciones básicas (NaOH 1N; 60°C):

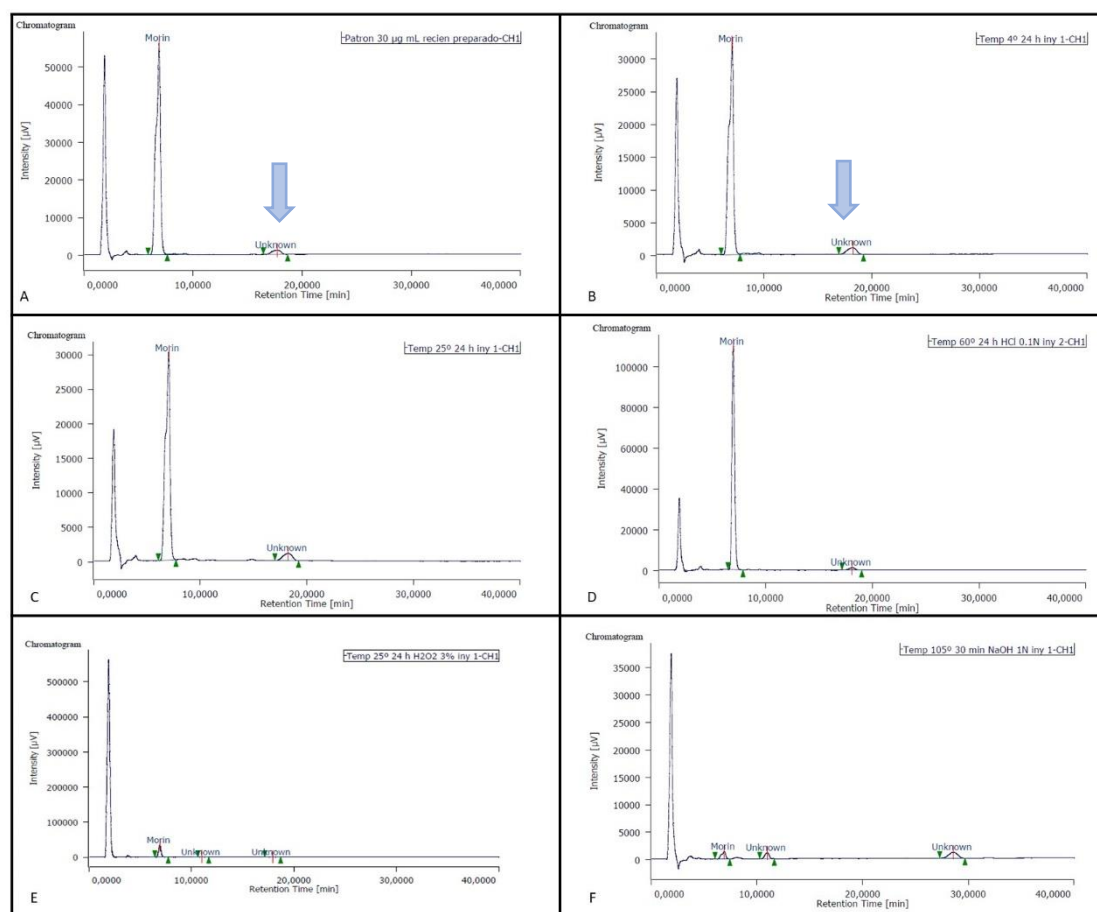


Figura 3. 3: Cromatogramas correspondientes a los estudios de estabilidad. (A) muestra de una solución de morin de 30 $\mu\text{g/mL}$. (B) cromatograma obtenido en condiciones de 4°C durante 24h. (C) Cromatograma obtenido a 25 °C durante 24h. (D) cromatograma obtenido en condiciones ácidas (HCl 0,1N; 60°C). (E) cromatograma obtenido en medio oxidativo (H_2O_2 3%; 25°C). (F) cromatograma obtenido en condiciones básicas (NaOH 1N; 60°C)

En todos los casos se observa un pico que aparece a un Tr de $18 \pm 0,3$ min y que se trata de una impureza habitual en el morin. Este pico sale a un tiempo de retención muy posterior a del morin y no interfiere para su cuantificación.

Para asegurar que los tiempos de contacto con el metanol empleados en la extracción de las NPs no afectan a la estabilidad del morin, se llevaron a cabo estudios de estabilidad a corto plazo, en las mismas condiciones que se utilizan para la determinación de la eficacia de encapsulación de las nanopartículas. Los cromatogramas correspondientes a las muestras conservadas a 25°C y 4°C no presentaron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación respecto a los obtenidos con la concentración del patrón preparado en el momento: $103,42 \pm 0,57\%$ y $106,19 \pm 8,03\%$, respectivamente (figura 3.3 A; 3.3 B y 3.3 C) (tabla 3.4).

Los ensayos de estabilidad forzados realizados permiten indicar que tanto las condiciones oxidativas como el medio básico producen una degradación significativa del compuesto y se obtuvieron porcentajes remanentes de morin de $73,77 \pm 7,29\%$ en el caso del medio H_2O_2 3% a 25°C (figura 3.3 E) y $2,85 \pm 0,86\%$ en NaOH 1N a 60°C (figura 3.3 F) (tabla 3.2), de esta manera se originan dos compuestos (una dicetona y un ácido *o,p*-dihidroxibencilico) con un Tr que no interfiere con el tiempo de retención del morin. Estos resultados se corresponden con los observados por otros autores (Bark et al., 2015) quienes demostraron la inestabilidad del morin en condiciones de pH 8,8 a 10,2 (figura 3.4).

En un estudio de estabilidad de morin realizado en diferentes medios, se observó que un pH de 9,0 conduce a una mayor inestabilidad de morin, siendo más estable en medios ácido y neutro. En este estudio, los autores concluyen que el pH básico y la luz son los principales factores que afectan a la estabilidad de morin (Jangid, et al., 2018).

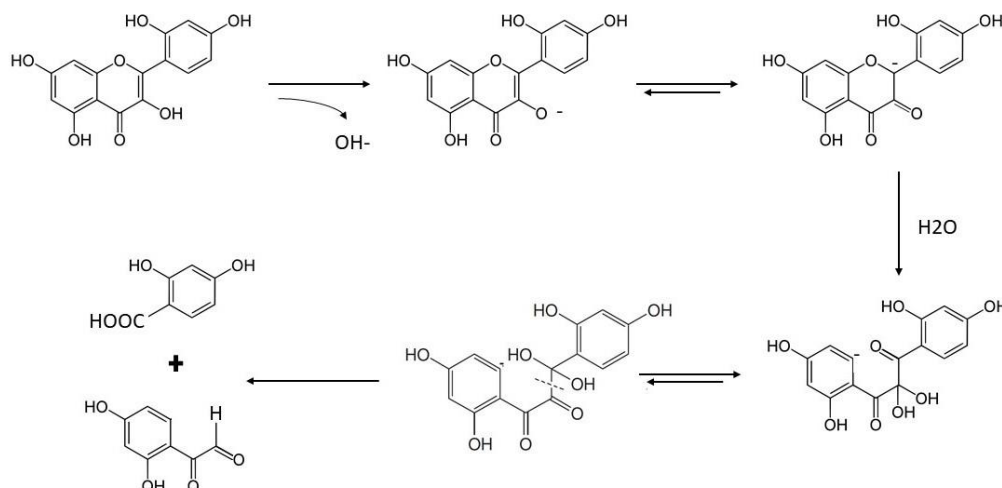


Figura 3.4: Posible reacción de degradación del morin en medio básico (Bark et al. 2015).

Por el contrario, en nuestro caso, en medio ácido en presencia de HCl se observó un pico mucho mayor al esperado ($214,05 \pm 8,14\%$) (figura 3.3 D; tabla 3.4), lo que nos indica que en presencia de HCl podría formarse un clorhidrato, de forma que aumenta la sensibilidad de la muestra.

Por este motivo y para incrementar la sensibilidad del método, se pone a punto un segundo método analítico en el cual se emplea una disolución de morin en etanol, a la cual se añade HCl para formar el clorhidrato (método B) (Alonso, et al., 2020).

Protocolo A: Morin disuelto en metanol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Protocolo B: Morin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en una mezcla de metanol:HCl 0,1N (50:50 v/v), bajo agitación magnética constante durante dos horas.

En la figura 3.1 se muestran los cromatogramas obtenidos para ambos métodos para una concentración de morin 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El área bajo la curva correspondiente al pico obtenido con el método B es mayor y muestra además mayor simetría y una mejor definición.

4.1.2. Análisis estadístico de los resultados

A partir de las condiciones de trabajo previamente seleccionadas se lleva a cabo la puesta a punto de ambos métodos analíticos: El método A, el cual emplea muestras disueltas solamente en metanol y el método B, cuyas muestras se disuelven en una solución de metanol:HCl 50:50 (v/v).

En la tabla 3.5 se muestra el rango de concentraciones empleado para el método A (5-30 $\mu\text{g/mL}$) y para el método B (1-30 $\mu\text{g/mL}$) con sus correspondientes valores medios de áreas de los picos del cromatograma.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Método A (área del pico)	Método B (área del pico)
1	-	57548,4
5	164684,3	277847,5
10	308038,0	605429,0
15	432403,5	911907,5
20	601203,0	1225692,0
30	860565,8	1819582,0

Tabla 3.5: Áreas de los picos cromatográficos obtenidos por los métodos A y B de análisis de morin.

Las curvas de calibración obtenidas mediante los métodos A y B se representan en la figura 3.5.

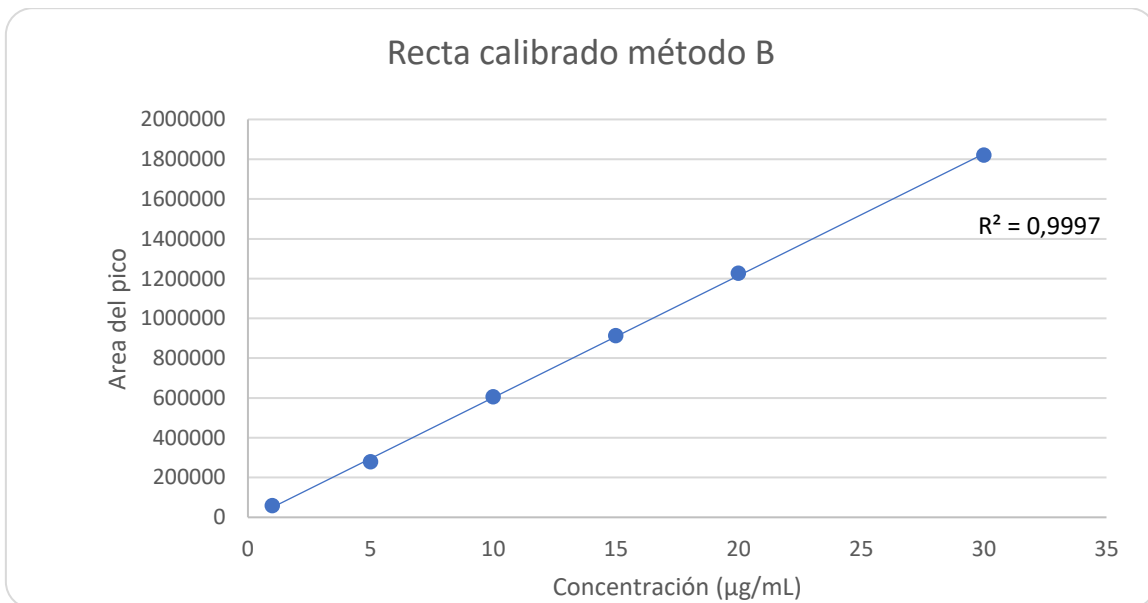
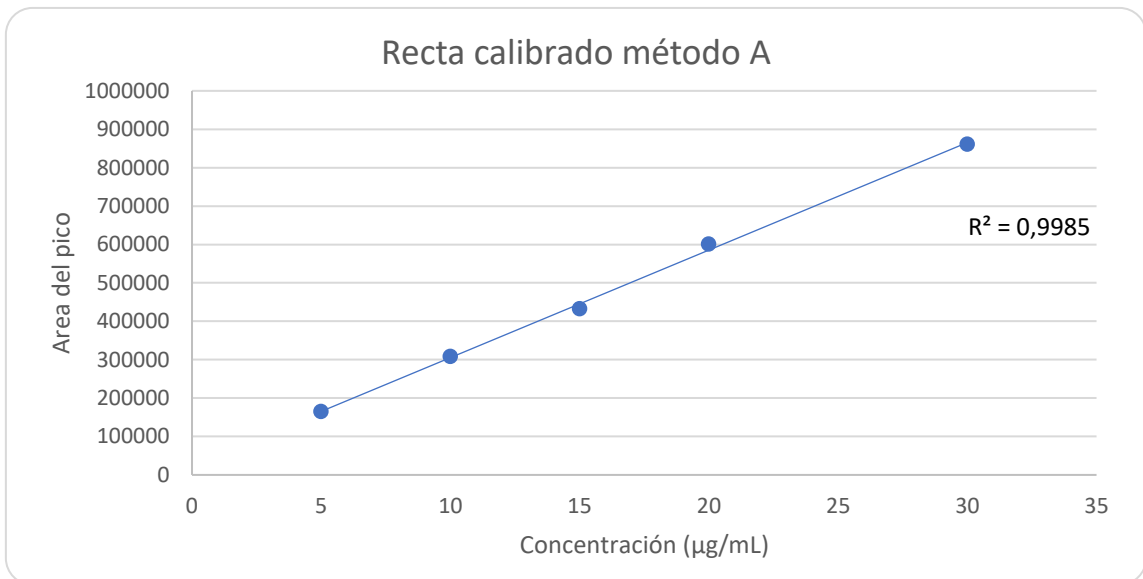


Figura 3.5: Curvas de calibración obtenidas por los métodos A y B de análisis de morin.

Linealidad

La tabla 3.6 muestra los resultados de linealidad correspondientes a los métodos A y B.

	Método A	Método B
Rango ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	5-30	1-30
Coefficiente de correlación (r)	0,9970	0,9993
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9940	0,9987
Pendiente	28026,95	61986,31
Error típico de la pendiente	602,689	544,691
Estadístico-t pendiente (valor-p)	46,5031 (0,0000)	113,8008 (0,0000)
Ordenada al origen	9515,80	-4625,74
Error típico de la intercepción	10948,40	9035,41
Estadístico-t intercepción (valor-p)	0,8691 (0,4005)	-0,5119 (0,6157)
F-ANOVA test de regresión (valor-p)	2162,54 (0,0000)	12950,63 (0,0000)

Tabla 3.6: Resultados del análisis de la linealidad obtenidos por los métodos A y B.

El ANOVA de la regresión permite evaluar la correlación existente entre la absorbancia y la concentración. Existe una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p=0,0000$) para ambos métodos, que presentan coeficientes de correlación de 0,9970 para el método A y de 0,9993 para el B. Esta correlación significativa entre la absorbancia y la concentración se confirma a partir de las pendientes de las rectas de calibración, con una probabilidad asociada al estadístico “t” de Student inferior a 0,05, que no difiere significativamente de cero ($p=0,000$) en ninguno de los dos métodos. Los valores de “t” de Student obtenidos para las ordenadas al origen, son significativamente distintos de cero y permiten demostrar que el método es proporcional ($p > 0,05$). Por tanto,

en ambos métodos la ordenada al origen no difiere significativamente de cero, para un nivel de probabilidad del 95%.

Resolución de los picos e idoneidad del sistema cromatográfico

La tabla 3.7 muestra los tiempos de retención, el factor de simetría y el número de platos teóricos obtenidos para ambos métodos A y B (tabla 3.7).

	<i>R</i>	<i>N</i>	Tr (min)	<i>T</i> (±DE)
Método A	7,71	2936	6,79	0,77±0,005
Método B	13,91	4032	6,81	1,09±0,01
Límites requeridos	$R > 2$	$N > 2,000$		$T < 2$

Tabla 3.7: Resultados de la idoneidad de los métodos A y B.

Exactitud

Los resultados del ensayo para determinar la exactitud de ambos métodos se resumen en las tablas 3.8 y 3.9

Concentración de morin ($\mu\text{g/mL}$)	Método A		
	Recuperación ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (%)	Media \pm DE CV %
1	-	-	
1	-	-	-
1	-	-	
5	5,34	106,91	102,44 \pm 5,08 4,96%
5	5,17	103,48	
5	4,84	96,91	
10	10,28	102,84	92,90 \pm 9,99 10,72%
10	8,28	82,85	
10	9,30	93,02	
15	14,57	97,13	97,40 \pm 1,21 1,24%
15	14,45	96,36	
15	14,81	98,73	
20	20,38	101,92	95,58 \pm 5,49 5,74%
20	18,50	92,50	
20	18,46	92,31	
30	29,32	97,73	97,02 \pm 2,01 2,07%
30	28,42	94,75	
30	29,57	98,58	

Tabla 3.8: Resultados de la determinación de la exactitud del método A.

Concentración de morin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Método B		
	Recuperación ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recuperación (%)	Media \pm DE %CV
1	1,03	103,28	100,3 \pm 2,98 2,97%
1	1,00	100,30	
1	0,97	97,32	
5	4,86	97,26	99,94 \pm 2,37 2,38%
5	5,04	100,8	
5	5,09	101,8	
10	10,22	102,21	101,46 \pm 2,74 2,70%
10	9,84	98,42	
10	10,37	103,74	
15	15,50	103,37	100,83 \pm 2,41 2,38%
15	14,79	98,57	
15	15,08	100,55	
20	20,61	103,04	100,67 \pm 2,07 2,06%
20	19,85	99,24	
20	19,94	99,72	
30	29,51	98,37	99,47 \pm 2,15 2,16%
30	29,43	98,10	
30	30,58	101,94	

Tabla 3.9: Resultados de la exactitud del método B.

El porcentaje de recuperación de las muestras preparadas oscila entre el 82,85% y el 106,91% para el método A, pero con valores del CV de hasta 10,7%; mientras que el método B, presenta valores de recuperación comprendidos entre 97,27% y 103,74%, con valores CV de un 2,9%.

Los CV obtenidos con el método A son excesivamente elevados. Además, de acuerdo a la USP, los porcentajes de recuperación deberían encontrarse entre 97% y el 103% (USPNF, 2020), algo que no se cumple con el método A. Por ello, el método A no cumple con el criterio de exactitud para la determinación de MH en el rango de concentraciones estudiadas.

Precisión

Las medidas intradía e interdía de precisión se expresaron en forma de CV (%). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3.10 y 3.11.

Concentración de morin (µg/mL)	Intradía			Interdía		
	Recuperación media (%)	CV(%)	ER(%)	Recuperación media (%)	CV(%)	ER(%)
5	99,71	6,20	-0,28	95,95	6,77	-4,09
15	104,20	3,66	4,20	102,55	5,50	2,55
30	104,60	2,10	4,60	105,49	5,63	5,48

Tabla 3.10: Resultados del estudio de precisión del método A. CV (coeficiente de variación) y ER (error relativo).

Concentración de morin (µg/mL)	Intradía			Interdía		
	Recuperación media (%)	CV(%)	ER(%)	Recuperación media (%)	CV(%)	ER(%)
5	98,11	3,54	-1,89	97,12	3,13	-2,87
15	100,30	0,92	0,30	100,08	2,18	0,08
30	100,90	2,47	0,90	97,34	3,38	-2,65

Tabla 3.11: Resultados del estudio de precisión del método B. CV (coeficiente de variación) y ER (Error relativo)

Con el método A, la precisión interdía presentó valores de CV comprendidos entre 5,50% y 6,77% y de 2,10-6,20% para la precisión intradía. Por lo que se refiere al método B, los CV obtenidos para la precisión interdía e intradía fueron inferiores, con valores de 2,18-3,38% y 0,92-3,54% respectivamente. En ambos casos, los valores obtenidos pueden considerarse aceptables, no obstante, el método B presenta coeficientes de variación más bajos y por tanto, más adecuados.

4.2. Resultados de la cuantificación de morin hidrato en tampón PBS por espectrofotometría UV.

En la tabla 3.12 se recogen los valores medios de la absorbancia obtenidos a las distintas concentraciones de la recta de calibración de morin preparada en tampón PBS a pH 7,4 y analizada por espectrofotometría UV. Las rectas de calibrado se representan en la figura 3.6

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia media \pm DE
1	0,0265 \pm 0,0088
2,5	0,1082 \pm 0,0049
5	0,2492 \pm 0,0039
7,5	0,3764 \pm 0,0033
10	0,5207 \pm 0,0046
12,5	0,6628 \pm 0,0119
15	0,8072 \pm 0,0164

Tabla 3.12: Absorbancias medias correspondientes a las 3 rectas de calibrado.

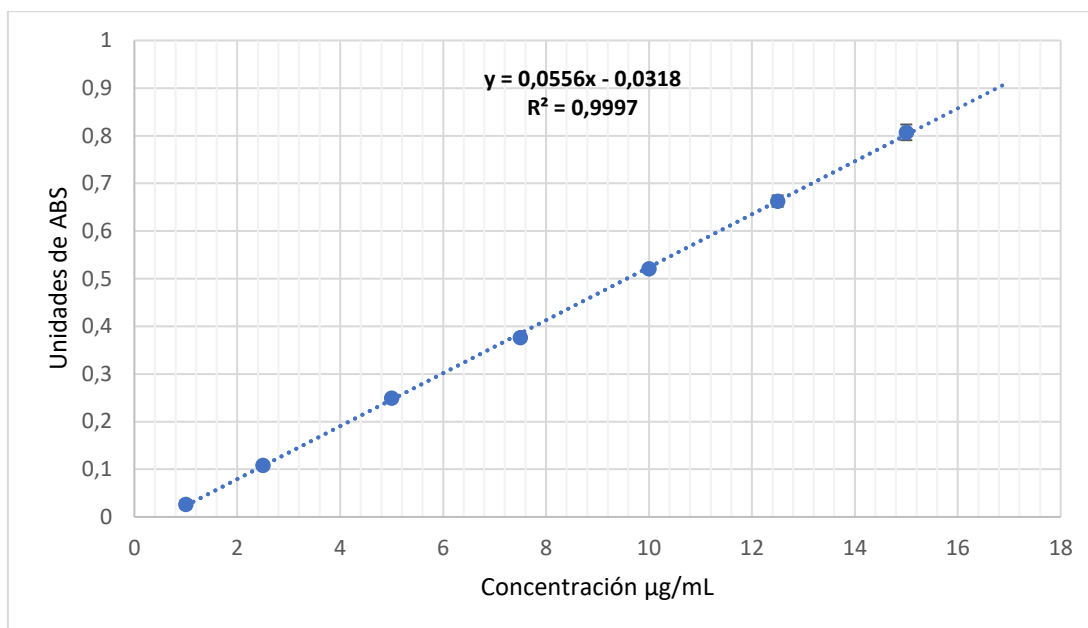


Figura 3.6: Representación conjunta de las 3 rectas de calibrado del método espectrofotométrico.

Linealidad

En la tabla 3.13 se resumen los resultados del tratamiento estadístico realizado para evaluar la linealidad del método espectrofotométrico.

	Valores
Rango (µl/mL)	1-15
Coefficiente de correlación (r)	0,99949
Coefficiente de determinación (r ²)	0,99898
Pendiente	0,055
Error típico de la pendiente	0,000408
Estadístico-t pendiente (valor-p)	136,1383 (0,0000)
Ordenada al origen	-0,03
Error típico de la intercepción	0,003683
Estadístico-t intercepción (valor-p)	-8,6347 (0,0000)
F-ANOVA test de regresión (valor-p)	1,49087 (0,0000)

Tabla 3.13: Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la regresión para el método de cuantificación por espectrofotometría UV.

Los resultados obtenidos del análisis de la varianza de la regresión permitieron confirmar la correlación existente entre la absorbancia y la concentración. La probabilidad asociada a los estadísticos F de *Snédecor* y t de *Student*, indicaron la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables. Por tanto, con el estadístico F, se puede afirmar que los datos se ajustan al modelo lineal propuesto, al obtenerse un valor $p < 0,05$ ($p = 0,0000$) para un nivel de probabilidad del 95%. Al mismo tiempo, el estadístico *t-Student* de la pendiente indica que difiere significativamente de cero con un valor $p < 0,05$ ($0,0000$) para el mismo nivel de probabilidad. No obstante, la ordenada en el origen difiere significativamente de cero pues presenta un valor $p < 0,05$ ($0,0000$) para un nivel de confianza del 95%, por tanto el método no es proporcional y la ordenada al origen difiere significativamente de cero.

Los resultados obtenidos nos permiten indicar que el método es lineal y puede ser empleado para la cuantificación de morin liberado a partir de las nanopartículas en los estudios de cesión *in vitro*.

Exactitud

El estudio de la exactitud del método espectofotométrico, se llevó a cabo empleando PLGA y MH Para ello, se calcularon los porcentajes de recuperación del analito en cada muestra y los coeficientes de variación. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.14

Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje recuperación (%)	Recuperación media (%)	Desviación típica	CV (%)
5	5,04	100,72			
5	5,00	100,04	101,17	1,42	1,40
5	5,14	102,77			
10	9,90	99,03			
10	10,08	100,38	99,42	0,83	0,84
10	9,88	98,85			
15	14,90	99,36			
15	15,44	102,91	100,63	1,97	1,96
15	14,95	99,64			

Tabla 3.14: Resultados del estudio de la exactitud del método de cuantificación de morin por espectrofotometría UV.

Los resultados obtenidos demuestran que se trata de un método de detección exacto para concentraciones de morin iguales o superiores a $2,5 \mu\text{g/mL}$ ($CV < 5\%$).

A la luz de estos resultados se puede afirmar que se trata de un método analítico adecuado para la detección y cuantificación de morin liberado a partir de las nanopartículas en los ensayos de cesión in vitro.

*IV NANOPARTÍCULAS DE PLGA
FUNCIONALIZADAS CON UN DIPÉPTIDO DE
FENILALANINA*

1. INTRODUCCIÓN

En la BHE la permeabilidad de las sustancias es muy limitada. Los capilares del endotelio cerebral presentan uniones estrechas de tamaños cercanos a los 200 nm; esto unido a la inexistencia de canales paracelulares y a los escasos y restrictivos tipos de canales transcelulares, impide el paso de la mayor parte de las sustancias. Únicamente agua, gases, sustancias liposolubles de pequeño tamaño (400-600 Da) y los nutrientes esenciales, como glucosa y algunos aminoácidos, son capaces de atravesar la barrera. Este estricto control del paso se complementa con un mecanismo de eflujo constituido por la gp-P. La acción de esta bomba está destinada a la eliminación de sustancias tóxicas y desechos metabólicos, pero restringe la posibilidad de acción de muchos fármacos con interesantes acciones terapéuticas.

En este aspecto las nanopartículas poliméricas elaboradas con polímeros biodegradables y biocompatibles, como el PLGA, suponen una estrategia interesante para conseguir el acceso de sustancias que no pueden atravesar la BHE y acceder al SNC. Sin embargo, las cantidades de nanopartículas que logran alcanzar el SNC son reducidas, dado que se distribuyen por todos los tejidos del organismo.

La BHE presenta en su superficie canales LAT-1 con elevada afinidad por la fenilalanina o tirosina, aa precursores de numerosos neurotransmisores (Gardiner, 1990). Algunos estudios han indicado que la presencia de estos aminoácidos puede suponer una mejora a través de la barrera para los nanosistemas que incorporan en su superficie péptidos (Vyas, et al., 2015).

La rodamina B (Rh) es una sustancia fluorescente que no atraviesa la BHE. Su estructura es de gran tamaño y la presencia de dos aminos ternarios (figura 4.1) impiden a esta molécula pasar los obstáculos que genera la BHE (Chen, et al., 2017). Es por esto, que se puede emplear como un marcador fluorescente para determinar la capacidad de paso de BHE de las NPs que contienen esta sustancia.

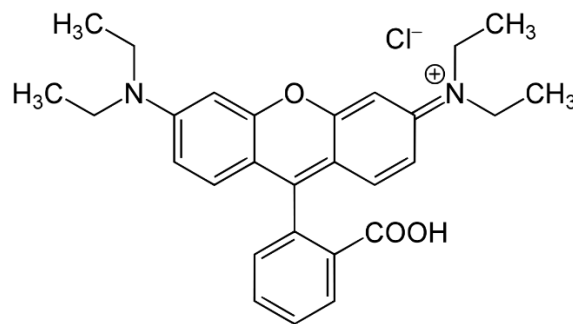


Figura 4.3: Estructura química del marcador de fluorescencia Rodamina-B.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es elaborar nanopartículas de PLGA cargadas con rodamina B y funcionalizadas con un dipéptido de fenilalanina, para favorecer el paso a través de la BHE y el acceso de la rodamina B al SNC.

Objetivos parciales:

- Elaborar nanopartículas de PLGA cargadas con rodamina B.
- Elaborar nanopartículas de PLGA cargadas con rodamina B y, posteriormente, funcionalizar. con el péptido fenilalanina-fenilalanina, la superficie de las mismas.

- Elaborar nanopartículas de PLGA-fenilalanina-fenilalanina y PLGA cargadas con rodamina B.
- Realizar estudios de biodistribución de las nanopartículas en diferentes órganos: hígado, pulmón, riñón y bazo.
- Evaluar el paso a través de la barrera hematoencefálica de las diferentes formulaciones en un modelo animal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de nanopartículas de Rodamina B

3.1.1. Nanopartículas de PLGA

Para la elaboración de NPs por el método de extracción-evaporación del solvente se pesan 50 mg de PLGA que se disuelven en 1,5 mL de diclorometano (Fisher Scientific®, España). A esta solución se adicionan 2,5 mg de Rh (Fisher Scientific®, España) disueltos en 0,5 mL de DCM; y mediante agitación en vórtex se asegura una mezcla homogénea. La solución resultante se incorpora sobre 6 mL de una disolución acuosa de PVA al 1,5%. La mezcla resultante (fases orgánica y acuosa) se somete a agitación en sonicador (Accumet® AE150, Fisher Scientific, España) en pulsos de 10/15 segundos on/off durante 10 minutos, el vial debe mantenerse en un baño de hielo para prevenir el aumento de la temperatura. Pasado ese tiempo, la dispersión resultante se mantiene en

agitación magnética moderada durante 2,5 horas, para permitir la evaporación del disolvente orgánico y la formación de las NPs.

Una vez eliminado el disolvente orgánico las NPs se centrifugan a 13.000 rpm (Sorvall ST8R Thermo Fisher®, España), el sobrenadante se retira, las NPs se resuspenden en agua destilada y se centrifugan 3 veces para asegurar la total eliminación del PVA. Tras el último centrifugado, las NPs se suspenden en 1 mL de sacarosa al 1,5%, precongeladas y liofilizadas durante 24 horas (Lyo Quest®, Azbil Telstar® S.A., España). Se han preparado también lotes de NPs de esta formulación sin rodamina B.

La figura 4.2 refleja un esquema del proceso de elaboración seguido en este método.

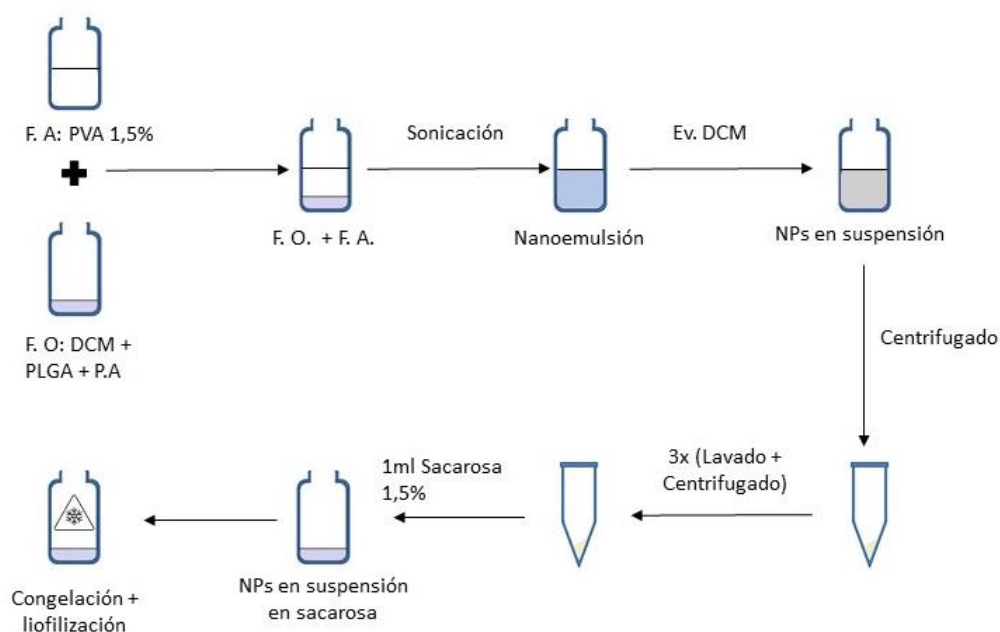


Figura 4.4: Esquema de elaboración de NPs por el método de la extracción-evaporación del solvente.

3.1.2. Nanopartículas de PLGA funcionalizadas en superficie con fenilalanina.

Las NPs funcionalizadas en superficie con un dipéptido de fenilalanina (phe-phe) se elaboran con 50 mg de PLGA 502 y 2,5 mg de Rh (NPpheA-Rh) por el método de extracción-evaporación del solvente previamente descrito. La unión del péptido se realiza sobre la superficie de las NPs elaboradas, al activar los grupos carboxilo del PLGA.

Para la unión del dipéptido a la superficie, las NPs cargadas con Rh se mantienen en 1 mL de H₂O destilada durante 24 horas refrigeradas a 4°C. Para realizar el proceso de funcionalización se adaptó el protocolo descrito por Constantino et al. (Constantino, et al., 2005). A 55 mg de NPs suspendidas en 1 mL de H₂O destilada, se adicionan 0,5 mL de una solución tamponada de MES 0,1M (ácido 2-(4-morfolino)-etano sulfónico) (Fisher Scientific, España) con pH ajustado a 4,7. A esta solución se le añaden 50 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Acros Organics, Bélgica). Seguidamente se incorporan 150 mg de 1-etil-3(3-dimetilamino-propil) carbodiimida hidroclicrato (EDC) disueltos en 2,5 mL de tampón MES. La suspensión de NPs se mantiene en agitación magnética durante 1 hora. Pasado este tiempo, se centrifugan las NPs a 13.000 rpm durante 25 minutos, para retirar el tampón MES junto con los reactivos que no hayan reaccionado. A continuación, se resuspenden las NPs en 2,5 mL de tampón fosfato (PBS) ajustado a pH 7,4. Sobre esta segunda suspensión se incorporan 2 mg de phe-phe disueltos en 2,5 mL de PBS a pH 7,4; manteniéndose en agitación magnética durante 2 horas para asegurar la reacción. Finalmente, se procede a centrifugar las NPs a 13.000 rpm durante 30 min, antes de añadir el crioprotector (sacarosa 1,5%) y liofilizarlas. El PBS sobrenadante se

recoge y se cuantifica la cantidad de phe-phe que no se ha unido a la superficie. También se han preparado lotes de NPs de esta formulación sin rodamina B (NPpheA).

La figura 4.3 muestra las reacciones que tienen lugar durante el proceso de funcionalización con phe-phe:

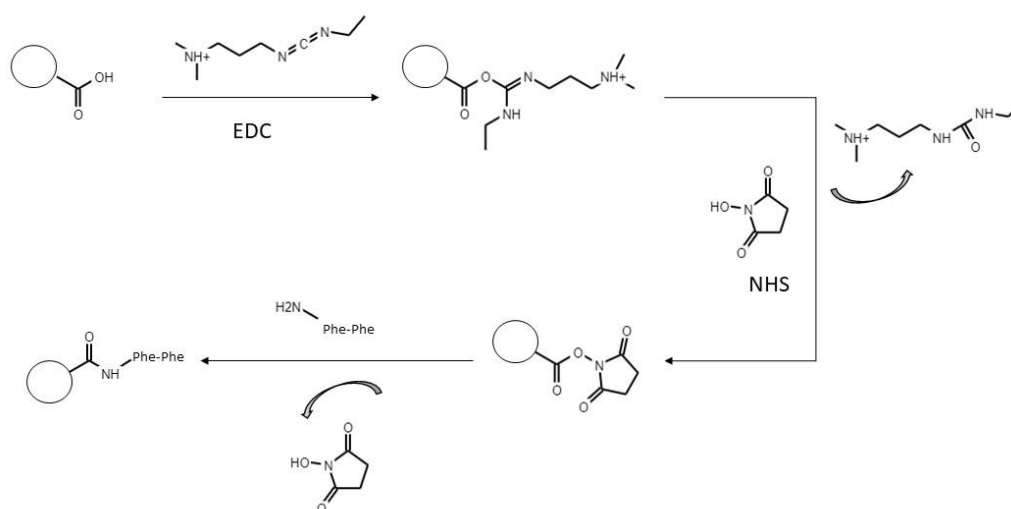


Figura 4.3: Esquema de las reacciones de unión del péptido phe-phe a las NPs.

3.1.3. Nanopartículas elaboradas con PLGA-phe-phe y PLGA

Para la elaboración de esta formulación (NPpheB-Rh), se emplea PLGA 502 al que previamente se ha unido el phe-phe. En este caso, la fenilalanina se une por un enlace covalente peptídico al PLGA antes de la formación de las nanopartículas.

En la unión del péptido y el polímero podemos distinguir dos etapas: activación del polímero y síntesis del PLGA-phe-phe.

Durante la etapa de activación del polímero 2,5 g de PLGA se disuelven en DMC anhidro (7 mL) que se hacen reaccionar con un exceso de

NHS (68 mg) en presencia de EDC (115 mg), manteniéndose en agitación durante 22 horas en atmósfera de argón. La solución resultante se incorpora por goteo sobre 10 mL de una mezcla de éter etílico y metanol (1:1) enfriada en hielo, procurando así que el producto precipite. En esta etapa se obtiene un residuo sólido, que se separa por decantación y lavado con una mezcla de éter-metanol, para eliminar los subproductos resultantes de la reacción. El precipitado restante se diluye nuevamente con 15 mL de DCM y la solución se deshidrata con sulfato de sodio anhidro. A continuación, el disolvente se elimina mediante vacío en un baño termostático, obteniéndose 2,2 g de un polvo blanco. El sólido resultante se liofiliza para obtener PLGA-NHS en forma de polvo blanco.

La figura 4.4 resume la reacción.

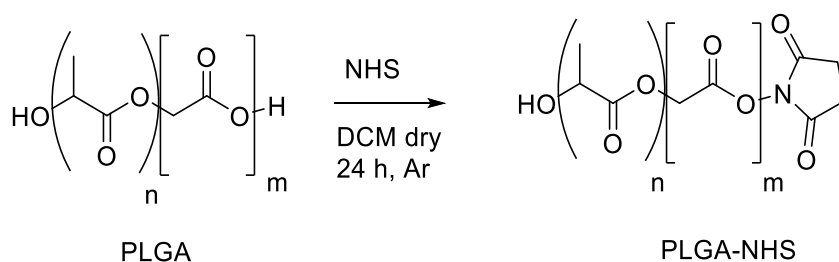


Figura.4.4: Esquema de la reacción de activación del PLGA con NHS/EDC.

En la etapa de síntesis del PLGA-phe-phe, 502 mg de PLGA-NHS se hacen reaccionar con 200 mg de péptido phe-phe en 12 mL de DCM anhidro y 0,1 mL de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). La reacción se lleva a cabo durante 40 horas, manteniendo una agitación intensa y una atmósfera de argón. La mezcla resultante fue concentrada mediante vacío en baño termostático y posteriormente lavada con 15 mL de una mezcla de éter de petróleo-metanol (10:90). El precipitado resultante se separa por decantación y se lava repetidas veces con idéntica mezcla, con el fin de

eliminar las impurezas de la reacción. El sólido recuperado se liofiliza para obtener de esta manera 120 g de un polvo blanco-amarillento de PLGA-phe-phe.

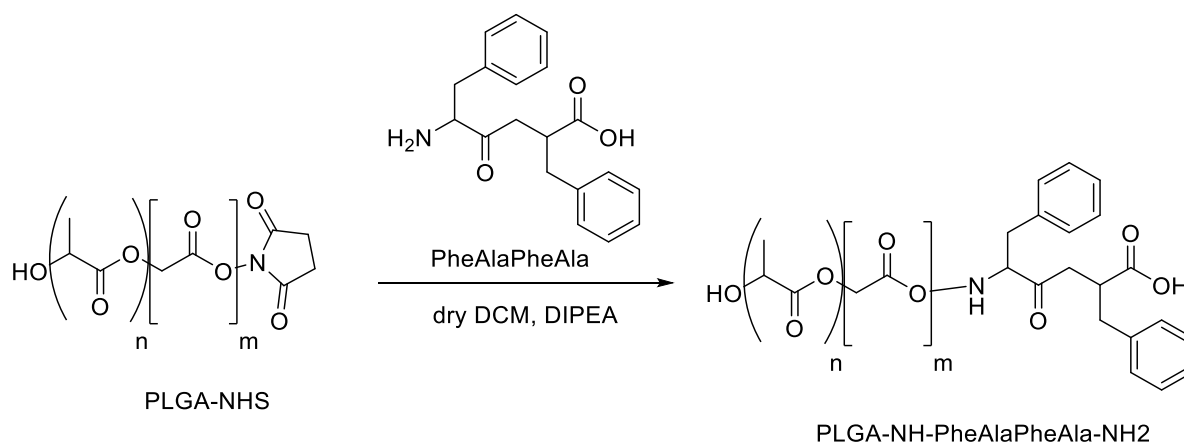


Figura 4.5: Síntesis del PLGA-phe-phe mediante la unión del péptido phe-phe al PLGA activado.

Para la elaboración de las NPs se emplea una mezcla de 50 mg de PLGA-phe-phe y PLGA en una proporción 40:60. Las NPs se elaboran por el método de extracción-evaporación del solvente que se ha explicado anteriormente, empleando 2,5 mg de Rh como activo. Siguiendo el mismo protocolo se elaboran nanopartículas blancas de esta formulación (NPpheB).

La tabla 4.1 muestra las formulaciones de nanopartículas de morin elaboradas:

Formulación	PLGA 502	PLGA -PhePhe	Phe-Phe	Rh
NP-Rh	50 mg	-	-	2,5 mg
NPpheA-Rh	50 mg	-	2 mg	2,5 mg
NPpheB-Rh	30 mg	20 mg	-	2,5 mg

Tabla 4.1: Resumen de la composición de las formulaciones elaboradas

3.2. Caracterización de las formulaciones

3.2.1. Determinación de la cantidad de péptido unido a las formulaciones NPpheA

La cuantificación del péptido phe-phe unido a la formulación NPpheA, se realiza mediante un método de cuantificación de fenilalanina por fluorescencia, adaptado a nuestras condiciones (Neurauter, et al., 2013). Este método emplea como fase móvil una solución acuosa de KH_2PO_4 a una concentración 15 mM, y con un flujo de 0,9 mL/min. El detector de fluorescencia se configura para una longitud de onda de excitación de 210 nm y una lectura de emisión a 302 nm. Se han realizado cinco rectas de calibrado a concentraciones de 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$.

La cuantificación de la cantidad del péptido unido a las NPs después de su formación, se ha realizado de manera indirecta. Una muestra diluida del sobrenadante de la reacción de funcionalización se ha analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Jasco, Jasco International Co Ltd, Japón) con un detector de fluorescencia acoplado (Jasco FP-4025 fluorescence detector, Jasco International Co Ltd, Japón). Los ensayos de realizan por duplicado.

3.2.2. Determinación de la unión del péptido al PLGA en las formulaciones NPpheB

El proceso de unión del péptido phe-phe al PLGA es una reacción compleja. Para poder asegurar que el producto obtenido en cada una de las etapas del proceso de síntesis es el esperado, los subproductos resultantes se han analizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

El RMN es una técnica espectroscópica que puede emplearse para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones, neutrones o de ambos. En condiciones normales los espines de estos átomos se orientan al azar. Sin embargo, cuando se someten a la influencia de un campo magnético, adquieren una conformación ordenada: los espines positivos se orientan en la misma dirección del campo (estado conocido como espín- α) mientras que los espines negativos se orientan en dirección contraria al campo (espín- β). La diferencia de energía entre los dos estados α y β depende de la fuerza del campo magnético aplicado.

En una muestra con compuestos orgánicos que es irradiada brevemente con un pulso intenso de radiación, los núcleos en estado α son promovidos al estado β . Cuando los núcleos vuelven a su estado original, emiten una señal que es detectada por el espectrómetro RMN y registrada en forma de una gráfica de frecuencias frente a intensidad.

El análisis de las muestras se lleva a cabo disolviendo 5 mg de muestra, procedente de cada una de las etapas, en 10 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3). De la solución resultante se toma una alícuota de aproximadamente 1 mL en un tubo de resonancia magnética, que se analiza mediante los espectrofotómetros del CAI de resonancia magnética, en unas condiciones de trabajo de 250 MHz para resonancia ^1H . Sobre los espectros obtenidos se identifica la señal correspondiente a los sustituyentes de interés.

3.2.3. Determinación del tamaño de partícula

Con el objetivo de determinar el tamaño medio y la distribución de tamaños de todas las formulaciones elaboradas se ha empleado la técnica de difracción de rayos láser, para ello se empleó un equipo Zetatrac® Ultra (Microtac, Inc., EE.UU.). Se determina el diámetro medio de las NPs como diámetro volumen (DV) y la distribución de tamaños, mediante curvas distributivas de volumen.

Alteraciones en la metodología pueden dar lugar a cambios en el tamaño final de las NPs. Para evaluar si la técnica empleada es adecuada conviene determinar la dispersión de la distribución de tamaños de las formulaciones, por ello se calcula el valor de span y el índice de polidispersión (IP).

Para calcular los valores de span de cada una de las distribuciones obtenidas se ha empleado la siguiente ecuación:

$$span = \frac{Percentil\ 90 - Percentil\ 10}{Percentil\ 50}$$

Valores de span elevados indican una distribución heterogénea; un valor de span se considera adecuado cuando es inferior a 1, lo que significa que la población es monodispersa.

El IP nos indica la anchura y distribución de tamaños moleculares, y es la relación entre el promedio en peso y en número. Para el cálculo del IP se emplea la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{SD}{Tamaño\ medio}$$

Valores de IP comprendidos entre 0,1-0,5 indican una población monodispersa, mientras que valores superiores a 0,7 reflejan una amplia distribución de tamaños y por tanto, una muestra polidispersa.

3.2.4. Estudios morfológicos

El análisis morfológico de las formulaciones se ha realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM, Jeol, JSM 7600F, Japón). Este estudio permite determinar la forma, homogeneidad de tamaños, estado de agregación de las partículas y presencia de alteraciones en la superficie, que son aspectos que pueden tener una influencia en el perfil de liberación del principio activo desde la NPs.

Para la realización del análisis, las muestras se fijan mediante cinta adhesiva de fibra de carbono a portamuestras, que se recubren con oro coloidal como agente conductor.

3.2.5. Propiedades superficiales

La determinación del potencial zeta de las distintas formulaciones de NPs se ha realizado mediante la técnica de dispersión de luz; se utiliza para ello el equipo Zetasizer Nano S[®] (Malvern Instrument's, Reino Unido), que emplea una célula capilar Capillary cell enhancer[®] (Malvern Instrument's, Reino Unido) para la lectura de muestras. Para ello se prepara una suspensión de las formulaciones en agua destilada a una concentración de 100 µg/mL. Las muestras se agitan en vórtex a velocidad moderada durante 1 minuto, para asegurar la dispersión de las NPs.

El potencial Z (pZ) se ha determinado en las formulaciones NP-Rh; NPpheA-Rh y NPpheB-Rh, y se ha comparado con el obtenido para las formulaciones que no incorporan principio activo.

3.2.6. Determinación de la cantidad de Rh encapsulada

Para la determinación del contenido en Rh de las NPs cargadas con el flavonoide se pesan 10 mg de la formulación y se disuelven en 1 mL de DCM bajo agitación en vórtex. A continuación, se adicionan 4 mL de metanol (Fisher Scientific, España). Al ser el PLGA insoluble en MetOH, este precipita. Seguidamente, se cuantifica por espectrofotometría la cantidad de principio activo encapsulado, que se expresa como microgramos de Rh en 100 mg de NPs.

Para la cuantificación de Rh en metanol, se ha puesto a punto un método por espectrofotometría, para ello se emplean concentraciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 y 5 µg/mL de Rh en MetOH. La recta de calibrado se ha repetido 5 veces y se obtuvo como resultado la siguiente ecuación media:

$$y = 0,1992x + 0,0098$$

El valor de R² obtenido es de 0,9998; el cual resulta adecuado para el análisis.

3.2.7. Ensayos de cesión

Para la realización de los ensayos de cesión, se pesan 20 mg de NPs, que se introducen en tubos eppendorf y se suspenden en 4 mL de una solución de PBS a pH 7,4. Las muestras se sumergen en un baño termostático Memmert WNB 45 (Memmert®, Alemania) a 37±0,1°C, bajo

una agitación magnética constante de 100 rpm. La toma de muestras se realiza a los siguientes tiempos: 1, 2 y 6 horas. El volumen de muestra extraído se filtra a través de filtros de PVDF de 0,45 μm (Teknokroma Analítica SA, España) y se procede al análisis de las muestras mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 261 nm

Para la cuantificación de Rh en PBS, se ha puesto a punto un método por espectrofotometría, empleando para ello las concentraciones de 0,5; 1; 2; 3; 4 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de Rh en MetOH. La recta de calibrado se ha repetido 5 veces, obteniéndose como resultado la siguiente ecuación media:

$$y = 0,227x - 0,0021$$

El valor R^2 de la ecuación es de 0,9997; el cual resulta adecuado para el análisis en ese rango de concentraciones.

3.3. Estudios de biodistribución

Los estudios de biodistribución se han realizado en ratas Wistar macho de 220-270 g de peso. Las ratas se dividen en 4 grupos experimentales a los que se administran las formulaciones. El número de animales es de 6 ratas en todos los grupos, excepto en el grupo que recibe la formulación de NPs sin funcionalizar (NP-Rh) que está formado por 8 ratas (tabla 4.2). En todos los grupos las ratas se han sacrificado a las 1 hora y 2 horas después de la administración de las formulaciones.

La dosis seleccionada fue de 12,5 mg de NPs, administrada en un volumen de 0,5 mL de suero salino, para un peso medio de 250 g. El volumen administrado a cada rata se ha ajustado en función del peso

exacto de cada animal. La administración se realiza con una jeringuilla de insulina y con agujas de 30 G en la vena lateral de la cola.

El grupo 1 de animales se ha establecido como control y se le administra solamente suero salino. A los demás grupos experimentales (2, 3 y 4) se les administran las formulaciones de NPs correspondientes, tal y como se muestra en la tabla 4.2 (formulaciones NP-Rh, NPpheA-Rh y NPpheB-Rh):

Grupos	Formulación	Número de animales	Tiempo de sacrificio (h)
1	Suero salino	3	1
		3	2
2	NP-Rh	4	1
		4	2
3	NPpheA-Rh	3	1
		3	2
4	NPpheB-Rh	3	1
		3	2

Tabla 4.2: Resumen de las condiciones de administración y sacrificio de los animales durante el estudio de biodistribución.

Tras el sacrificio, se procede a extraer el cerebro, que se divide en los dos hemisferios, los pulmones, el hígado, los riñones y el bazo. Los órganos extraídos se congelan con nieve carbónica y se mantienen a -80°C hasta su posterior análisis.

3.3.1. Biodistribución en tejidos

El análisis de biodistribución de las formulaciones de NPs se ha realizado midiendo la fluorescencia de la Rh contenida en los diferentes órganos estudiados, de acuerdo al método descrito previamente por nuestro equipo de investigación (Marcianes, et al., 2017). Para ello, se pesa en primer lugar cada órgano, del que se toma una porción. A continuación, esta porción se homogeniza en 5 mL de DCM mediante turbina. Seguidamente, las muestras ya homogenizadas se mantienen en maceración protegidas de la luz durante 1 hora, el sobrenadante se centrifuga a 8.000 rpm durante 10 minutos, y se realiza la lectura en un fluorímetro Varian Cary Eclipse, (Agilent Technologies, España). La Rh presenta una longitud de onda de excitación de 553 nm y una longitud de onda de emisión de 627 nm.

Debido a las diferencias en las cantidades de Rh encapsulada entre las distintas formulaciones. Ha sido necesario normalizar los resultados en función de la cantidad existente en la formulación NP-Rh. Los resultados se expresan como ng de Rh por gramo de órgano.

3.3.2. Evaluación del paso de las NPs a través de barrera hematoencefálica

Los estudios de paso a través de la BHE se han realizado por dos métodos distintos: en primer lugar, se realizó un estudio de biodistribución siguiendo el protocolo previamente descrito, con uno de los hemisferios cerebrales. Con el otro hemisferio se han realizado cortes de 30 μm con un micrótopo. Los cortes cerebrales se montan en portamuestras para ser analizados en un microscopio de fluorescencia.

Para ello, las muestras se fijan con formaldehído a los portamuestras y son tratados con DAPI, colorante que se une al material genético de las células intactas y proporciona una fluorescencia azul. Para evaluar la intensidad de Rh en los cortes cerebrales se emplea una longitud de onda de excitación 540 nm y de emisión de 570 nm. Las imágenes se adquieren en un microscopio Leica, modelo DM2000 LED (Leica Microsystems, España) acoplado a una cámara digital Leica DFC3000G (Leica Microsystems, España) para capturar las imágenes con inmunofluorescencia. Las imágenes se obtienen mediante el software Leica LAS, que posteriormente se exportan en formato jpeg

Una vez hecha la tinción, los cortes se observan a 10 aumentos en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas han sido analizadas y tratadas mediante el programa ImageJ (National Institute of Health, EE. UU.). Los datos se expresan como promedio de la intensidad de fluorescencia de las muestras. Para ello se han empleado 8 cortes del área del hipocampo de cada uno de los animales estudiados.

3.3.3. Integridad del tejido cerebral

Con el fin de saber si la administración de las NPs genera algún tipo de daño en tejido cerebral, se ha realizado una tinción de NISSL. La tinción NISSL se lleva a cabo sumergiendo la muestra fijada a un portamuestras en una solución de violeta de cresilo. La muestra se mantiene durante 30 minutos en esta solución. Posteriormente se procede a su lavado, empleando para ello concentraciones crecientes de etanol durante 2 minutos. Finalmente, para asegurar que la muestra queda deshidratada, se realizan dos lavados de 5 minutos en xileno.

Las imágenes se adquirieron en un microscopio Leica, modelo DM2000 LED acoplado a una cámara digital (Leica DFC425 para las capturas a color de las tinciones de violeta de cresilo). Las imágenes se han capturado usando el software Leica LAS y posteriormente son exportadas en formato jpeg.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de las NPs

4.1.1. Determinación de la cantidad de péptido unido a las formulaciones NPpheA-Rh

El método de detección del phe-phe por fluorescencia puesto a punto se ajusta a la siguiente recta de calibración:

$$y = 35447 + 638,32x$$

$$(R2 = 0,9991)$$

Para la cuantificación de la cantidad de phe-phe unida a la superficie de las NPs (NPpheA-Rh), se cuantifica la cantidad remanente de péptido presente en el tampón, resultante del proceso de funcionalización. A partir de estos datos se han obtenido las cantidades de péptido unido a las NPs.

La figura 4.6 muestra, a modo de ejemplo, uno de los picos de fluorescencia obtenidos durante el análisis.

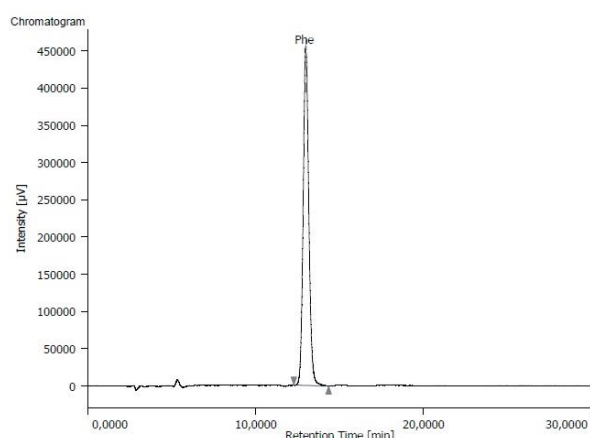


Figura 4.6: Ejemplo del pico obtenido al analizar el sobrenadante con phe-phe.

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 4.3.

Formulación	phe-phe añadido (µg)	phe-phe sobrenadante (µg)	phe-phe unido a NPs (µg)
NPpheA-Rh	2000	1568,67 ± 53,28	431,33 ± 53,28

Tabla 4.3: Cantidad de péptido phe-phe en el líquido sobrenadante y unido a la formulación NPpheA-Rh.

Como se puede observar en la tabla 4.6, la metodología empleada para la unión del péptido phe-phe a las NPs ya elaboradas resultó ser viable, pero altamente ineficiente, debido a que el rendimiento del proceso es bajo. De los 2 mg añadidos (en exceso), solamente se unieron 431 ± 53 µg, lo que supone que solamente un 21,57% de la cantidad inicial ha conseguido unirse a la superficie de las NPs.

Este método de funcionalización se empleará para la elaboración de la formulación de NPs que denominamos NPpheA-Rh.

4.1.2. Determinación de la unión de péptido al PLGA en las formulaciones NPpHeB

Para analizar la unión de phe-phe al PLGA, polímero que se va a emplear para la elaboración de las formulaciones de nanopartículas NPpHeB, se ha llevado a cabo un análisis de RMN de elucidación de la estructura. La figura 4.7 muestra el espectro de H-RMN correspondiente al PLGA en su etapa de activación, y en la figura 8 se muestra el espectro de RMN del PLGA-phe-phe sintetizado y obtenido tras la unión del péptido.

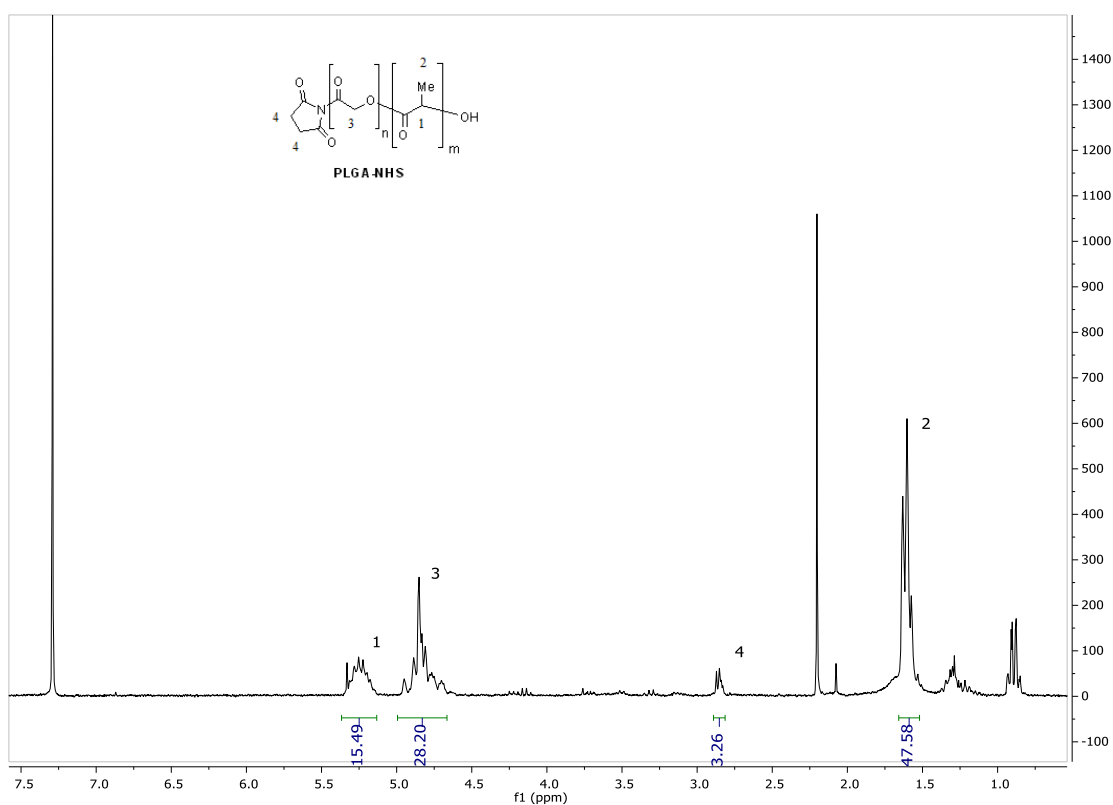


Figura 4.7: Espectro H-RMN del polímero PLGA activado con NHS.

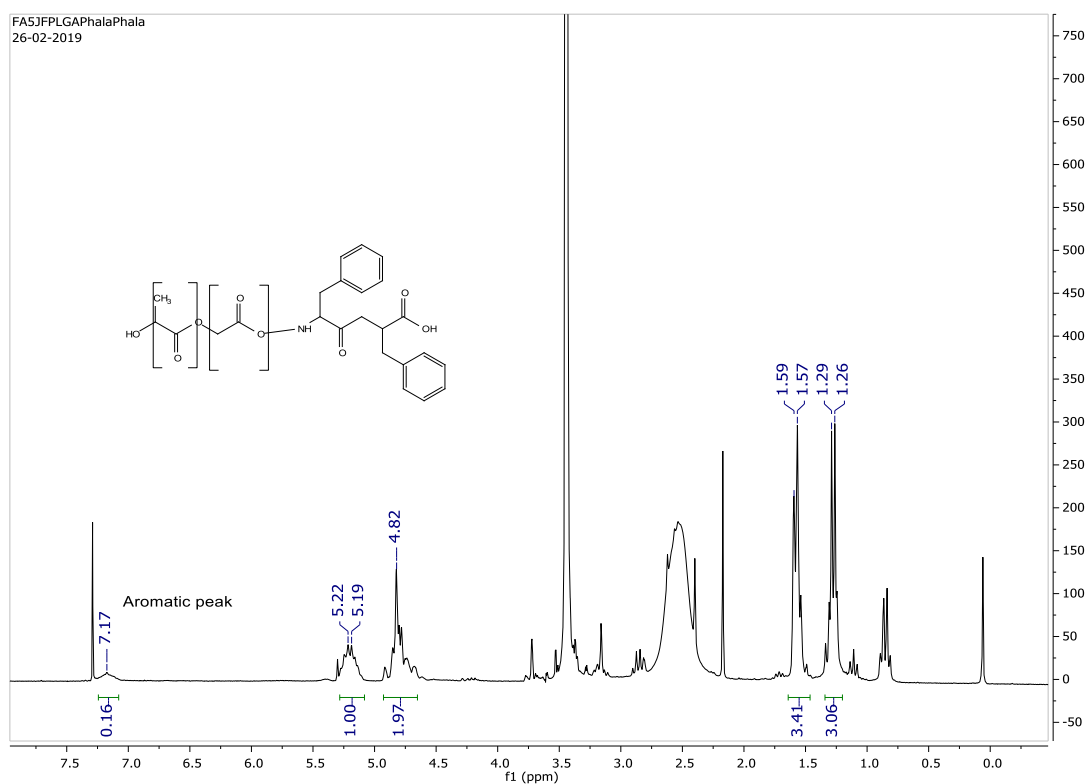


Figura.4.8: Espectro H-RMN del PLGA-phe-phe.

En la figura 4.8 se muestran los cambios en el espectro del PLGA debido a la presencia de fenilalanina. En ella se puede observar un pico a $t = 7,17$, que es característico de los anillos aromáticos presentes en el péptido phe-phe, así como la desaparición del doblete correspondiente a la NHS que debería aparecer a $t = 3,26$ (figura 4.7).

El método de unión del péptido phe-phe al polímero, previo a la elaboración de las NPs de las formulaciones NPpheB, tiene la ventaja de poder controlar la proporción de ligando presente en la formulación. Esta síntesis ha permitido obtener un porcentaje de unión de phe-phe al PLGA del 100%. Por tanto, este nuevo polímero (PLGA-phe-phe) se puede emplear en diferentes proporciones, junto con el polímero PLGA, que no tiene el péptido unido. En nuestro caso, hemos seleccionado una

proporción de 40% de PLGA-phe-phe y 60% de PLGA para la elaboración de las formulaciones de NPs que denominamos NPpheB.

4.1.3. Determinación del tamaño de partícula

En la tabla 4.4 se resumen los resultados medios correspondientes al tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP) y span de las formulaciones de rodamina elaboradas.

Formulación	Diámetro medio (nm) ± DE	IP	span
NP	176,4 ± 13,45	0,22	0,68
NPpheA	195,47 ± 12,99	0,18	0,63
NPpheB	192,77 ± 1,44	0,19	0,67
NP-Rh	187,67 ± 6,92	0,25	0,71
NPpheA-Rh	190,66 ± 4,67	0,31	0,83
NPpheB-Rh	191,03 ± 6,51	0,25	0,67

Tabla 4.4: Resultados medios obtenidos para el tamaño de partícula (±DE), índice de polidispersión y span de las formulaciones de NPs elaboradas.

Como se puede observar, todas las formulaciones presentan tamaños de partícula comprendidos entre 180-198 nm. Dado que ninguno de los valores de IP fue superior a 0,5 ni los valores de span fueron superiores a 1,0, se puede afirmar que se trata de poblaciones de partículas homogéneas y monodispersas. A la vista de los datos obtenidos podemos indicar que el método de elaboración empleado para las NPs resulta apropiado para nuestros objetivos, ya que el tamaño de partícula obtenido fue inferior a 250 nm; este tamaño resulta adecuado para poder atravesar la BHE (Kasinatham, et al., 2015).

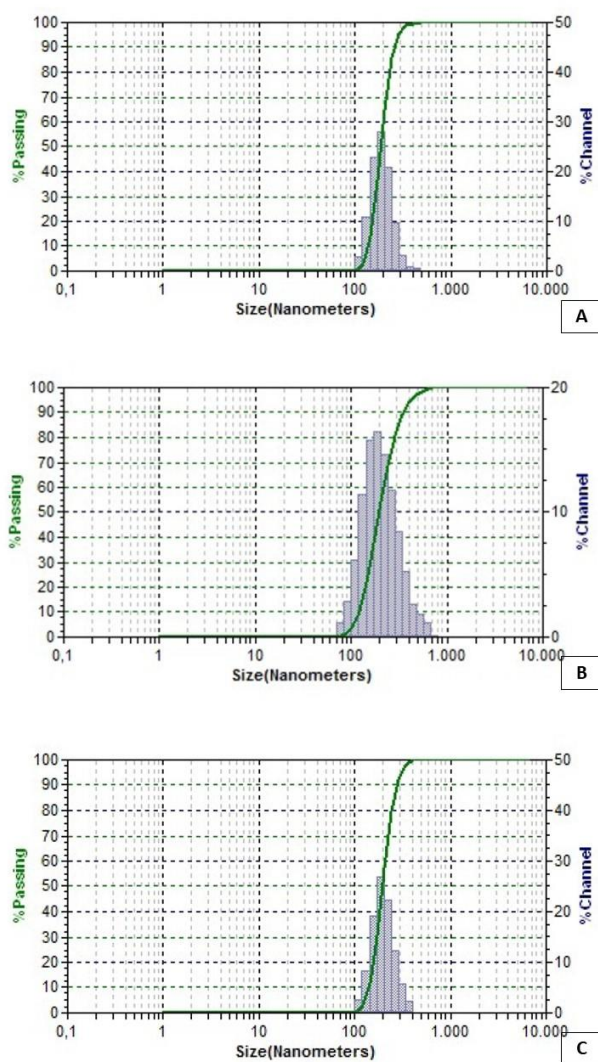


Figura 4.9: Dispersión de tamaños de las distintas formulaciones. A: NP-Rh; B: NPpheA-Rh; C: NPpheB-Rh

4.1.4. Estudios morfológicos (SEM)

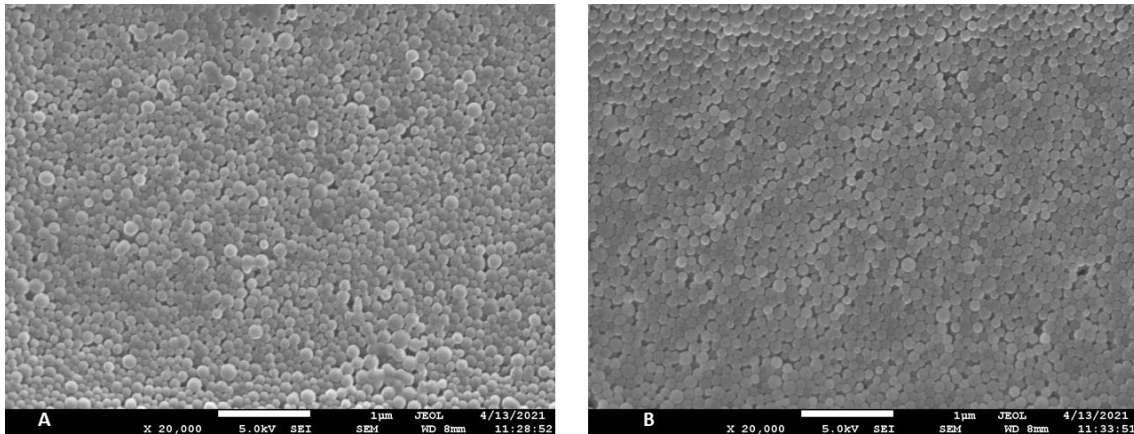


Figura 4.10: Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la formulación NP. A: cargadas con Rh; B: blancas.

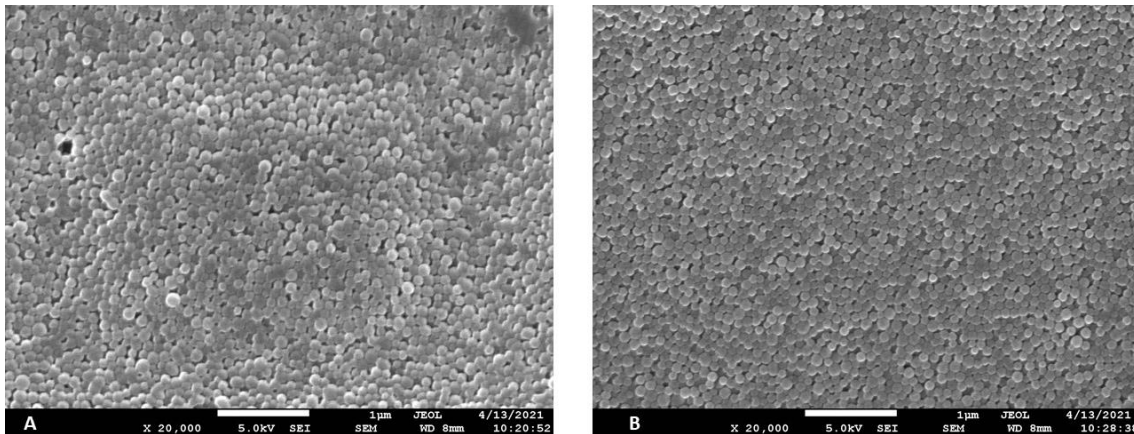


Figura 4.11: Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la formulación NPpHA. A: cargada con Rh; B: blancas.

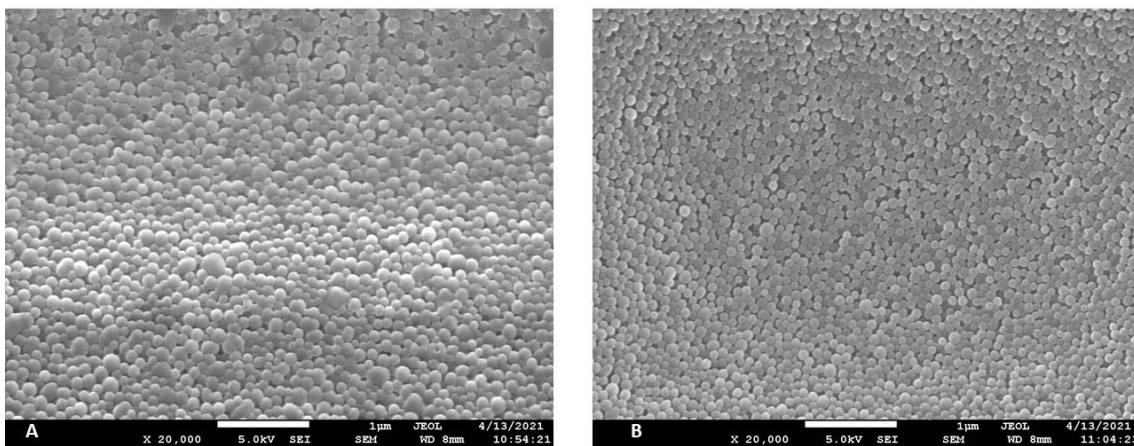


Figura 4.12: Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la formulación NPpHeB. A: cargada con Rh; B: blancas.

Las microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) nos permiten comprobar que todas las formulaciones de NPs presentan una superficie lisa, rígida y con un tamaño homogéneo. No se observaron agregados que podrían dificultar la administración de las formulaciones por vía intravenosa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis por difracción de rayos láser.

4.1.5. Propiedades superficiales

Formulación	Potencial Z NPs Rh \pm DE (mV)	Potencial Z NPs blancas \pm DE (mV)
NP	-22,63 \pm 0,42	-25,4 \pm 1,38
NPpheA	-18,46 \pm 0,74	-20,03 \pm 0,21
NPpheB	-7,88 \pm 0,23	-18,27 \pm 2,15

Tabla 4.5: Potencial Z medio (\pm DE) de las formulaciones NP-Rh, NPpheA-Rh, NPpheB-Rh (columna 1) y NP, NPpheA, NPpheB sin cargar (columna 2).

El potencial Z de las NPs de PLGA blancas es similar al obtenido por otros autores (Vera, et al., 2015; Marcianes, et al., 2017). Este potencial disminuye de forma significativa con la presencia de phe-phe, aunque esta disminución no resulta suficientemente relevante para modificar las características de las partículas. Como se puede observar en la tabla 4.5, se produce un cambio en el potencial Z de todas las formulaciones al incorporar la Rh, en las cuales disminuye su carga negativa. Esto es especialmente marcado en el caso de la formulación NPpheB-Rh, la cual alcanza una carga que podríamos considerar neutra (valores de $P_z \pm 10,0$). Si se tiene en cuenta que la Rh tiene carga positiva, las diferencias encontradas podrían ser debidas a la mayor encapsulación que se produce al elaborar la formulación NPpheB-Rh.

Hoyos-Ceballos et al. (Hoyos-Ceballos, et al., 2020) obtienen similares resultados cuando elaboran NPs de PLGA que son funcionalizadas, antes o después de su elaboración, mediante otros péptidos. Estos autores encuentran que el valor de potencial Z de las NPs pre-funcionalizadas es mucho más parecido al de las NPs de PLGA que el obtenido para las NPs post-funcionalizadas con los mismos péptidos.

Es sabido que valores de potencial Z positivos ($>+10,0$) facilitan el paso de las partículas a través de barreras biológicas, ya que tienen principalmente carga negativa, aunque esto significa también que provocan una mayor activación del sistema inmune (S.I.) y son fagocitadas por macrófagos (Salvador-Morales, et al., 2009). Es por este motivo que, en principio, las cargas neutras o negativas son más adecuadas para que las NPs puedan circular libremente y llegar a su lugar de acción, sin ser eliminadas.

4.1.6. Determinación de la cantidad de Rh encapsulada

La tabla 4.6 muestra los resultados medios obtenidos para la cantidad de rodamina encapsulada y la eficacia de encapsulación (EE) de las distintas formulaciones elaboradas.

Formulación	Cantidad encapsulada media (μg)/100 mg de NPs \pm DE	EE% \pm DE
NP-Rh	362,8 \pm 17,3	7,6 \pm 0,4
NPpheA-Rh	108,9 \pm 11,4	2,3 \pm 0,2
NPpheB-Rh	715,3 \pm 8,6	15,0 \pm 0,2

Tabla 4.6: Cantidad media de Rh encapsulada y eficacia de encapsulación (EE%) \pm DE de las formulaciones de NPs elaboradas.

Los resultados obtenidos muestran una baja cantidad de Rh encapsulada y, por tanto, una eficacia de encapsulación muy baja. En este sentido, cuando se aumentó la cantidad de Rh inicial para la elaboración de las NPs se observó una interacción entre la rodamina y el polímero, que modificaba las características del PLGA. Por ello, se emplea una cantidad inicial de Rh del 2,5%, que resulta suficiente para llevar a cabo los estudios de biodistribución. La formulación NPpheA-Rh presenta los valores más bajos de encapsulación, que probablemente es debido al proceso de funcionalización que requiere de tiempos largos de contacto de las NPs con los medios tamponados MES y PBS y, por tanto, se puede producir la liberación del agente fluorescente durante el proceso.

Por otro lado, la formulación NPpheB-Rh presenta porcentajes de encapsulación muy superiores a los obtenidos para las otras dos formulaciones. Estas diferencias solo pueden atribuirse a la presencia de fenilalanina previa a la formación de las NPs. Aunque la presencia de este dipéptido está avalada por los espectros de RMN obtenidos tras su unión al PLGA y por las modificaciones del potencial Z, no es posible saber si la fenilalanina se orienta hacia el interior o hacia el exterior de las NPs. Una orientación hacia el interior de una parte o de toda la fenilalanina, podría explicar esta elevada diferencia en la cantidad de Rh encapsulada, que se puede observar a simple vista por el color que adquieren de las NPs elaboradas para esta formulación.

4.1.7. Ensayos de cesión

Las tablas 4.7 a 4.9, junto con las figuras que las acompañan, muestran los resultados del ensayo de cesión de Rh a partir de las tres formulaciones.

Tiempo (h)	Cantidad media cedida acumulada (μg)/100 mg NPs \pm DE	Porcentaje medio cedido acumulado \pm DE
1	159,64 \pm 1,28	44,00 \pm 0,35
2	223,76 \pm 1,79	61,68 \pm 0,49
6	256,05 \pm 2,04	70,58 \pm 0,56

Tabla 4.7: Resultados medios (\pm DE) obtenidos en los ensayos de cesión de la formulación NP-Rh.

Tiempo (h)	Cantidad media cedida acumulada (μg)/100 mg NPs \pm DE	Porcentaje medio cedido acumulado \pm DE
1	30,96 \pm 0,30	28,42 \pm 0,28
2	43,45 \pm 0,43	39,89 \pm 0,39
6	49,80 \pm 0,49	45,72 \pm 0,45

Tabla 4.8: Resultados medios (\pm DE) obtenidos en los ensayos de cesión de la formulación NPpheA-Rh.

Tiempo (h)	Cantidad media cedida acumulada (μg)/100 mg NPs \pm DE	Porcentaje medio cedido acumulado \pm DE
1	393,65 \pm 3,13	55,04 \pm 0,44
2	552,40 \pm 4,349	77,23 \pm 0,61
6	579,77 \pm 4,60	81,05 \pm 0,64

Tabla 4.9: Resultados medios (\pm DE) obtenidos en los ensayos de cesión de la formulación NPpheB-Rh.

Los estudios de cesión de estas formulaciones se llevan a cabo, únicamente para conocer de forma aproximada la liberación de Rh y así poder relacionar estos resultados con el comportamiento de la formulación

in vivo. Hay que tener en cuenta, que antes de atravesar la BHE se puede producir la liberación de Rh en el organismo. Es necesario indicar que la rodamina B no consigue atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo, la rodamina cedida previamente reducirá la cantidad de la misma que acceda al SNC y las Nps llegarían al cerebro con menos carga. Por otro lado, en estudios de biodistribución llevados a cabo previamente por el grupo de Investigación, el mayor paso de NPs de PLGA al cerebro se produce en los primeros de los 30 minutos después de la administración (Marcianes, et al., 2017).

Como se observa en los resultados obtenidos para la formulación NPpheA-Rh (tabla 4.8), el proceso de funcionalización mediante la reacción de la carbodihimida condujo a una disminución de la velocidad de la cesión. Este hecho puede deberse a que el proceso de funcionalización retire la rodamina presente en las capas superficiales de las NPs y por ello disminuye el burst inicial. Sin embargo, otros autores que han trabajado con NPs funcionalizadas por este mismo método, achacan este cambio en la liberación a la formación de una capa extra en la superficie de los nanosistemas, que modificaría la velocidad de liberación debida a la presencia del péptido en la formulación (Zhu, et al., 2017; Cayero-Otero, et al., 2019).

4.2. Estudios de biodistribución

4.2.1. Biodistribución en tejidos

Los estudios de biodistribución se llevan a cabo después de 1 y 2 horas de la administración de las NPs mediante la cuantificación de la Rh presente en los distintos órganos: hígado, bazo, riñón y pulmón. Para poder comparar los resultados, previamente fue necesario normalizar las dosis de NPs administradas en función de la carga de Rh en cada formulación.

En primer lugar, se ha comparado la biodistribución en los órganos de cada una de las formulaciones, para así poder evaluar la mayor o menor afinidad de cada formulación. En las tablas 10 a 12 se recoge la cantidad de Rh presente en los distintos órganos analizados, a los dos tiempos ensayados, y para cada una de las formulaciones elaboradas. Las figuras 13 a 15, que acompañan a las tablas, muestran en forma de gráfico estos mismos valores.

Órgano	Cantidad media de Rh (ng/g órgano) \pm DE a t=1h	Cantidad media de Rh (ng/g órgano) \pm DE a t=2h
Hígado	15,73 \pm 1,52	19,31 \pm 3,95
Riñón	3,02 \pm 0,21	5,01 \pm 0,30
Bazo	28,61 \pm 3,71	18,98 \pm 2,60
Pulmón	14,42 \pm 1,40	15,76 \pm 3,85

Tabla 4.10: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NP-Rh

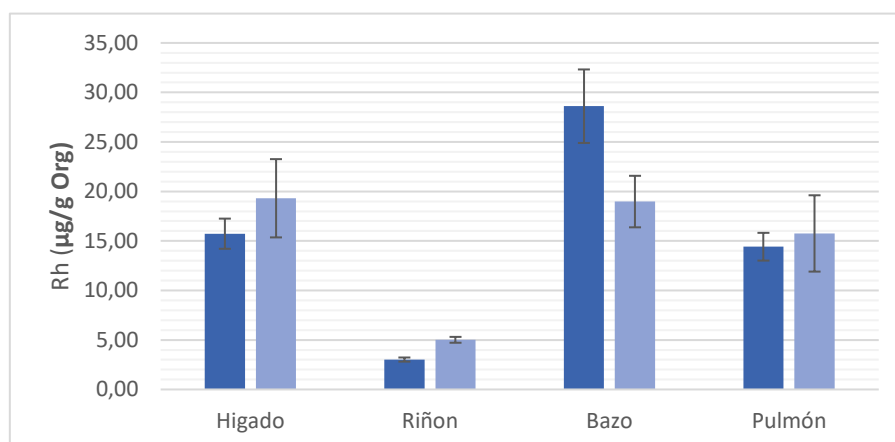


Figura 4.13: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NP-Rh.

En la tabla 10 se puede observar cómo, durante la primera hora, la formulación NP-Rh presentó un mayor tropismo hacia el bazo, mientras que el riñón es el órgano en el cual se detectan menores niveles de Rh. Por lo que se refiere al hígado y pulmón, presentan una acumulación similar del marcador fluorescente. A las 2 horas de la administración, se detectó una brusca bajada de la fluorescencia en la Rh presente en el bazo, la cual llega a alcanzar valores similares a los de pulmón e hígado, mientras que, en el resto de órganos, las cantidades de rodamina aumentan ligeramente. Los resultados obtenidos solo muestran un incremento significativo en las concentraciones de Rh en riñón, si bien los niveles encontrados en este órgano siguen siendo muy bajos e inferiores a los de los otros órganos.

Órgano	Cantidad media de Rh (ng/g Org) \pm DE a t=1h	Cantidad media de Rh (ng/g Org) \pm DE a t=2h
Hígado	47,79 \pm 14,12	109,96 \pm 3,89
Riñón	11,39 \pm 2,01	6,99 \pm 1,08
Bazo	283,45 \pm 38,65	203,84 \pm 25,15
Pulmón	21,86 \pm 2,98	96,84 \pm 4,22

Tabla 4.11: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NPpheaA-Rh.

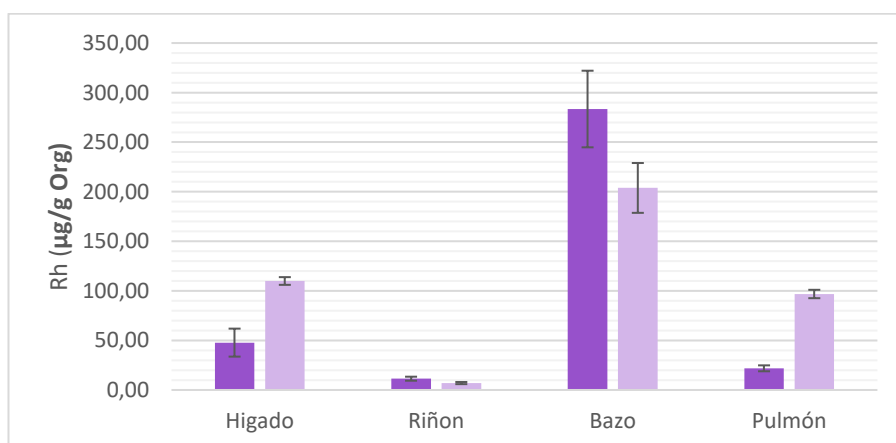


Figura 4.14: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NPpheaA-Rh

Al estudiar la biodistribución de la formulación NPpheaA-Rh se observa que, durante la primera hora, el bazo es claramente el órgano por el que existe un mayor tropismo, en el que se alcanzan cantidades de Rh casi 6 veces superiores a las presentes en el hígado, que representa el segundo órgano con un mayor acceso de Rh, con niveles cercanos a los 50 $\mu\text{g/g}$ de órgano. A continuación, y en cantidad, se encuentra el pulmón, pero con valores significativamente inferiores a los encontrados en hígado. Los niveles más bajos se alcanzan en riñón. Al estudiar el comportamiento de

esta formulación después de 2 horas de la administración, se puede observar como las cantidades de Rh en bazo disminuyeron, aunque continúa siendo el órgano con una mayor presencia de Rh. En hígado y pulmón se produjo, sin embargo, un aumento muy significativo de la presencia de este compuesto y llega a doblar y a triplicar, respectivamente, sus valores para ambos órganos. En cambio, su presencia en riñón se redujo a la mitad. Otros autores han encontrado resultados similares con NPs funcionalizadas en superficie con péptidos que incluyen fenilalanina, las cuales incrementan su presencia, respecto a las NPs no funcionalizadas, en la mayor parte de los órganos estudiados (hígado, bazo y riñón) durante la primera hora, reduciéndose en el siguiente tiempo de estudio en el caso de los riñones (Tosi, et al. 2010). En dicho estudio, sin embargo, las nanopartículas funcionalizadas con el péptido no se acumularon en pulmones hasta tiempos superiores a las 3 horas, obteniendo las mayores acumulaciones en hígado y riñones; esto hecho es contrario a lo obtenido en nuestro estudio. Es verdad, no obstante, que el péptido empleado por Tosi et al., para funcionalizar no es exactamente el mismo, el cual es más largo y con otros aminoácidos además de phe, lo que puede afectar a este perfil de distribución.

Órgano	Cantidad media de Rh (ng/g órgano) ± DE a t=1h	Cantidad media de Rh (ng/g órgano) ± DE a t=2h
Hígado	29,40 ± 3,28	42,61 ± 0,64
Riñón	11,08 ± 1,34	12,22 ± 0,14
Bazo	11,65 ± 1,74	10,01 ± 0,89
Pulmón	24,64 ± 5,05	18,83 ± 2,18

Tabla 4.12: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NPpHeB-Rh

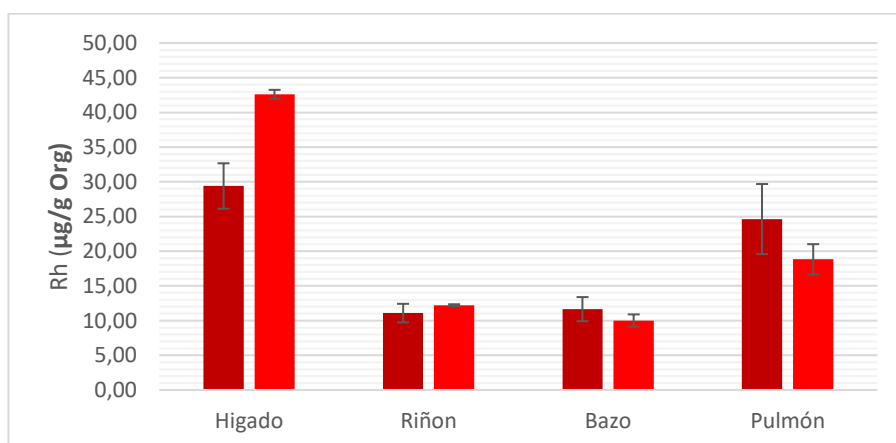


Figura 4.15: Resultados de los ensayos de biodistribución correspondientes a la formulación NPpHeB-Rh

Por último, en relación a la formulación NPpHeB-Rh, los resultados obtenidos a la hora muestran claramente un tropismo diferente, en este caso es el tejido hepático el que presenta la mayor acumulación de Rh. Por otra parte, tanto en riñón como en bazo se obtienen cantidades significativamente menores y muy similares entre ellas (tabla 4.12). Al analizar los resultados correspondientes a las 2 horas, se observa un aumento significativo en la presencia de rodamina en hígado, mientras que los cambios en los otros órganos no fueron significativos: aumentaron muy

ligeramente en riñón y disminuyeron su presencia en bazo y pulmón (figura 15). Con esta formulación se reduce claramente la tendencia de las NPs de acumularse en bazo, por lo que el hígado y el pulmón fueron los órganos con mayor presencia de Rh.

A la vista de los resultados obtenidos, hemos comparado el comportamiento de las formulaciones entre ellas respecto a su afinidad por los diferentes órganos.

La figura 4.16 muestra las concentraciones de Rh en los distintos órganos, 1 hora después de la administración, y para las tres formulaciones estudiadas.

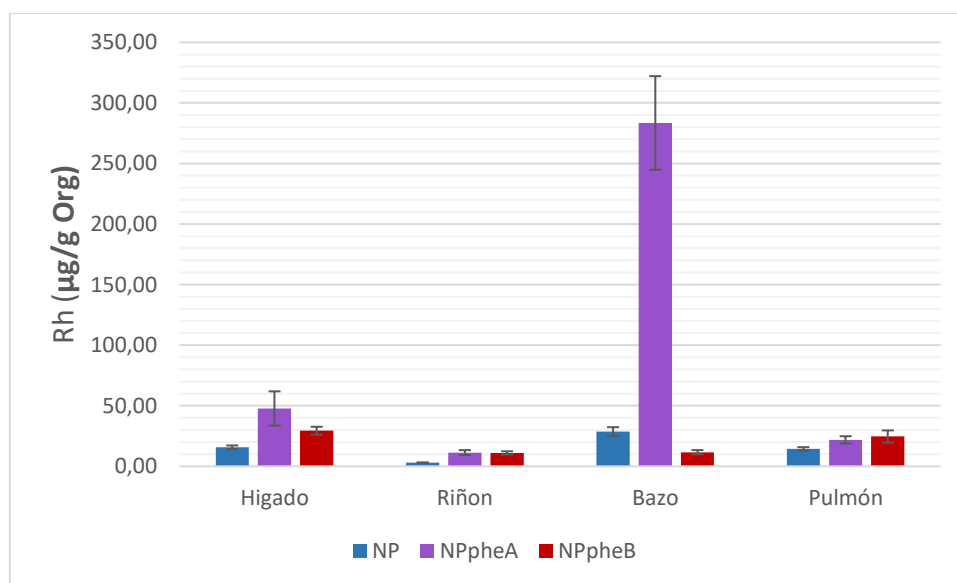


Figura 4.16: Comparación de las concentraciones de Rh en los distintos órganos ensayados, 1 hora después de la administración, y para las tres formulaciones de NPs estudiadas.

La figura 4.17 muestra las concentraciones de Rh en los distintos órganos, 2 horas después de la administración, y para las tres formulaciones estudiadas.

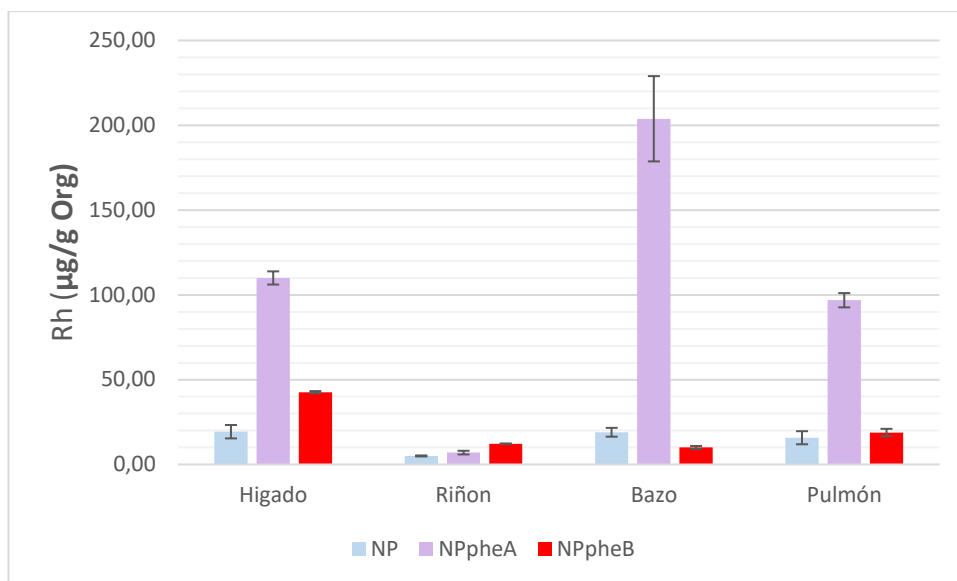


Figura 4.17: Comparación de las concentraciones de Rh en los distintos órganos ensayados, 2 horas después de la administración, y para las tres formulaciones de NPs estudiadas.

En el tejido hepático se pudo observar que durante la primera hora las formulaciones que se encuentran presentes en mayor medida son la formulación NPpheaA-Rh y la formulación NPpheaB-Rh, especialmente la primera. Estas diferencias se incrementaron a las 2 horas, aunque el aumento es ligeramente menor en el caso de la formulación NP-Rh.

La comparativa de los valores de Rh en bazo no deja lugar a dudas. A ambos tiempos, los valores correspondientes a la formulación NPpheaA-Rh son muy superiores a los encontrados con las otras formulaciones y llegan a ser 10 veces mayores a los de NP-Rh, durante la primera hora (tabla 4.12).

En pulmón se obtienen valores muy similares entre las formulaciones durante la primera hora, que se incrementan exponencialmente para NPpheaA-Rh al tiempo de sacrificio de 2 horas, mientras que no se observan grandes diferencias entre los otros dos grupos de NPs.

Por último, las cantidades de Rh en riñón son muy bajas para todas las formulaciones, en comparación con las cantidades encontradas en otros órganos. Aun así, durante la primera hora, se observa que la formulación

NP-Rh presenta los valores más bajos, mientras que las dos formulaciones funcionalizadas tienen niveles más elevados y similares entre sí. El cambio en el comportamiento de las NPs en este órgano se observa a las 2 horas, tiempo al cual las cantidades correspondientes a la formulación NP-Rh son del doble de las existentes a la hora, mientras que con la formulación NPpheA-Rh disminuyen casi hasta la mitad de los valores observados previamente (figura 4.17). Con la formulación NPpheB-Rh, sin embargo, se mantuvieron unos niveles constantes.

Las diferencias de concentración de Rh encontradas en los distintos órganos nos indican que la presencia de fenilalanina modifica la biodistribución de las NPs. Además, la presencia de NPpheA-Rh es predominante en casi todos los órganos, con la excepción del riñón. Este hecho se podría explicar si tenemos en cuenta la existencia de células fagocíticas en los tejidos. Algunos nanosistemas tienen tendencia a dirigirse a órganos para ser captados por células fagocíticas; especialmente por las células de Kupffer del hígado, por macrófagos del bazo y macrófagos alveolares del pulmón. Los resultados de biodistribución obtenidos parecen indicar que el proceso de funcionalización con el péptido phe-phe, especialmente cuando se produce en superficie (formulación NPpheA), podría estimular el fenómeno de fagocitosis y la migración de las NPs hacia estos órganos. Este hecho explicaría la mayor presencia de estas formulaciones en órganos fagocíticamente activos, mientras que la formulación NP-Rh podría permanecer en circulación sanguínea. Este no es un fenómeno único para en estas formulaciones. Así, Rafiei y Haddadi, (Rafiei y Haddadi; 2017) compararon la biodistribución de NPs de PLGA y NPs de PLGA-PEG y observaron una mayor presencia de las segundas en circulación sanguínea, aunque considerablemente menor en la mayor parte

de los órganos estudiados. Por otra parte, estudios realizados por Semete et al. (Semete, et al., 2010) con NPs de PLGA cargadas con rodamina mostraron una elevada presencia de este marcador en suero sanguíneo y corazón, durante todo el ensayo.

En nuestro caso, al tratarse de formulaciones funcionalizadas con el mismo péptido, cabría esperar que tanto NPpHeB como NPpHeA presentasen perfiles de biodistribución similares. Sin embargo, NPpHeB exhibe un perfil híbrido entre las formulaciones NP-Rh y NPpHeA-Rh. Este hecho, unido al marcado incremento de la eficacia de encapsulación (tabla 4.6), podría avalar la teoría de una interacción entre los grupos aromáticos de la Rh y el péptido phe-phe, que diese lugar a un complejo más lipófilo, con un menor porcentaje de fenilalanina hacia el exterior. Por tanto, al presentar una menor cantidad del dipéptido en la superficie de las NPs, podría traducirse en una menor afinidad de esta formulación por los tejidos, ya que ésta permanecería más tiempo en circulación que la formulación NPpHeA.

4.2.2. Evaluación del paso de las NPs a través de la barrera hematoencefálica

La mayoría de los autores indican que tras la administración por vía intravenosa de NPs, el paso mayoritario de las mismas a través de la BHE se produce a tiempos cortos (Marcianes, et al. 2017), por este motivo en nuestro estudio hemos seleccionado tiempos más largos para analizar la biodistribución de las NPs y su permanencia en SNC. Para evaluar las cantidades de Rh en cerebro de las tres formulaciones, se ha usado el mismo método de cuantificación previamente descrito (sección 3.3.1). Los resultados de concentración de Rh obtenidos quedan recogidos en la tabla

4.13. Para la comparación de los resultados fue necesario normalizar las dosis de NPs administradas en función de la carga de Rh.

Formulación	Niveles medios de Rh (ng/g cerebro) \pm DE	
	t= 1 h	t=2 h
Control	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
NP-Rh	2,23 \pm 0,84	2,12 \pm 0,01
NPpheA-Rh	8,76 \pm 0,76	3,90 \pm 0,76
NPpheB-Rh	1,88 \pm 0,62	1,90 \pm 0,10

Tabla 4.13: Niveles medios (\pm DE) de Rh obtenidos en cerebro para las formulaciones de NPs ensayadas.

En la figura 4.18 se representan los niveles Rh obtenidos en cerebro tras la administración de las tres formulaciones y a los dos tiempos ensayados (1 y 2 horas).

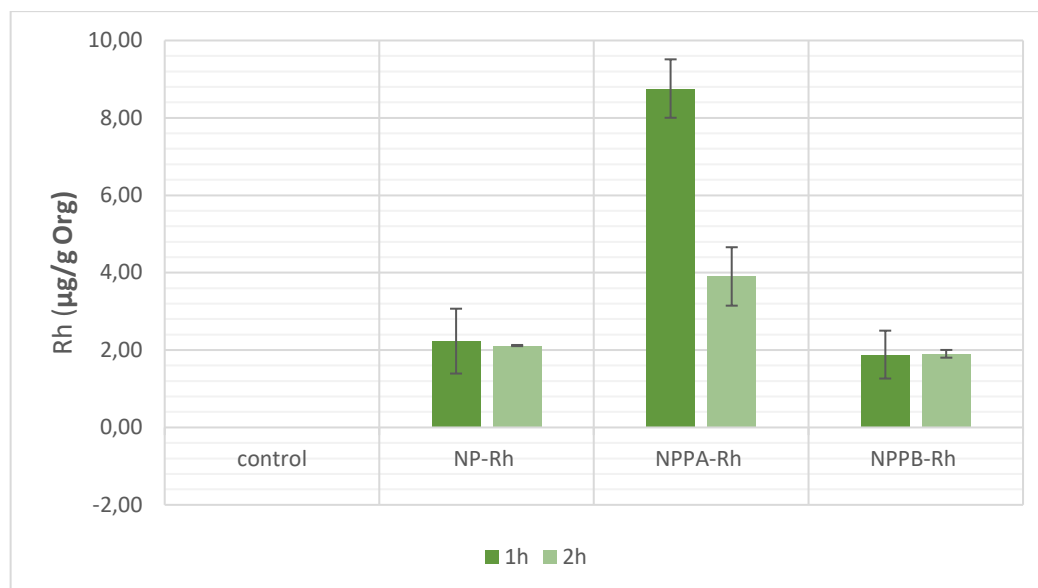


Figura 4.18: Representación gráfica de los niveles de Rh encontrados en cerebro ($\mu\text{g/g}$ de cerebro) para cada una de las formulaciones de NPs a tiempo 1 hora (oscuro) y 2 horas (claro).

Como se puede observar en la tabla 4.13 y en la figura 4.18, la formulación NPpheA-Rh consigue alcanzar niveles de Rh en cerebro claramente superiores a los obtenidos con las otras dos formulaciones, especialmente en la primera hora. No obstante, mientras que las formulaciones NP-Rh y NPpheB-Rh mantienen unos niveles prácticamente constantes a las 2 horas, las concentraciones de Rh obtenidas a partir de la formulación NPpheA-Rh disminuyeron en más de un 50% a ese mismo tiempo.

Es necesario indicar que las cantidades de Rh que se encuentran en cerebro son muy bajas, y por tanto el método de cuantificación podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar las variaciones asociadas a errores residuales. Por este motivo, el hemisferio cerebral de los animales que no fue empleado para la cuantificación de la Rh por fluorimetría, fue seccionado con un micrótopo en más de 8 cortes. Estas muestras se procesan y son observadas en un microscopio de fluorescencia, para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Las figuras 4.19 a

4.26 muestran imágenes de los cortes de cerebro de hipocampo obtenidas con el microscopio de fluorescencia.

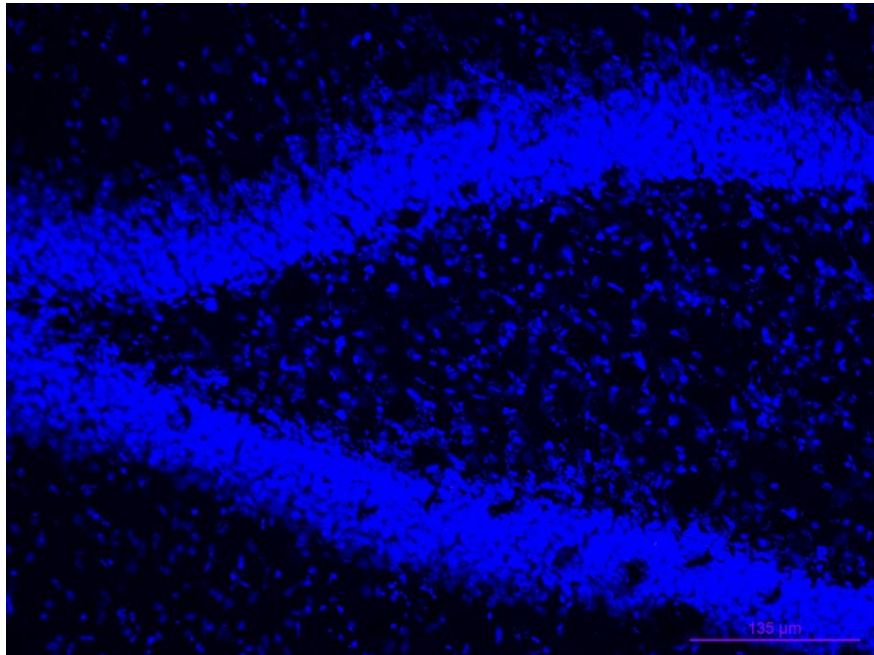


Figura 4.19: Microfotografía del hipocampo, correspondiente al grupo control y a tiempo 1 hora. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia (rojo).

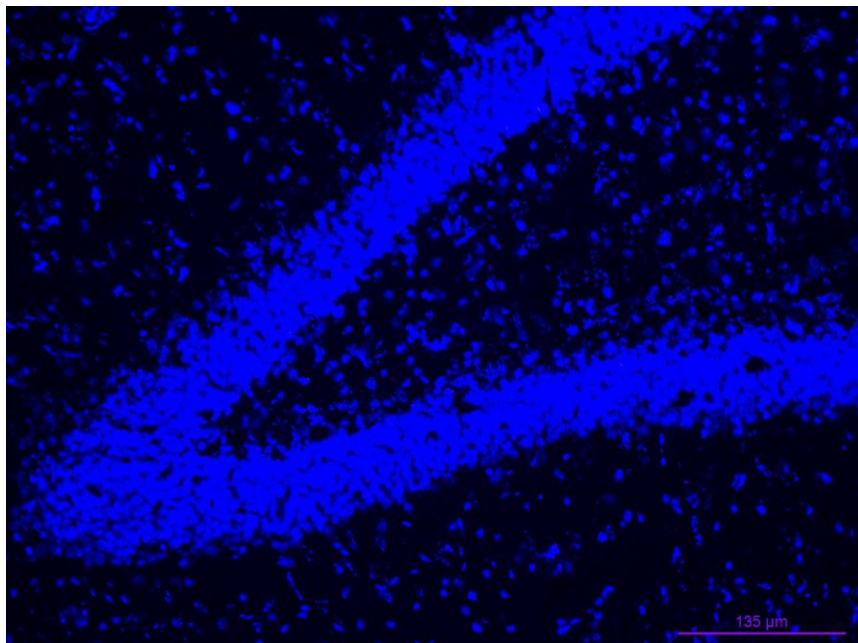


Figura 4.20: Microfotografía del hipocampo, correspondiente al grupo control y a tiempo 2 horas. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia (rojo).

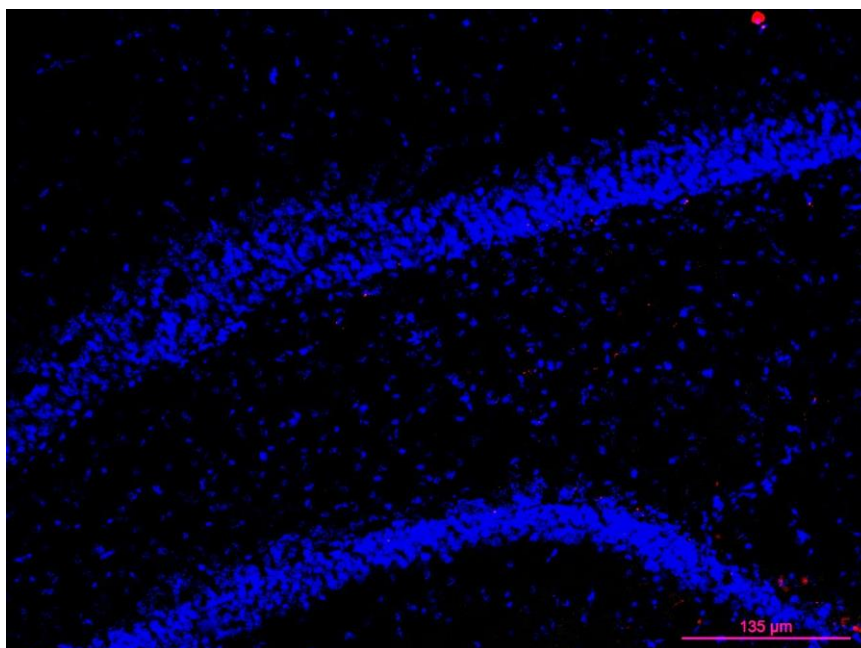


Figura 4.21: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NP-Rh y a tiempo 1 hora. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

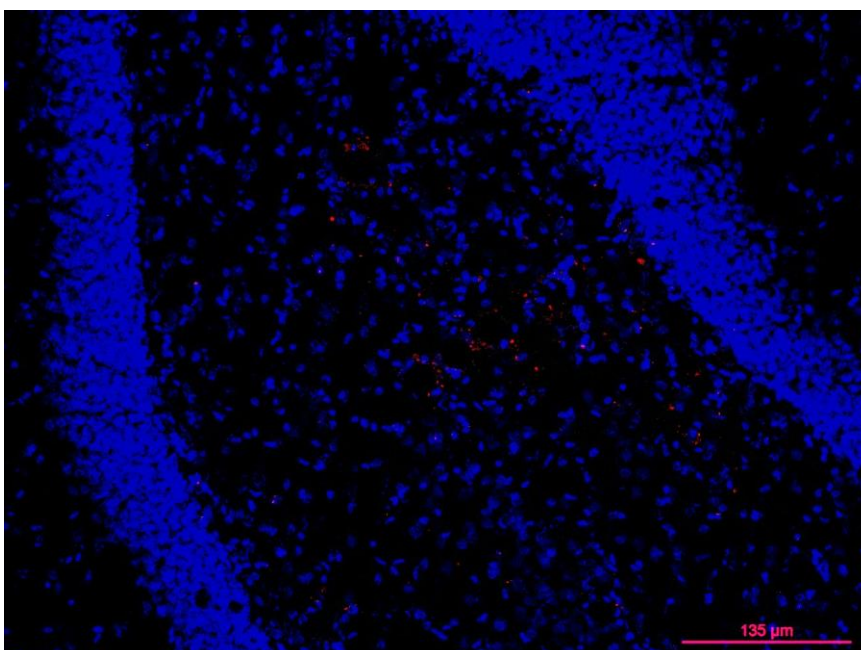


Figura 4.22: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NP-Rh y a tiempo 2 horas. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

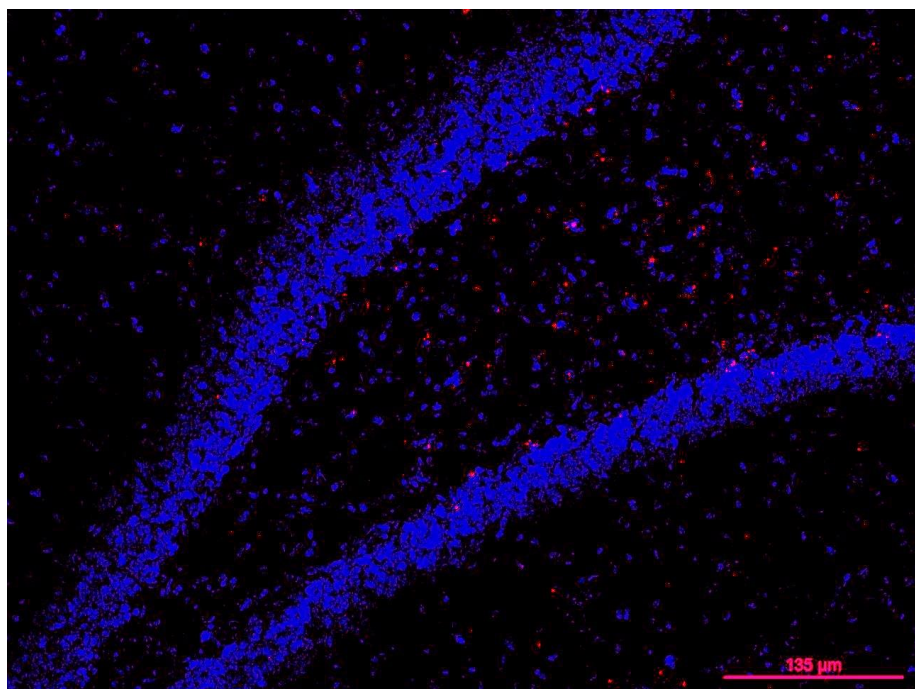


Figura 4.23: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NPpHeA-Rh y a tiempo 1 hora. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

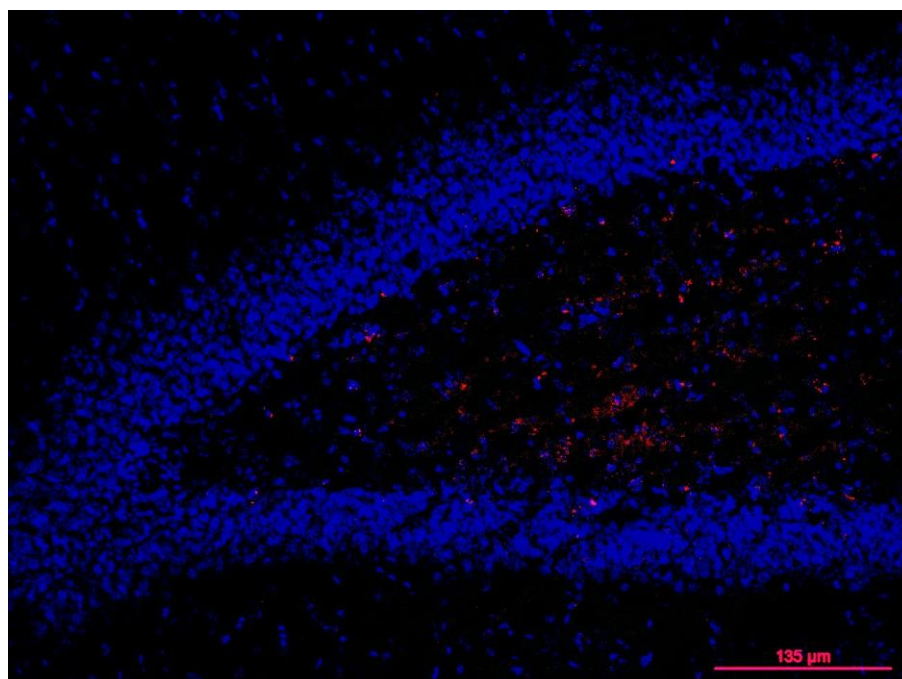


Figura 4.24: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NPpHeA-Rh y a tiempo 2 horas. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

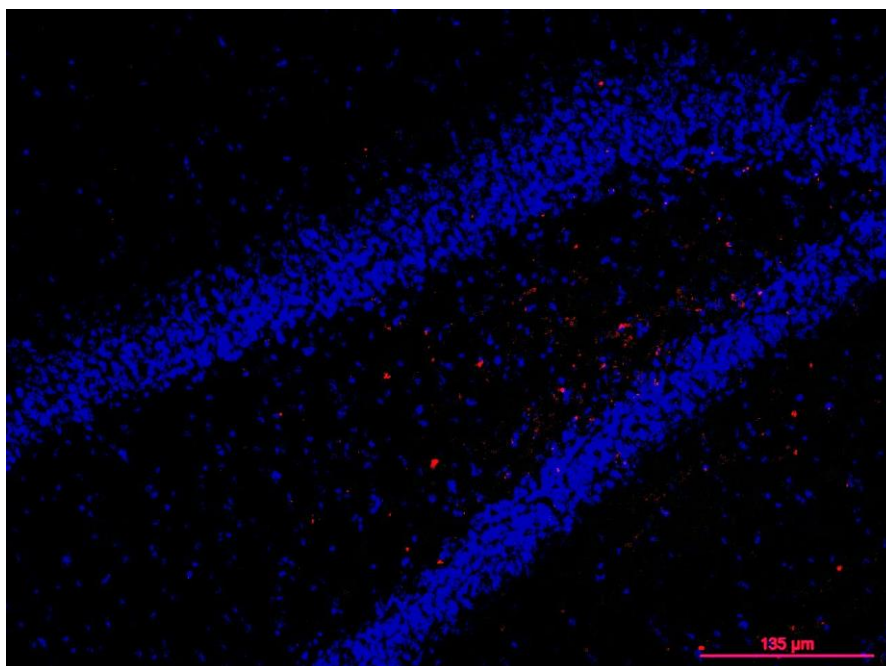


Figura 4.25: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NPpheB-Rh y a tiempo 1 hora. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

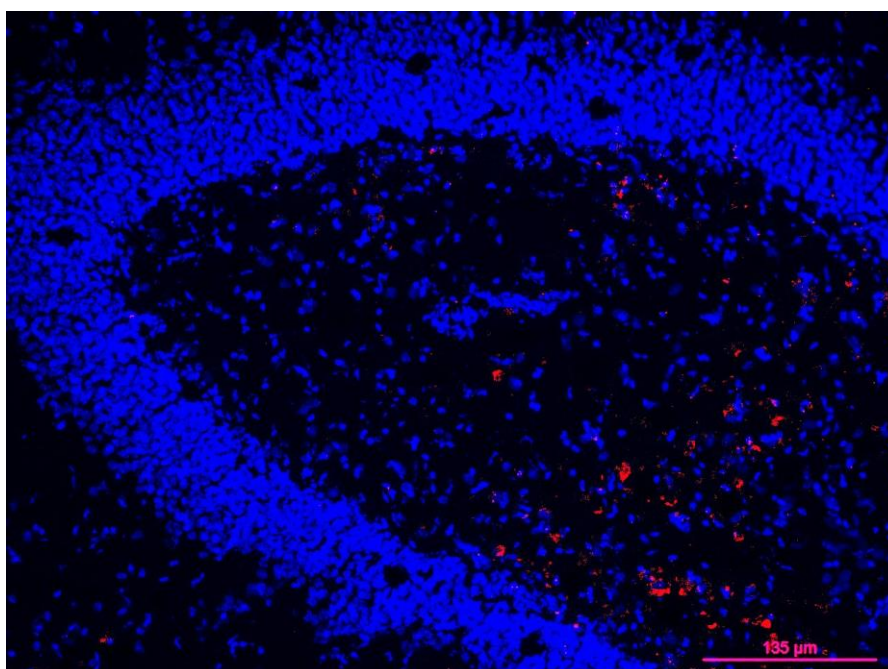


Figura 4.26: Microfotografía de hipocampo correspondiente al grupo tratado con la formulación NPpheB-Rh y a tiempo 2 horas. Células marcadas con DAPI (azul), células con fluorescencia debida a Rh (rojo).

El DAPI se encuentra unido al ADN de las células y proporciona una fluorescencia de color azul, que nos permite diferenciar las células del hipocampo. Por otra parte, en las microfotografías se puede observar la fluorescencia debida a la Rh, que aparece en color rojo. Al emplear el programa ImageJ se puede cuantificar la fluorescencia obtenida en cada caso. La tabla 4.14 y la figura 4.27 muestran los datos de intensidad de fluorescencia correspondientes a las tres formulaciones ensayadas.

Formulación	Intensidad de fluorescencia media \pm DE en cerebro	
	t= 1 h	t=2 h
Control	0,00 \pm 107,04	0 \pm 17,04
NP-Rh	1166,98 \pm 204,15	933,87 \pm 124,77
NPpheA-Rh	2810,00 \pm 314,85	1598,45 \pm 133,32
NPpheB-Rh	1402,40 \pm 104,23	1818,77 \pm 108,82

Tabla 4.14: Cuantificación de intensidad de la fluorescencia procedente de Rh en cerebro a 1 hora y 2 horas después de la administración de las formulaciones de NPs.

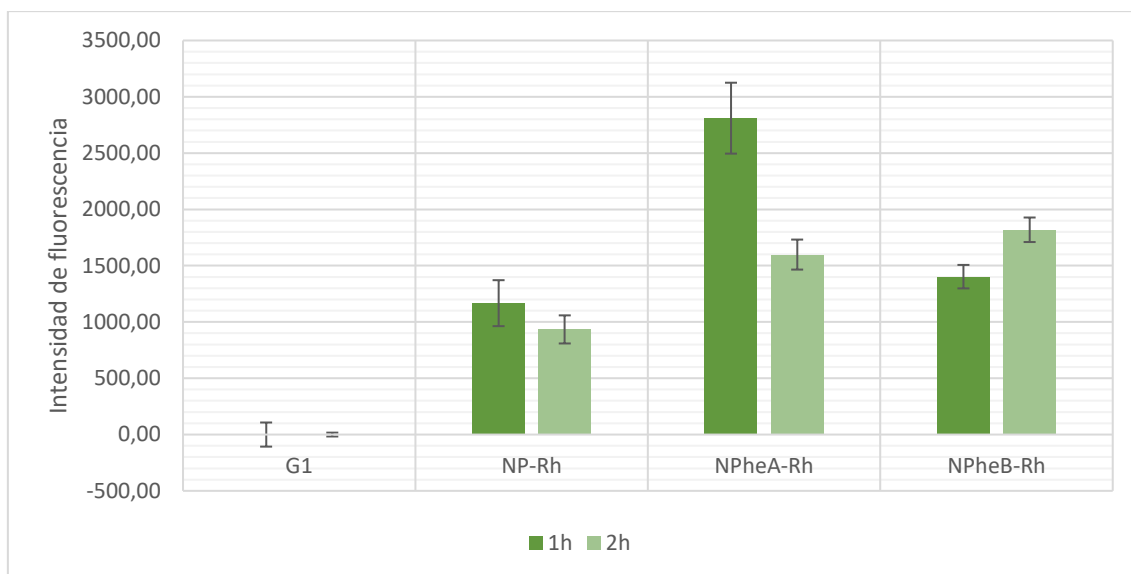


Figura 4.27: Intensidad de fluorescencia de Rh obtenida en cerebro 1 hora y 2 horas después de la administración de las formulaciones de NPs.

Como se puede observar en la figura 4.27, los valores obtenidos a la hora corroboran los resultados obtenidos al realizar la cuantificación de Rh en cerebro mediante fluorimetría. Este hecho se mantiene también a las 2 horas.

Al comparar el comportamiento de la formulación NP-Rh a los dos tiempos estudiados se observa que la formulación NP-Rh reduce su presencia en cerebro a las 2 horas, aunque las diferencias son significativas con respecto al tiempo 1 hora. En este sentido, en otros estudios realizados por nuestro equipo, tampoco se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia correspondiente a NPs poliméricas entre los tiempos 30 min y 1 hora (Marcianes, et al., 2017).

Los resultados obtenidos por la formulación NPpheA-Rh (NPs funcionalizadas en superficie con el péptido phe-phe), ponen de manifiesto un incremento en la intensidad de la fluorescencia en la primera hora, seguida de una marcada reducción, de casi el 50%, de las cantidades de Rh

a las 2 horas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante análisis por fluorimetría para esta formulación.

Por último, la formulación NPpheB-Rh, fue la única con la que se ha conseguido un aumento significativo en los valores de intensidad de fluorescencia a las 2 horas en comparación con el tiempo 1 hora. Sin embargo, esta diferencia apenas se puede apreciar en el análisis de cuantificación de Rh realizado por fluorimetría, aunque podría deberse a que las cantidades en cerebro son muy pequeñas y el método, como ya se ha comentado, puede no ser lo suficientemente sensible como para cuantificar las diferencias.

Por otro lado, es necesario indicar que, cuando los cortes cerebrales son observados por el microscopio de fluorescencia, no se realiza ninguna normalización relacionada con la carga de Rh en cada formulación, ya que se trabaja directamente con los cortes de cerebro. En estas circunstancias, la formulación NP-Rh, que tiene una carga intermedia, es de las tres formulaciones de NPs la que presenta la menor intensidad de fluorescencia a ambos tiempos (1 y 2 horas).

Sin embargo, la formulación NPpheA-Rh, que tiene una carga de Rh muy inferior a la formulación NP-Rh y, siete veces menor que la de NPpheB-Rh, es la que presenta en la primera hora los valores más elevados de intensidad de fluorescencia. Sin embargo, al cabo de 2 horas, los valores de intensidad de fluorescencia se reducen de forma significativa. Es sabido que la rodamina es sustrato de la P-gp, que la elimina del tejido cerebral, por tanto, cabe esperar que tras ser liberada de las NPs que se encuentran en el cerebro, sea expulsada por dicha bomba de e-flujo. Por otro lado, si además tenemos en cuenta la baja encapsulación de esta formulación, a las

2 horas de la administración, sería posible encontrar niveles muy bajos de Rh en cerebro, sin que ello implique que las NPs han sido eliminadas. En este sentido, hay que tener en cuenta que la fenilalanina tiene la característica de ser un aminoácido con un gradiente favorable a la entrada en tejido cerebral, pero no a la salida, hecho que pudiera favorecer la permanencia de las NPs en dicho órgano (Puris, et al., 2020).

Por último, la formulación NPpheB-Rh presenta una intensidad de fluorescencia en el hipocampo ligeramente superior a la formulación NP-Rh durante la primera hora, aunque hay que resaltar que la carga de rodamina de esta formulación es prácticamente el doble que la que hay en la formulación sin funcionalizar. Sin embargo, a las 2 horas, este valor se incrementa de forma significativa, siendo la única formulación que presenta este aumento significativo en el valor de intensidad fluorescencia.

Uno de los mayores problemas asociados al paso de NPs al SNC es la actuación de la bomba de e-flujo, que tiende a expulsar las NPs hacia el exterior. Por este motivo, es especialmente interesante que se produzca un incremento en la fluorescencia a tiempos más largos, ya que podría indicarnos; o bien que continúa produciéndose el paso de las NPs a través de la BHE o bien, que las Nps continúan en el interior liberando Rh. En este sentido, algunos autores indican que el acceso a tejido cerebral mediante transcitosis mediada por receptores, mecanismo que hemos intentado favorecer mediante la incorporación del péptido phe-phe a las NPs, puede resultar ser más lenta que la difusión pasiva (Cayero-Otero, et al., 2019). Esto podría explicar el comportamiento de la formulación NPpheB-Rh, con la que se logran mejores resultados a las 2 horas de la administración, especialmente si tenemos en cuenta que a tiempos cortos (30 minutos), es

cuando se produce el mayor paso a través de BHE, y que la Rh es eliminada del cerebro por la P-gp, lo que dificultaría su presencia en cerebro a tiempos largos, si no es por la que se libera a partir de las NPs.

4.2.3. Integridad del tejido cerebral

Para observar si la presencia de las NPs puede dañar el tejido cerebral, se ha realizado una tinción de NISSL sobre los cortes realizados. La figura 4.28 muestra las imágenes de hipocampo obtenidas por microscopía óptica.

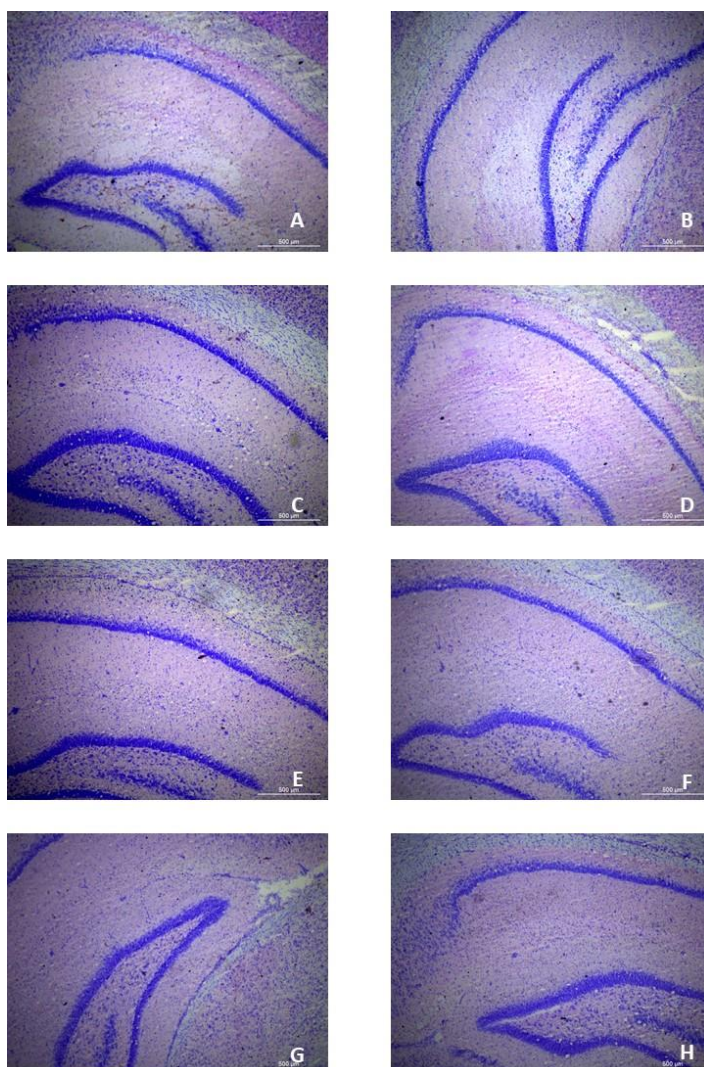


Figura 4.28: Microfotografías del área del hipocampo. A: grupo control tiempo 1 hora. B: grupo control tiempo 2 horas. C: Grupo tratado con la formulación NP-Rh, tiempo 1 hora. D: Grupo tratado con la formulación NP-Rh, tiempo 2 horas. E: Grupo tratado con la formulación NPpheA-Rh, tiempo 1 hora. F: Grupo tratado con la formulación NPpheA-Rh, tiempo 2 horas. G: Grupo tratado con la formulación NPpheB-Rh, tiempo 1 hora. H: Grupo tratado con la formulación NPpheB-Rh, tiempo 2 horas.

Cuando las NPs se administran por vía intravenosa, pueden interaccionar con proteínas y otras sustancias presentes en sangre y tejidos y dar lugar a una estructura cuya composición y espesor varía en función de las propiedades químicas superficiales del nanosistema (Casals, et al., 2010; Monopoli, et al., 2012). Varios estudios sugieren la implicación de estos sistemas en la producción de especies reactivas de oxígeno y en el desencadenamiento de procesos inflamatorios, los cuales afectan a la BHE y a la microglía presentes en parénquima cerebral (Sharma y Sharma, 2012).

En la figura 30 se puede observar un corte de hipocampo de un animal procedente de cada grupo experimental. Los resultados obtenidos tras la tinción de NISSL nos permiten observar que no existe daño estructural ocasionado por la administración de las formulaciones de Nps.

A la vista de los resultados obtenidos podemos indicar que, ambas formulaciones funcionalizadas con fenilalanina pueden ser adecuadas para favorecer el paso de las NPs a través de la BHE. Los resultados parecen señalar que la formulación NPpheA-Rh consigue atravesar la BHE más rápidamente y en mayor proporción. Por otro lado, con la formulación NPpheB-Rh se obtiene una mayor intensidad de fluorescencia a las 2 horas, que podría deberse; o bien a un paso más lento a través de la BHE o bien a la presencia de las NPs en cerebro, que se mantiene al menos durante 2 horas.

V-NANOPARTÍCULAS DE MORIN HIDRATO

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer es una de las principales causas de demencia en el mundo. Actualmente el tratamiento de esta patología se basa en el uso de fármacos que actúan fundamentalmente sobre los síntomas, pero no curan la enfermedad. La posibilidad de emplear algunos agentes con actividad terapéutica para esta patología se ve dificultada por la acción de la BHE, que impide su acceso al SNC.

El MH presenta distintas acciones que resultan prometedoras para el tratamiento de esta enfermedad: capacidad para inhibir la hiperfosforilación de la proteína Tau (Gong, et al., 2011), capacidad de solubilizar los agregados A β amiloide (Lemkul y Bevan, 2010) y capacidad para reducir el estrés oxidativo (Jayaraj, et al. 2007). No obstante, su capacidad de paso a través de la BHE es prácticamente nulo, especialmente cuando se administra por vía oral. La biodisponibilidad oral del MH es, además, extremadamente baja, de un 0,45% debido a una baja absorción intestinal y un elevado efecto de primer paso hepático (Zhang, et al., 2015). Al ser administrado por vía parenteral, el MH sufre un rápido metabolismo, lo que se traduce en una semivida plasmática de tan solo 30 min. (Li, et al. 2019). Numerosos autores han llevado a cabo ensayos in vivo con el flavonoide y han llegado a la conclusión que el MH no es capaz de alcanzar el tejido cerebral, salvo si se administran altas dosis del mismo (Sight, et al., 2018). En este sentido, Waddad et al. (Waddad, et al., 2013) en un estudio realizado en ratas Wistar no pudieron detectar concentraciones de morin en cerebro. Sin embargo, estudios in vitro llevados a cabo por algunos autores con modelos celulares de BHE, indicaron que el flavonoide si podría

llegar a atravesar la BHE (Youdim, et al., 2004). Por tanto, si bien no se puede descartar totalmente que no sea capaz de atravesar la BHE, el porcentaje en que se produciría este paso resultaría terapéuticamente insuficiente (Singht, et al., 2018).

Por todo ello, la encapsulación del morin en nanopartículas elaboradas con PLGA, polímero biocompatible y biodegradable, puede facilitar su acceso al SNC. Por otra parte, la unión de fenilalanina, con una elevada afinidad por los transportadores de aminoácidos largos (LAT-1), podrá ayudar a su transporte a través de la BHE.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es desarrollar y caracterizar nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato y funcionalizadas con un dipéptido de fenilalanina, para favorecer su acceso al SNC, y poder ser empleadas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos parciales:

- Desarrollar y caracterizar nanopartículas elaboradas con PLGA y cargadas con morin hidrato.
- Elaborar y caracterizar nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato y, posteriormente funcionalizadas en superficie con el dipéptido fenilalanina-fenilalanina.
- Elaborar y caracterizar nanopartículas elaboradas con PLGA-fenilalanina-fenilalanina/PLGA y cargadas con morin hidrato.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudios previos

3.1.1. Elaboración de NPs por el método de nanoprecipitación

El protocolo desarrollado para la elaboración de nanopartículas mediante el método de nanoprecipitación consiste en disolver 50 mg de polímero PLGA Resomer RG 502 (Evonik®, Alemania) en 3,9 mL de acetona (Fisher Scientific®, España). A esta solución se le añaden 0,1 mL de una solución de morin hidrato (Sigma Aldrich®, España) en etanol (Fisher Scientific®, España), previamente preparada a una concentración de 10 mg/mL. Todo ello se mezcla por agitación en vórtex durante 1 min. Esta solución se adiciona con una pipeta *pasteur*, gota a gota, sobre 12 mL de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 0,5% (Acros Organic®, EE.UU.); manteniendo una agitación magnética moderada. La suspensión resultante se mantiene en agitación a la misma velocidad durante 30 minutos. Para eliminar la acetona presente en el medio, la suspensión se lleva a un rotavapor (IKA Labortechnik, Alemania; Bomba Buchi Copp., Suiza) durante 2,5 horas, a temperatura ambiente y a una presión de 70 mbar.

Una vez eliminado el disolvente orgánico, la suspensión de NPs se centrifuga durante 30 minutos a 13.000 rpm (Sorvall ST8R Thermo Fisher®, España), se lava hasta 3 veces con agua destilada, repitiendo idéntico protocolo de centrifugado. Finalmente, se incorpora 1 mL de una solución al 1,5% de sacarosa como crioprotector (Panreac Química S.A, España y se liofiliza durante 24 horas (Lyo Quest®, Azbil Telstar® S.A., España)

Siguiendo el mismo método, también se elaboraron formulaciones que incorporan en la fase orgánica 10 µl de un excipiente, labrafil® M 1944CS (Gattefossé, Francia), con el fin de modificar las características de cesión de las nanopartículas.

La figura 5.1 muestra esquemáticamente el proceso de elaboración de las NPs mediante este método de nanoprecipitación.

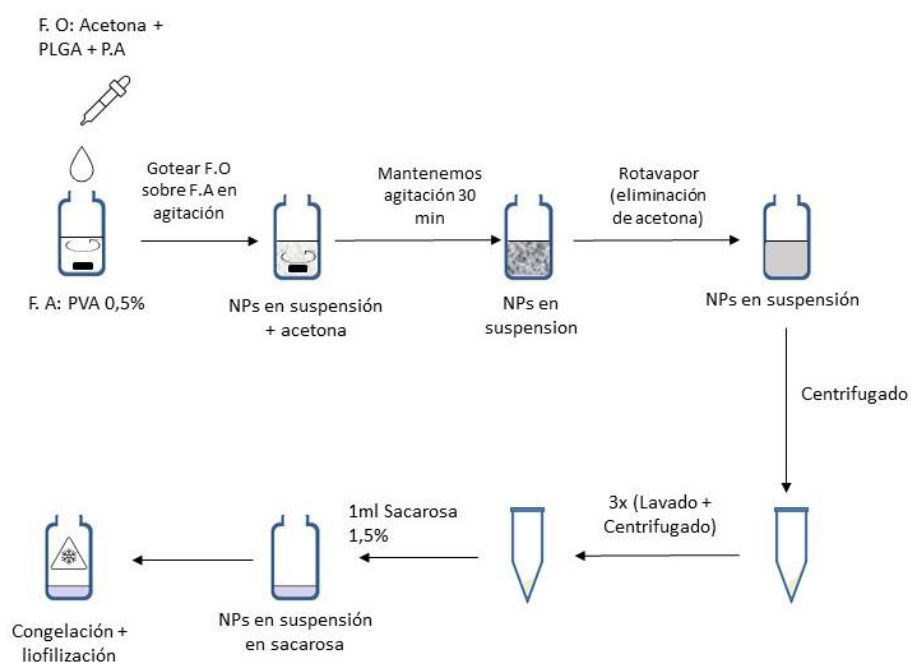


Figura 5.5: Esquema de elaboración de las NPs de PLGA y morin hidrato por nanoprecipitación.

3.1.2. Elaboración de NPs por el método de extracción- evaporación del solvente

Para la elaboración de NPs por el método de extracción- evaporación del solvente se parte de 50 mg de PLGA 502 que se disuelven en 2 mL de diclorometano (DCM) (Fisher Scientific®, España) y a esta solución se le adiciona 0,1 mL de MH disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific®, España) a la concentración deseada, asegurando una mezcla homogénea mediante agitación en vórtex. La solución resultante se adiciona sobre 6 mL de una disolución acuosa de PVA al 1,5%. La mezcla resultante de fases orgánica y acuosa se somete a agitación en sonicador (Accumet® AE150, Fisher Scientific, España) en pulsos de 10/15 segundos on/off durante 10 minutos, manteniendo el vial en un baño de hielo para prevenir el aumento de la temperatura. Pasado ese tiempo, la dispersión obtenida se deja en agitación magnética moderada durante 2,5 horas, para permitir la evaporación del disolvente orgánico y la formación de las NPs.

Una vez eliminado el disolvente orgánico se sigue idéntico protocolo de recuperación, lavado y liofilización que en el caso previamente descrito para el método de nanoprecipitación.

La formulación (NPMH-4) se elabora mediante el mismo método, pero con la incorporación en la fase orgánica 10 µL de labrafac® Lipophile WL 1349 (Gatefossé, Francia), con el fin de modificar las características de cesión del MH a partir de las nanopartículas.

La figura 5.2 refleja un esquema del proceso de elaboración mediante este método.

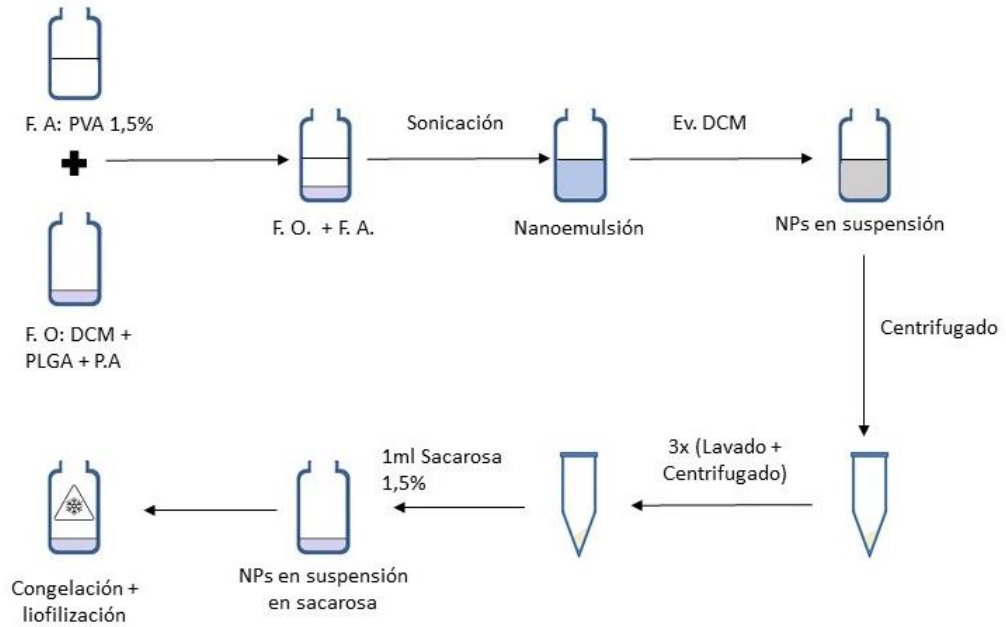


Figura 5.6: Esquema de elaboración de NPs de PLGA y morin hidrato por extracción-evaporación del solvente.

En la tabla 5.1 se muestran las diferentes formulaciones de NPs cargadas con MH desarrolladas y se indica en cada caso el método de elaboración empleado.

Formulación	Método de elaboración	PLGA	MH	Labrafil	Labrafac
NPMH-1	Nanoprecipitación	50 mg	1 mg	-	-
NPMH-2	Nanoprecipitación	50 mg	1 mg	10 µL	-
NPMH-3	Extracción- evaporación del solvente	50 mg	1 mg	-	-
NPMH-4	Extracción- evaporación del solvente	50 mg	1 mg	-	10 µL
NPMH-5	Extracción- evaporación del solvente	50 mg	5 mg	-	-
NPMH-6	Extracción- evaporación del solvente	50 mg	10 mg	-	-

Tabla 5.1: Formulaciones de NPs de morin hidrato elaboradas en los estudios previos.

Se han preparado también NPs no cargadas con MH. Para los estudios previos, la caracterización de las formulaciones se realiza atendiendo, exclusivamente, al tamaño de partícula, la eficacia de encapsulación (EE%) y la cesión in vitro (efecto *burst*) inicial.

3.2. Elaboración de nanopartículas funcionalizadas con fenilalanina

3.2.1. Nanopartículas de PLGA cargadas con morin hidrato

Las NPs seleccionadas (NPMH-5), fueron elaboradas por medio del método de extracción-evaporación del solvente descrito anteriormente. Para la elaboración se emplean 50 mg de PLGA 502 y 5 mg de MH.

3.2.2. Nanopartículas de PLGA funcionalizadas en superficie con fenilalanina (NPpheA-MH)

Para la unión del dipéptido fenilalanina-fenilalanina (phe-phe) a la superficie de las NPs seleccionadas (NPMH-5), ha sido necesario activar los grupos carboxilo del PLGA. Por este motivo, las NPs previamente elaboradas y cargadas con MH, pero sin liofilizar, se mantuvieron en 1 mL de H₂O destilada durante 24 horas a una temperatura de 4°C. El proceso de funcionalización se realizó adaptando el protocolo desarrollado por Constantino et al. (Constantino, et al., 2005) descrito en el capítulo anterior de esta memoria.

3.2.3. Nanopartículas elaboradas con PLGA-phe-phe (NPpheB-MH)

Para la elaboración de esta formulación (NPpheB-MH), se emplea PLGA 502 al que se une por un enlace covalente peptídico el dipéptido (phe-phe) hasta obtener un polímero: PLGA-phe-phe. El protocolo para la unión del péptido de fenilalanina al PLGA queda recogido en el capítulo anterior de esta memoria.

Para la elaboración de esta formulación de NPs (NPpheB-MH) se emplea una mezcla de 50 mg de PLGA-phe-phe y PLGA 502 en una proporción 40:60. Las NPs se elaboran por el método de extracción-evaporación del solvente que se ha explicado anteriormente, empleando 5 mg de MH.

Se han preparado también NPs no cargadas con MH.

La tabla 5.4 muestra las diferentes formulaciones de nanopartículas de morin hidrato elaboradas.

Formulación	PLGA 502	PLGA -PhePhe	Phe-Phe	MH
NPMH-5	50 mg	-	-	5 mg
NPpheA-MH	50 mg	-	2 mg	5 mg
NPpheB-MH	30 mg	20 mg	-	5 mg

Tabla 5.4: Composición de las formulaciones NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH.

3.3. Caracterización de las formulaciones

3.3.1. Determinación del tamaño de partícula

Con el objetivo de determinar el tamaño de partícula medio y la distribución de tamaños de todas las formulaciones elaboradas, antes y después de la liofilización, se ha empleado la técnica de difracción de rayos láser, utilizando para ello un equipo Zetatrac® Ultra (Microtac, Inc., EE.UU.). Se determina el diámetro medio de las NPs como DV y la distribución de tamaños mediante curvas distributivas de volumen.

Para calcular el span y el índice de polidispersión (IP) se emplean las ecuaciones y los criterios explicados en el capítulo anterior de esta memoria.

3.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis morfológico de las NPs se ha realizado por SEM (Jeol, JEM-7600F, Japón). Estos estudios se han llevado a cabo con las formulaciones NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH. Este estudio permite determinar la forma, homogeneidad de tamaño, estado de agregación de las partículas y la presencia de alteraciones en su superficie, aspectos que pueden afectar al perfil de liberación del MH.

Para la realización del análisis, las muestras se recubren con una fina capa de oro coloidal aplicada en un evaporador de vacío catódico antes de la observación por SEM a 20 KV.

3.3.3. Propiedades superficiales

La determinación del potencial Z de las distintas formulaciones de NPS se ha realizado mediante la técnica de dispersión de luz, se utiliza para ello un equipo Zetasizer Nano S[®] (Malvern Instrument's, UK), y empleando una célula capilar Capillary cell enhances[®] (Malvern Instrument's, UK) para la lectura de las muestras. Para el análisis, se prepara una suspensión con las formulaciones de NPs liofilizadas, en agua destilada, a una concentración de 100 µg/mL. Las muestras se agitan en vórtex a velocidad moderada durante 1 minuto, para asegurar la dispersión de las NPs.

El potencial Z se ha determinado en las formulaciones NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH, comparado los resultados con las mismas formulaciones no cargadas con el principio activo MH.

3.3.4. Determinación de la eficacia de encapsulación y de la cantidad de morin encapsulado

Para la determinación del contenido en MH de las NPs se pesan 10 mg de cada formulación y se disuelven en 1 mL de DCM bajo agitación en vórtex. A continuación, se adicionan 4 mL de metanol (MeOH) (Fisher Scientific, España). Al ser el PLGA insoluble en MeOH, este precipita, pero como el MH es muy soluble en el alcohol, se solubiliza. Seguidamente, se centrifugan a 13.000 rpm durante 5 minutos, para separar el polímero del sobrenadante. Este proceso se repite 3 veces, para así asegurar la máxima extracción del flavonoide. A continuación, se determina el contenido en MH por cromatografía líquida de alta resolución, de acuerdo al procedimiento que se describe en el capítulo de métodos analíticos de esta memoria. La cuantificación del contenido en MH se ha realizado por triplicado para cada formulación.

La eficacia de encapsulación (EE%) se expresa como porcentaje de principio activo que ha sido retenido en el interior de las NPs, respecto al total empleado para su elaboración. Para ello, se utiliza la siguiente ecuación:

$$EE(\%) = \frac{\text{Cantidad de p. a. obtenido experimentalmente}}{\text{Cantidad de p. a. teórico}} \times 100$$

La cantidad de principio activo encapsulado se expresa como microgramos de morin en 100 mg de NPs.

3.3.5. Ensayo de cesión *in vitro*

Para la realización de los ensayos de cesión *in vitro* de MH, se pesan 20 mg de la formulación de NPs, que se introducen en tubos eppendorff y se suspenden en 4 mL de una solución PBS a pH 7,4. Este volumen permite mantener condiciones “*sink*” durante todo el ensayo de cesión. Las muestras se mantienen en un baño termostaticado Memmert WNB 45 (Mettler®, Alemania) a $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ con una agitación constante de 100 rpm.

La toma de muestras se realiza a los siguientes tiempos: 1, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 192 y 216 horas. Previo a la toma de muestras, y con el fin de evitar arrastrar NPs, se centrifugan las mismas a 5.000 rpm durante 5 minutos empleando, para retirar el medio, una aguja de 30 G acoplada a una jeringa de 5 mL. El volumen extraído se repone nuevamente con una solución de tampón PBS recién preparada.

La muestra extraída se filtra a través de filtros PVDF (fluoruro de polivinilideno) de 0,45 μm (Teknokroma Analítica, SA, España) y la cuantificación de MH se realiza mediante espectrofotometría empleando el método descrito en el capítulo de técnicas analíticas de esta memoria. Todos los ensayos de cesión *in vitro* del MH a partir de las NPs se han realizado por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudios previos

La tabla 5.5 recoge los resultados de tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (IP) y span de las formulaciones de NPs desarrolladas en los estudios previos.

Formulación	Tamaño medio \pm DE (nm)	IP	span
NPMH-1	178,8 \pm 10,50	0,26	0,78
NPMH-2	249,8 \pm 3,60	0,34	0,86
NPMH-3	187,7 \pm 15,16	0,29	0,83
NPMH-4	212,9 \pm 10,5	0,46	0,77
NPMHi-5	188,6 \pm 10,7	0,32	0,90
NPMH-6	200 \pm 7,32	0,43	0,94

Tabla.5.5: Resultados de tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP), y span de las formulaciones de NPs elaboradas en los estudios previos.

La tabla 5.6 recoge los resultados de eficacia de encapsulación (EE), burst o cesión en la primera hora, y duración de la cesión de MH a partir de las formulaciones de NPs desarrolladas en los estudios previos.

Formulación	EE (%)±DE	Cantidad media encapsulada ± DE (µg/100 mg NPs)	Burst inicial (%)	Duración de la cesión (h)
NPMH-1	56,24±0,57	1071,24 ± 10,86	53,6 ± 3,25	144
NPMH-2	71,82±2,81	1368,00 ± 51,92	43,68 ± 2,89	144
NPMH-3	60,13±2,72	1145,33 ± 51,81	40,1 ± 1,11	192
NPMH-4	57,57±1,38	1096,57 ± 26,28	73,42 ± 3,55	144
NPMH-5	82,54±1,42	7860,95 ± 135,24	45,5± 1,84	216
NPMH-6	62,16±0,36	11840,00 ± 68,57	57,8± 2,93	192

Tabla 5.6: Resultados de eficacia de encapsulación (±DE), cantidad de MH encapsulado (±DE), burst inicial (cesión en la primera hora), y duración de la cesión de MH a partir de las formulaciones de NPs elaboradas en los estudios previos.

Para la selección del método más adecuado, en primer lugar, se compararon los resultados obtenidos por las formulaciones base NPMH-1 y NPMH-3, elaboradas cada una por dos métodos distintos: nanoprecipitación y extracción-evaporación del solvente, respectivamente. Como podemos observar en las tablas 5 y 6, los resultados obtenidos por ambos métodos fueron bastante similares. Si bien el tamaño de partícula de NPMH-1 fue ligeramente inferior, las diferencias entre ambas formulaciones no fueron estadísticamente significativas. En lo referente a la EE y la cantidad de MH encapsulada, los valores obtenidos fueron, en todos los casos, relativamente bajos y se obtuvieron resultados ligeramente mejores con el método de extracción-evaporación del solvente que con el

de nanoprecipitación. Sin embargo, fue en los ensayos de cesión donde se observaron mayores diferencias entre ambos métodos de elaboración; así, la cesión inicial de MH a la hora (efecto *burst*) fue de más del 50% para la formulación de NPs preparadas por nanoprecipitación (NPMH-1) y del 40% en el caso de la formulación NPMH-3. El tiempo que permanecieron cediendo ambas formulaciones también supuso una diferencia, ya que a los 7 días la velocidad de cesión era muy lenta, de manera que la cantidad cedida de MH no era cuantificable en el caso de la formulación NPMH-1.

Para intentar reducir el *burst* inicial y aumentar la cantidad de MH encapsulada en las NPs obtenidas por nanoprecipitación, se procedió a incorporar a la fase orgánica una pequeña cantidad de labrafil®. Como se puede observar en la tabla 6, el *burst* inicial de la formulación así desarrollada (NPMH-2) fue ligeramente menor (43,68%), aunque el tiempo en que la formulación continuó liberando el MH fue el mismo (144 horas). No obstante, el tamaño de partícula obtenido en este caso se incrementó de forma significativa y alcanzaron un tamaño medio de 250 nm, tamaño excesivamente elevado para nuestros objetivos.

A la luz de estos resultados, y teniendo en cuenta que el método de extracción-evaporación del solvente es más sencillo y rápido, se ha seleccionado este último para la elaboración de las NPs de MH y continuar con sus estudios y ensayos.

En este mismo sentido y, para intentar mejorar la eficacia de encapsulación y el *burst* inicial de la formulación NPMH-3, se incorporó a la formulación otro tensioactivo biocompatible, labrafac®. Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto no modifica significativamente la

EE y sí incrementa ligeramente el tamaño de partícula, hasta los 212 nm. Sin embargo, el efecto *burst* aumenta de forma significativa, liberándose más del 70% del contenido de MH en la primera hora del ensayo de cesión in vitro. Esto puede ser debido a que el carácter más hidrófobo de este excipiente (labrafac®) favorece la liberación del MH al reducir su afinidad por la matriz polimérica.

Para incrementar la cantidad de MH encapsulado, utilizando el método de extracción- evaporación del solvente, se procedió a aumentar la cantidad inicial del principio activo en la formulación, empleando para ello 5 mg y 10 mg disueltos en DMSO (formulaciones NPMH-5 y NPMH-6). Los resultados demuestran que al añadir 5 mg de MH el tamaño medio de partícula no cambia de forma significativa respecto a las NPs elaboradas con 1 mg. Sin embargo, al trabajar con 10 mg, los tamaños medios obtenidos son ligeramente superiores a 200 nm. Por otro lado, la formulación NPMH-5 presenta una mejor eficacia de encapsulación ($82,54 \pm 1,4\%$) respecto a la NPMH-6 ($62,16 \pm 0,36\%$), que fue elaborada con una cantidad inicial de activo de 10 mg. Se puede suponer que la capacidad de las NPs para encapsular MH por este método es limitada, esto resulta evidente al aumentar los porcentajes iniciales de activo utilizado. Sin embargo, cuando hemos empleado cantidades de principio activo de 1 mg (NPMH-3), en contra de lo que cabría esperar, la EE obtenida es muy baja. Este hecho podría estar relacionado con la solubilidad del morin en la fase acuosa, que solo se manifiesta a concentraciones bajas del flavonoide.

Por último, al comparar efecto *burst* inicial para ambas formulaciones, se observa un claro incremento para la formulación NPMH-6 ($57,8 \pm 2,93\%$). Hay que tener en cuenta que las NPs tienen que ser funcionalizadas en superficie con un dipéptido (phe-phe), y que durante este proceso se puede liberar principio activo, por ello, interesa seleccionar aquellas formulaciones que presenten una menor cesión inicial.

Por todo lo indicado, teniendo en cuenta la disminución en la eficacia de encapsulación y el incremento en el *burst* de la formulación NPMH-6 en la primera hora del ensayo, se selecciona la formulación NPMH-5 como la más adecuada para los objetivos.

4.2. Caracterización de las nanopartículas de morin hidrato

Las formulaciones de NPs de morin hidrato NPMH-5 y NPpheA-MH funcionalizadas en superficie, y la NPpheB-MH, elaboradas con el polímero PLGA-phe-phe (40%) y PLGA (60%), se han caracterizado empleando diferentes técnicas.

4.2.1. Estudios morfológicos y determinación del tamaño de partícula

En la tabla 5.7 se recogen los resultados de tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (IP) y span obtenidos.

Formulación	Tamaño medio±DE (nm)	IP	span
NPMH-5	188,60±16,70	0,32	0,90
NPpheA-MH	196,40±3,81	0,24	0,66
NPpheB-MH	189,10±8,27	0,33	0,94

Tabla 5.7: Resultados de tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP), y span de las formulaciones de NPs elaboradas.

En la figura 5.3 se muestra la distribución del tamaño de partícula de nanopartículas correspondientes a las formulaciones NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH.

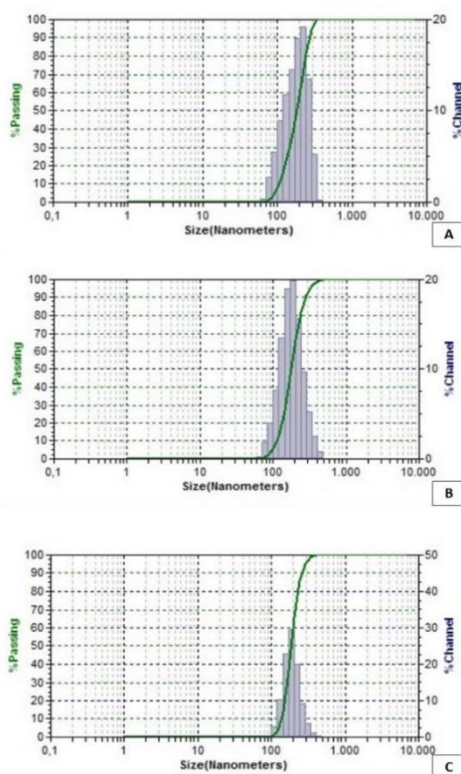


Figura 5.7: Distribución de tamaños partícula de un lote correspondiente a las formulaciones. A: NPMH-5. B: NPpheA-MH. C: NPpheB-MH.

El análisis del tamaño de partícula medio y la distribución de tamaños de las distintas formulaciones revelaron que en todos los casos se han obtenido poblaciones con una dispersión homogénea y un tamaño similar. La similitud entre los tamaños de los lotes NPMH-5 y NPpheA-MH es algo que se podría esperar, dado que no existe variación en el proceso de elaboración de estas nanopartículas y la diferencia entre unas y las otras reside únicamente en el proceso de funcionalización adicional sobre la superficie. Sin embargo, la formulación NPpheB-MH, que incorpora tanto PLGA previamente unido al dipéptido de fenilalanina (PLGA-phe-phe) como PLGA, tampoco presenta diferencias significativas en el tamaño y forma respecto de formulaciones anteriores, tal y como podemos observar en la tabla 5.7. Esto indica que la incorporación del péptido al polímero PLGA no modifica el tamaño de las NPs elaboradas en las mismas condiciones, mediante el método de extracción-evaporación del solvente.

Las figuras 5.4, 5.5 y 5.6 muestran imágenes obtenidas por SEM de las nanopartículas correspondientes a las formulaciones NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH.

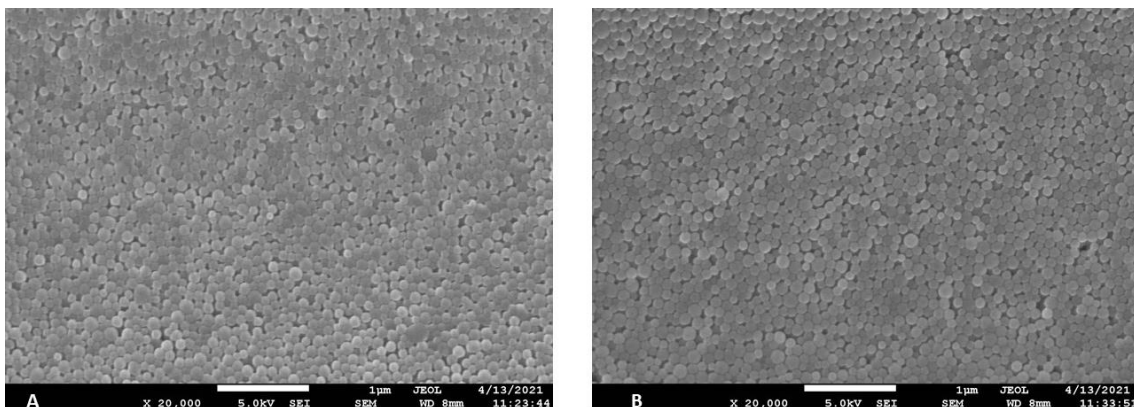


Figura 5.8: Imágenes de SEM correspondientes a la formulación NPMH-5: A. cargada con MH; B: blancas.

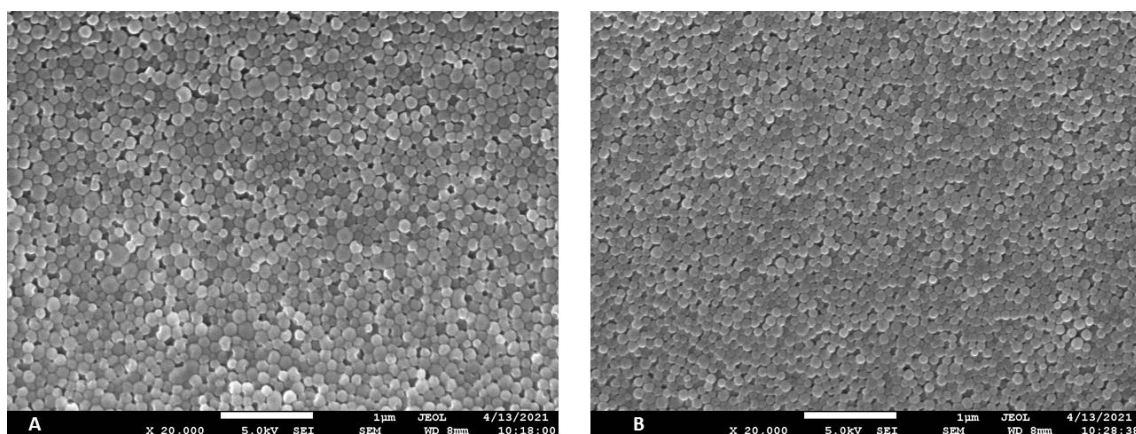


Figura 5.9: Imágenes de SEM correspondientes a la formulación NpPheA: A. cargada con MH; B: blancas.

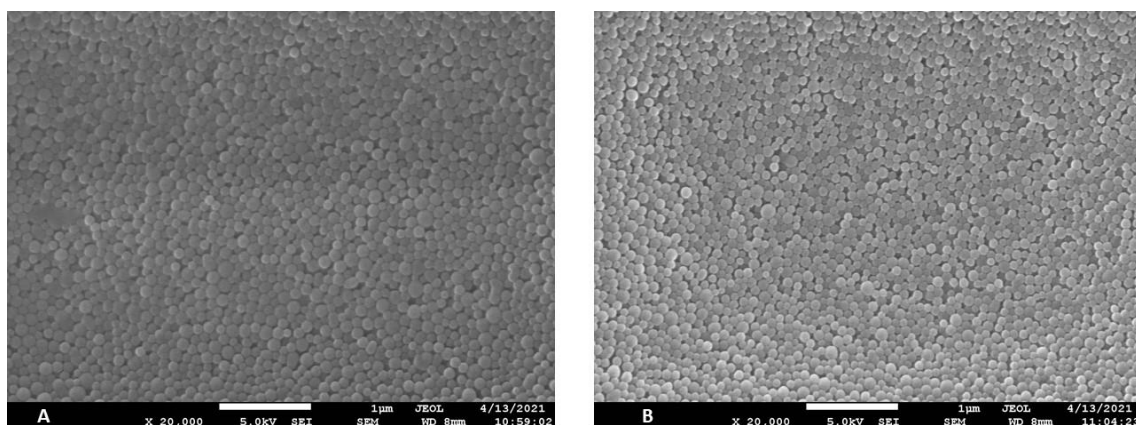


Figura.5.10: Imágenes de SEM correspondientes a la formulación NpPheB: A. cargada con MH; B: blancas.

En las figuras se observa que las tres formulaciones presentan superficies lisas y una distribución homogénea en el tamaño de las partículas, tal y como ha quedado demostrado en los análisis realizados mediante difracción de rayos láser.

Las imágenes del SEM también evidenciaron que morfológicamente no existen diferencias en el tamaño de partícula en las tres formulaciones (cargadas con MH y no cargadas).

4.2.2. Potencial Zeta

Los resultados del análisis de potencial zeta de las formulaciones elaboradas se recogen en la tabla 5.8.

	Potencial Z Nps MH \pm DE (mV)	Potencial Z Nps blancas \pm DE (mV)
NP	-20,77 \pm 0,45	-25,4 \pm 1,38
NPpheA	-20,53 \pm 0,40	-20,03 \pm 0,21
NPpheB	-23,27 \pm 0,86	-18,27 \pm 2,15

Tabla 5.8. Valores medios (\pm DE) de potencial zeta de las formulaciones elaboradas con MH y sin cargar (blancas).

Como pudimos observar en las NPs cargadas con rodamina desarrolladas para los estudios de biodistribución, ambos procesos de funcionalización han supuesto una modificación de la carga superficial de las NPs y existe una pequeña tendencia a la neutralización de la misma. Todas las NPs que incorporan el dipéptido en su formulación dan lugar a una reducción en el potencial Z, que resulta más evidente en la formulación elaborada con PLGA-phe-phe.

Al encapsular el flavonoide MH en las NPs se observan variaciones en el potencial Z de las tres formulaciones (NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH). En primer lugar, la formulación NPMH-5 presenta una disminución de la carga superficial (-20,77 \pm 0,45mV) con respecto a las mismas partículas no cargadas (-25,4 \pm 1,38 mV). Esto se puede deber a que parte del MH quede en la superficie de las NPs, no siendo internalizado en la matriz polimérica. La formulación NPpheA-MH no presenta diferencias significativas en el potencial Z al comparar las NPs blancas y las cargadas

con MH. Este comportamiento se podría atribuir al largo tiempo de contacto de las NPs con medios acuosos durante el proceso de funcionalización, responsable de la pérdida del MH en las capas superficiales de la formulación. Sin embargo, la formulación NPpheB-MH, muestra un aumento de la carga negativa en la superficie de las NPs cuando se incorpora el Morin, probablemente debido a la elevada cantidad de morin encapsulada.

4.2.3. Eficacia de encapsulación y cantidad de morin encapsulada

La tabla 5.9 muestra los valores medios obtenidos de cantidad de MH encapsulado y de eficacia de encapsulación obtenidos para las distintas formulaciones.

Formulación	Cantidad media de MH encapsulado ($\mu\text{g}/100 \text{ mg NPs}$) $\pm\text{DE}$	EE (%) media \pm DE
NPMH-5	7.503,63 \pm 88,05	82,54 \pm 1,42
NPpheA-MH	3.710,60 \pm 217,05	42,44 \pm 2,65
NPpheB-MH	9.023,83 \pm 204,44	96,26 \pm 3,16

Tabla 5.9: Cantidad media de MH encapsulado ($\pm\text{DE}$) y eficacia de encapsulación media (EE) ($\pm\text{DE}$) en las formulaciones de NPs elaboradas.

La eficacia de encapsulación media entre las formulaciones elaboradas resultó muy dispar. Si se toma la formulación NPMH-5 como referencia, que presenta una eficacia de encapsulación algo superior al 80%; se observa que la formulación NPpheB-MH presenta un valor bastante más elevado, cercano al 100%. Esta elevada eficacia de encapsulación se podría relacionar con la presencia de la fenilalanina en la formulación. Probablemente, la presencia de este dipéptido modifica las características

de la matriz polimérica y aumenta la afinidad del morin hacia la misma. Este hecho se podría explicar debido a que los anillos aromáticos de la fenilalanina pueden establecer enlaces electrónicos tipo π con los anillos del flavonoide, hecho que también se manifiesta en el caso de la rodamina (como hemos podido ver en el capítulo anterior de esta memoria). El péptido phe-phe es bastante lipófilo, y si a eso se suma la presencia de los anillos del morin, se puede obtener una estructura altamente lipófila que se orientaría hacia el núcleo de las NPs, dejando en superficie las terminaciones carboxílicas del PLGA, mucho más hidrófilas.

Por otra parte, la pérdida de MH a partir de la formulación NPpheA-MH tras su funcionalización, reduce de forma significativa la EE a valores de alrededor el 42,44%. Esto es probablemente debido a que la unión de phe-phe a la superficie de las NPs requiere tiempos elevados de agitación en distintos medios (tampón MES y tampón PBS) y se produce la pérdida de, prácticamente, la mitad del flavonoide encapsulado.

4.2.4. Ensayos de cesión

Las tablas 5.10 a 5.12 y las figuras 5.7, 5.8 y 5.9 recogen y muestran los resultados del ensayo de cesión in vitro de MH a partir de las formulaciones de NPs (NPMH-5, NPpheA-MH y NPpheB-MH).

Tiempo (h)	Cantidad media cedida acumulada de MH ($\mu\text{g}/100 \text{ mg NPs}$)($\pm\text{DE}$)	Porcentaje medio cedido acumulado ($\pm\text{DE}$)
1	3189,43 \pm 138,01	45,51 \pm 1,84
6	4317,37 \pm 86,50	57,54 \pm 1,15
24	5035,33 \pm 264,31	67,11 \pm 3,52
48	5251,24 \pm 177,12	69,98 \pm 2,36
72	5425,29 \pm 113,08	72,30 \pm 1,51
96	5636,57 \pm 271,70	75,12 \pm 3,62
168	6314,52 \pm 300,81	84,15 \pm 4,01
192	6682,19 \pm 247,08	89,05 \pm 3,29
216	6890,69 \pm 328,22	91,83 \pm 4,37

Tabla 5.10: Resultados de los ensayos de cesión in vitro realizados con la formulación NPMH-5.

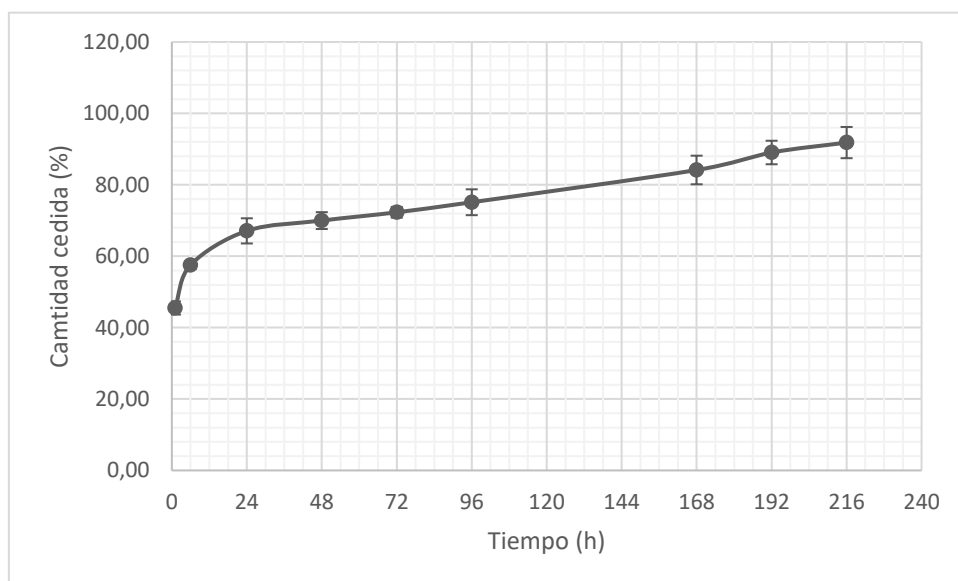


Figura 5.7: Porcentajes medios de MH cedidos ($\pm\text{DE}$) en los ensayos realizados con la formulación NPMH-5.

Tiempo (h)	Cantidad media cedida acumulada de MH ($\mu\text{g}/100 \text{ mg NPs}$)($\pm\text{DE}$)	Porcentaje medio cedido acumulado ($\pm\text{DE}$)
1	910,60 \pm 24,67	23,85 \pm 0,65
6	997,20 \pm 96,66	26,12 \pm 2,53
24	1435,47 \pm 96,01	37,60 \pm 2,51
48	1804,36 \pm 97,28	47,26 \pm 2,55
72	2156,60 \pm 135,62	56,48 \pm 3,55
96	2256,40 \pm 146,03	59,10 \pm 3,82
168	2965,95 \pm 170,99	77,68 \pm 4,48
192	3198,32 \pm 67,38	83,77 \pm 1,76
216	3326,34 \pm 80,46	87,12 \pm 2,11
240	3364,27 \pm 145,26	88,11 \pm 3,80

Tabla 5.11: Resultados de los ensayos de cesi3n in vitro realizados con la formulaci3n NPpheA-MH.

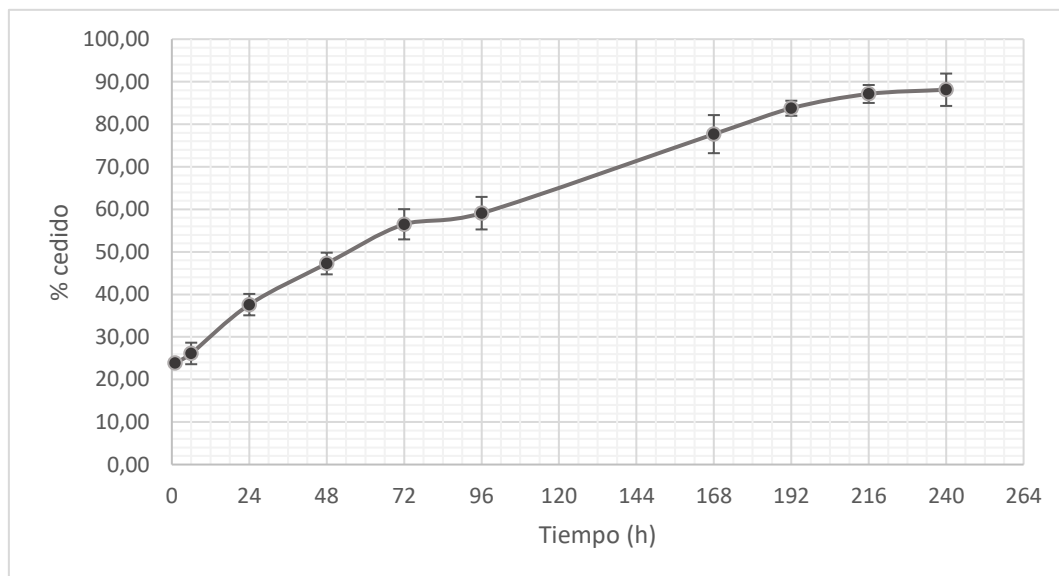


Figura 5.8: Porcentajes medios de MH cedidos ($\pm\text{DE}$) en los ensayos realizados con la formulaci3n NPpheA-MH.

Tiempo de muestreo (h)	Cantidad media cedida acumulada de MH ($\mu\text{g}/100 \text{ mg NPs}$)($\pm\text{DE}$)	Porcentaje medio cedido acumulado ($\pm\text{DE}$)
1	4256,09 \pm 279,43	47,17 \pm 3,15
6	5535,33 \pm 437,56	61,34 \pm 4,93
24	6262,00 \pm 151,99	69,39 \pm 1,71
48	6843,71 \pm 261,58	75,84 \pm 2,95
72	7505,36 \pm 227,54	83,17 \pm 2,57
96	8109,43 \pm 158,64	89,87 \pm 1,79
168	8663,54 \pm 224,34	96,01 \pm 2,53
192	8800,18 \pm 173,22	97,52 \pm 1,95
216	8870,56 \pm 201,98	98,30 \pm 2,28

Tabla 12: Resultados de los ensayos de cesión in vitro realizados con la formulación NPPheB-MH.

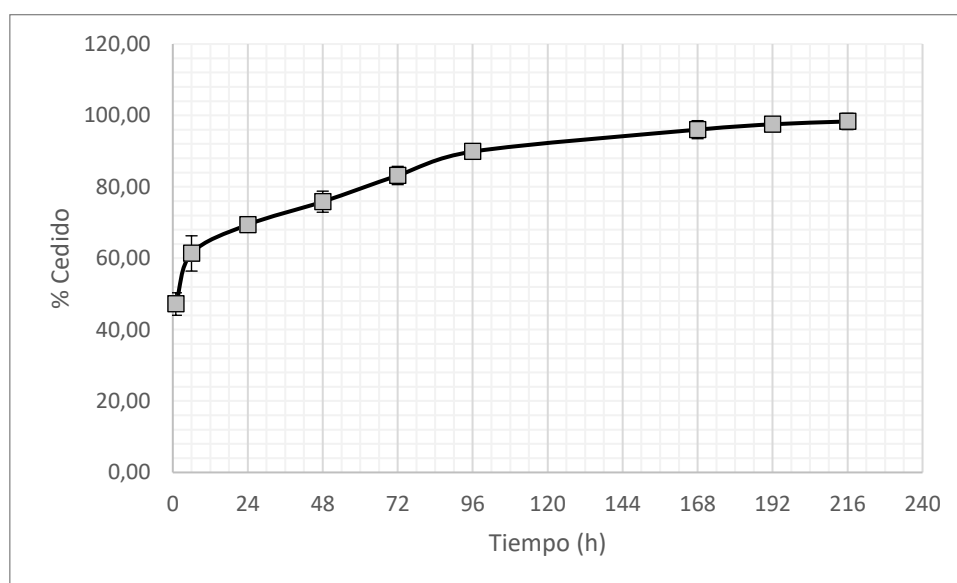


Figura 9: Porcentajes medios de MH cedidos ($\pm\text{DE}$) en los ensayos realizados con la formulación NPPheB-MH.

Como se puede observar en la figura 5.7 la formulación NPMH-5 presenta una velocidad de cesión rápida durante las primeras 24 horas y llega a alcanzar una cesión del 67,11% del MH en ese tiempo. A partir del

primer día, la velocidad de liberación se hace más lenta y se mantiene constante durante 9 días, al cabo de los cuales se ha cedido el 91,83% de MH.

Por lo que se refiere a la formulación NPpheA-MH (figura 5.8, tabla 5.11), funcionalizada después de la elaboración de las NPs de MH, presenta una liberación más lenta y controlada durante todo el tiempo del ensayo. En las primeras 24 horas el porcentaje de MH liberado es un 23,85%. Esta disminución del *burst* inicial, en comparación con la formulación NPMH-5, puede ser debida a la pérdida del MH situado en las capas superficiales de las NPs durante el proceso de funcionalización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al determinar el potencial Z. Sin embargo, al tratarse de una formulación con una eficacia de encapsulación mucho menor (tabla 9), se puede considerar que la cantidad que se libera a lo largo del tiempo es la que se encuentra encapsulada en el interior de las NPs. En este caso, al cabo de 9 días se ha liberado el contenido de MH por difusión, quedando en el interior una pequeña cantidad del flavonoide (12%) que, probablemente, se libera cuando comience el proceso de erosión.

La formulación NPpheB-MH (figura 5.9, tabla 5.12), elaborada con PLGA-phe-phe y PLGA, presenta un perfil de liberación similar a la formulación NPMH-5, con un elevado *burst* en las 24 primeras horas, que supone casi el 50% de la cantidad de MH encapsulada. Sin embargo, a partir de este tiempo, la velocidad de liberación se mantiene constante durante 9 días, a una velocidad adecuada para obtener niveles terapéuticos.

Otros autores también obtienen liberaciones muy rápidas del morin a partir de nanopartículas. Así, Ghosh et al. (Ghosh, et al.,2017) elabora NPs

de albumina que liberan el 80% de MH durante las primeras 12-20 horas. Similares resultados obtienen Song et al. con NPs de otro flavonoide como es la curcumina (Song, et al., 2016). Esta formulación presenta también un perfil bifásico y llega a liberar prácticamente la totalidad del principio activo antes de las 16 primeras horas.

Al comparar las cantidades liberadas de MH a partir de las formulaciones NPpHeA-MH y NPpHeB-MH podrían ser suficientes para obtener niveles terapéuticos durante 9 días. Por otro lado, y en función de los resultados de los estudios de biodistribución realizados en esta tesis, que se comentan en el capítulo correspondiente, la formulación NPpHeA-MH presenta un mejor acceso o más rápido al SNC que la formulación NPpHeB-MH. Sin embargo, como indican Cayero-Otero et al. el acceso al tejido cerebral mediante transcitosis mediada por receptores, mecanismo que se ha buscado con la funcionalización de las nanopartículas, puede resultar más lento que la difusión pasiva (Cayero-Otero, et al., 2019). Por otro lado, los estudios de biodistribución realizados por Marcianes et al. con NPs cargadas con rodamina indican que, aunque la rodamina es expulsada del tejido cerebral durante la primera hora, no se puede afirmar que las NPs también lo sean (Marcianes, et al., 2017), por lo que en nuestro caso, se puede considerar que ambas formulaciones podrían ser interesantes para conseguir niveles terapéuticos de MH en SNC, para la formulación NPpHeA-MH, debido a su más rápido y/o mayor paso a través de BHE, y para la formulación NPpHeB-MH debido a su permanencia a tiempos más prolongados en el SNC, mayor carga de MH y mejor control en su liberación.

VI- CONCLUSIONES

- 1- Los dos métodos de cuantificación de morin hidrato desarrollados por HPLC resultaron ser lineales, selectivos y precisos. El método que emplea HCl en la preparación de las muestras resultó ser más exacto y sensible, disminuyendo los límites de detección y cuantificación del flavonoide.

- 2- El método de cuantificación de morin hidrato por espectrofotometría UV resultó ser lineal, exacto, selectivo y preciso, siendo adecuado para la cuantificación de las cantidades cedidas de flavonoide a partir de las nanopartículas.

- 3- La unión del dipéptido de fenilalanina a las nanopartículas consigue modificar su biodistribución. La formulación NPpheA-Rh, funcionalizada con el dipéptido en superficie, presenta marcada afinidad hacia bazo y, únicamente a las dos horas de su administración, aumenta su presencia en hígado y pulmón. La formulación NPpheB-Rh, elaborada con PLGA y PLGA-phe-phe, presenta una mayor distribución en hígado y pulmón, aunque en todos los órganos estudiados, las cantidades de rodamina-B son inferiores a las encontradas con la formulación NPpheA-Rh.

- 4- La unión del péptido phe-phe a las nanopartículas de PLGA consigue favorecer su paso a través de la barrera hematoencefálica. La formulación NPpheA-Rh alcanza los mejores resultados, con cantidades de rodamina-B en sistema nervioso central, a tiempos cortos, superiores a las obtenidas por las nanopartículas elaboradas con PLGA y PLGA-phe-phe. Esta formulación (NPpheB-Rh), mantiene niveles de rodamina-B prácticamente constantes en cerebro dos horas después de su administración, lo que podría ser atribuido a un retardo en su paso a través de la BHE.

- 5- El método de extracción- evaporación del solvente, en una proporción MH:PLGA de 1:10 resultó el más adecuado para la obtención de nanopartículas, con un tamaño medio de partícula de unos 190 nm, adecuado para atravesar la barrera hematoencefálica, y con un perfil de cesión de morin hidrato que se mantiene durante al menos 9 días.

- 6- El método de funcionalización empleado para la unión del dipéptido de fenilalanina a la superficie de las nanopartículas elaboradas con un 10% inicial de morin hidrato, supone la pérdida de casi el 50% del P.A. encapsulado, así como una reducción en la eficacia de encapsulación, con respecto a las mismas nanopartículas sin funcionalizar.

- 7- Las nanopartículas elaboradas con los polímeros PLGA (60%) y PLGA unido al dipéptido fenilamina (40%) y un 10% inicial de morin hidrato, incrementan en un 20% la cantidad de activo encapsulado, probablemente debido a que una parte de la fenilalanina se dispone hacia el interior, modificando la matriz polimérica y la afinidad del flavonoide hacia la misma.

VII-BIBLIOGRAFÍA

- Abbad, S., Wang, C., Waddad, A. Y., Lv, H., Zhou, J. (2015). Preparation, in vitro and in vivo evaluation of polymeric nanoparticles based on hyaluronic acid-poly(butyl cyanoacrylate) and D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate for tumor-targeted delivery of morin hydrate. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 305-320. DOI: 10.2147/IJN.S73971
- Abbot, N. J., Rönnbäck, L., Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolma, D. E., Yusof, S. R., Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain-barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13-25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Ruiz, A., Cavaliere, F., Ortiz-Sanz, C., Quintela-López, T., Capetillo-Zarate, E., Solé-Domènech, S., Matute, C. (2018). Mangiferin and Morin Attenuate Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neurocytotoxicity Induced by Amyloid Beta Oligomers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 13, 2856063, DOI: 10.1155/2018/2856063
- Alonso, M., Barcia, E., Córdoba-Díaz, M., Negro, S., Córdoba-Díaz, D., Fernández-Carballido, A. (2020). Development and Validation of an HPLC Method for the Quantification of Morin Flavonoid Encapsulated Within PLGA Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Analysis*, 16 (1). DOI: <https://doi.org/10.2174/1573412916999200905095914>

- Association, A. (2019). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15 (3), 321-387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
- Bark, K. M., Im, S. E., Seo, J. J., Park, O. H., Park, C. H., Park, H. R. (2015). Spectroscopic study on the stability of morin in aqueous solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 36, 498-502. DOI: 10.1002/bkcs.10093
- Bazzoni, G., Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews*, 84, 869-901. DOI: 10.1152/physrev.00035.2003
- Bhowmik, A., Chakravarti, S., Ghosh, A., Shaw, R., Bhandary, S., Bhattacharyya, S., Ghosh, M. K. (2017). Anti-SSTR2 peptide based targeted delivery of potent PLGA encapsulated 3,3'-diindolymethane nanoparticles through blood brain barrier prevents glioma progression. *Oncotarget*, 8(39), 65339-65358. DOI: 10.18632/oncotarget.18689
- Björkhem, I., Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), 806-815. DOI: 10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b
- Boado, R. J., Li, J. Y., Nagaya, M., Zhang, C., Pardridge, W. M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(21), 12079-12084. DOI: 10.1073/pnas.96.21.12079

-
- Boesch, D., Gavériaux, C., Jachez, B., Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P., Loor, F. (1991). In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC833. *Cancer Research*, 51(16), 4226-4233.
- Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *Journal of Physiology*, 429, 47-62. DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp018243.
- Campos-Esparza, M. R., Sánchez-Gómez, M. V., Matute, C. (2009). Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*, 45(4), 358-268. DOI: 10.1016/j.ceca.2008.12.007
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schimid, C. D., Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213, 48-65. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x.
- Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., Puentes V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*, 4(7), 3623-3632. DOI: 10.1021/nn901372t. PMID: 20553005.
- Cayero-Otero, M. D., Gomes, M. J., Martins, C., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M., Sarmiento, B., Martín-Banderas, L. (2019). In vivo biodistribution of venlafaxine-PLGA nanoparticles for brain delivery: plain vs functionalized nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(12), 1413-1427. DOI: 10.1080/17425247.2019.1690452.

- Chen, Y. Y., Tsai, T. H. (2017). Pharmacokinetics and biodistribution of illegal food colorant Rhodamine B in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(5), 1078-1085. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04975.
- Chen, Z., Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271-281. DOI: 10.1007/s12264-013-1423-y.
- Choi, Y. A., Yoon, Y. H., Choi, K., Kwon, M., Goo, S. H., Cha J. S., Choi, M. K., Lee, H. S., Song I. S. (2015). Enhanced oral bioavailability of morin administered in mixed micelle formulation with PluroniF127 and Tween80 in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(2), 208-217. DOI: 10.1248/bpb.b14-00508.
- Cipolla, M. J. (2009). The cerebral circulation. *San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences*, DOI:10.4199/C00005ED1V01Y200912ISP002.
- Constantino, L., Gandolfi, F., Tosi, G., Rivasi, F., Vandelli, M. A., Forni, F. (2005). Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 108(1), 84-96. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.07.013.
- De Gooijer, M. C., Zhang, P., Weijer, R., Buil, L. C., Beijnen, J. H., van Tellingen, O. (2018). The impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain pharmacokinetics and pharmacodynamics of a panel of MEK inhibitors. *International Journal of Cancer*, 142(2), 381-391. DOI:10.1002/ijc.31052
- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C., Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and brain

-
- disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 1-5.
DOI: 10.1007/s11011-011-9274-6.
- Deane, R., Yan, S. D., Subramanian, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A. M., Armstrong, D. L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, Mark., Stern, D., Zlokovic, B. (2003). RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature Medicine*, 9(7), 907-913.
DOI: 10.1038/nm890.
- Deardorff, W. J., Grossberg, G. T. (2017). Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: evidence for NSAIDs and novel therapeutics. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17(1), 17-32.
DOI:10.1080/14737175.2016.1200972.
- Dore-Duffy, P., Owen, C., Balabanov, R., Murphy, S., Beaumont, T., Rafols, J. A. (2000). Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvascular Research*, 60(1), 55-69.
DOI:10.1006/mvre.2000.2244
- Du, Y., Qu, J., Zhang, W., Bai, M., Zhou, Q., Zhang, Z., Li, Z., Miao, J. (2016). Morin reverses neuropathological and cognitive impairments in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice by targeting multiple pathogenic mechanisms. *Neuropharmacology*, 108, 1-13. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.008.

- Ebrahimpour, S., Esmaeili, A., Beheshti, S. (2018). Effect of quercetin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6311-6324. DOI: 10.2147/IJN.S177871.
- El-Haddad, A. E., Sheta, N. M., Boshra, S. A. (2018). Isolation, formulation, and efficacy enhancement of morin emulsified carriers against lung toxicity in rats. *AAPS PharmSciTech*. 19(5), 2346-2357. DOI: 10.1208/s12249-018-1072-6.
- Fang, S. H., Hou, Y. C., Chang, W. C., Hsiu, S. L., Chao, P. D. L., Chiang, B. L. (2003). Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. *Life in Sciences*, 74(6), 743-756. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.07.017.
- Farokhzad, O. C, Langer, R. (2006). Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14), 1456-1459. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.011.
- Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 547(7662), 185-190. DOI: 10.1038/nature23002.
- Francis, A. R., Shetty, T. K., Bhattacharya, R. K. (1989). Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, 10(10), 953-955. DOI: 10.1093/carcin/10.10.1953.

-
- Fu, B. M. (2018). Transport across the blood-brain barrier. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1097, 235-259. DOI:10.1007/978-3-319-96445-4_13
- Fuster, J., Negro, S., Salama, A., Fernandez-Carballido, A., Marcianes, P., Boeva, L., Barcia, E. (2015) HPLC-UV method development and validation for the quantification of ropinirole in new PLGA multiparticulate systems: Microspheres and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 491(1-2), 310-317. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.06.035.
- Gardiner, R. M. (1990). Transport of amino acids across the blood-brain barrier: Implications for treatment of maternal phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13(4), 627-633. DOI: 10.1007/BF01799517.
- Ghosh, P., Patwari, J., Dasgupta, S. (2017). Complexation with human serum albumin facilitates sustained release of morin from polylactic-co-glycolic acid nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(8), 1758-1770. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b08559.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Davies, S. W. (1998). Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(5), 619-632. DOI: 10.1016/s0959-4388(98)80090-1
- Gong, E. J., Park, H. R., Kim, M. E., Piao, S., Lee, E., Jo, Dong-Gyu E. L., Chung, H. Y., Ha N., Mattson, M. P., Lee, J. (2011). Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 β . *Neurobiology of Disease*, 44(2), 223-230. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.07.005.

- Gonul, E., Duz, B., Kahraman, S., Kayali, H., Kubar, A., Timurkaynak, E. (2002). Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvascular Research*, 64(1), 116-119. DOI: 10.1006/mvre.2002.2413
- Gottesman, M. M., Hrycina, C. A., Schenlein, P. V., Germann, U. A., Pastan, I. (1955). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annual Reviews Genetics*, 29, 607-649. DOI: 10.1146/annurev.ge.29.120195.003135
- Gynther, M., Puris, E., Peltokangas, S., Auriola, S., Kanninen, K., Koistinaho, J., Huttunen, K. M., Ruponen, M., Vellonen, K. S. (2019). Alzheimer's disease phenotype or inflammatory insult does not alter function of L-type amino acid transporter 1 in mouse blood-brain barrier and primary astrocytes. *Pharmaceutical Research*, 36(1), 17. DOI:10.1007/s11095-018-2546-7.
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K. L., Wagner, D. D. (2006). ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage. *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*, 292(4), C1256-1262. DOI:10.1152/ajpcell.00563.2005.
- Hannasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90202-x
- Hardy, J. (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1129-1134. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x

- Heeba, G. H., Mahmoud, M. E. (2014). Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 662-671. DOI: 10.1016/j.etap.2014.01.026.
- Helms, H. C., Abbott, N., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V., Stebbins, M. J., Vandenhoute, E., Weksler, B., Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(5), 862-890. DOI:10.1177/0271678X16630991
- Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M., Naiki, H. (2007). The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry*, 46(7), 1888-1899. DOI: 10.1021/bi061540x.
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 104(6), 1433-1439. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x.
- Hou, Y. C., Chao, P. D., Ho, H. J., Wen, C. C., Hsiu, S. L. (2003). Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(2), 199-203. DOI: 10.1211/002235702487.

- Hoyos-Ceballos, G. P., Ruozi, B., Ottonelli, I., Da Ros, F., Vandelli, M. A., Forni, F., Daini, E., Vilella, A., Zoli, M., Tosi, G., Duskey, J. T., López-Osorio, B. L. (2020). PLGA-PEG-ANG-2 Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Crossing: Proof-of-Concept Study. *Pharmaceutics*, 12(1), 72. DOI: 10.3390/pharmaceutics12010072.
- Huber, J., Witt, K., Hom, S., Egleton, R., Mark, K. S., Davis, T. (2001). Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 280(3), H1241-1248. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1241.
- Huttunen, J., Peltokangas, S., Gynther, M., Natunen, T., Hiltunen, M., Auriola, S., Ruponen, M., Vellonen, K. S., Huttunen, K. M. (2019). L-type amino acid transporter 1 (LAT1/Lat1)-utilizing prodrugs can improve the delivery of drugs into neurons, astrocytes and microglia. *Scientific Reports*, 9(1), 12860. DOI: 10.1038/s41598-019-49009-z
- Igbal, K., Grundke-Igbal, I. (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 38-55. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00225.x
- Ikeuchi-Takahashi, Y., Ishihara, C., Onishi, H. (2016). Formulation and evaluation of morin-loaded solid lipid nanoparticles. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(9), 1514-1522. DOI: 10.1248/bpb.b16-00300.

-
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline Q2B R1: *Validation of Analytical procedures: Text and Methodology*, Geneva, Switzerland. (2005).
- Jangrid, A. K., Agraval, H., Gupta, N., Yadav, U. C., Sistla, R., Pooja, D., Kulhari, H., (2019). Designing of fatty acid-surfactant conjugate based nanomicelles of morin hydrate for simultaneously enhancing anticancer activity and oral bioavailability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 202-211. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.073.
- Jangrid, A. K., Pooja, D., Kulhari, H. (2018). Determination of solubility, stability and degradation kinetics of morin hydrate in physiological solutions. *Royal Society of Chemistry: Advances*, 8, 28836-28842. DOI: 10.1039/c8ra04139c
- Jarrott B. (2017). Tacrine: in vivo veritas. *Pharmacological Research* 116, 29-31. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.033.
- Jaturapatporn, D., Mgekng, I., McCleery, J., Tabet, N. (2012). Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 15(2), CD006378. DOI: 10.1002/14651858.CD006378.pub2.
- Jayaraj, R., Deb, U., Bhraskar, A. S., Prasad, G. B., Rao, P. V. (2007). Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Environmental Toxicology*, 22(5), 472-479. DOI: 10.1002/tox.20283.

- Jin, H., Lee, W. S., Eun, S. Y., Jung, J. H., Kim, G., Choi, Y. H., Ryu C. C., Jung, J. M., Shin, S. C., & Kim H. J. (2014). Morin, a flavonoid from Moraceae, suppresses growth and invasion of the highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 partly through suppression of the Akt pathway. *International Journal of Oncology*, 45(4), 1629-1637. DOI: 10.3892/ijo.2014.2535.
- Jinhui, Z., Lihu, Y., Yi, L., Lanzhen, C., Liming, W., Jing, Z. (2014). Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 145, 941-949. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.117.
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455(1), 152-162. DOI: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- Karran, E., Merken, M., de Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews*, 10(9), 698-712. DOI: 10.1038/nrd3505.
- Kattenmann, H., Hansich, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiology Reviews*, 91(2) 461-553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.

-
- Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., Younkin, S. G. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 21(2), 372-381. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00372.2001.
- Kay, G. (2000). The effects of antihistamines on cognition and performance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(6), 622-627. DOI: 10.1067/mai.2000.106153
- Keaney, J., Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, 282(21), 4067-4079. DOI: 10.1111/febs.13412.
- Kim, H., Park, B. S., Lee, K. G., Choi, C. Y., Jang, S. S., Kim, Y. H., Lee, S. E. (2005). Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of β -amyloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8537-8541. DOI: 10.1021/jf051985c
- Kim, K., Cha, J. S., Kim, J. S., Ahn, J., Ha, N. C., Cho, H. S. (2018). Crystal structure of GSK3 β in complex with the flavonoid, morin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(2), 519-524. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.182.
- Kühnau, J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117-190.
- Kuo, H. M., Chang, L. S., Lin, Y. L., Lu, H. F., Yang, J. S., Lee, J. H., & Chung, J. G. (2007) Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer Research*, 27(1A), 395-405.

- Labus, J., Häckel, S., Lucka, L., Danker, K. (2014). Interleukin-1 β induces an inflammatory response and the breakdown of the endothelial cell layer in an improved human THBMEC-based in vitro blood-brain barrier model. *Journal of Neuroscience Methods*, 228, 35-45. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2014.03.002
- Lai, C.-H., Kuo, K.-H. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: Perycite. *Brain Research Reviews*, 50(2), 258-265. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.07.004.
- Lajoie, J. M., Shusta, E. V. (2015). Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, 613-631. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124852
- Langrée, V., Brunschwig, K., Lopez, P., Giulia, N. B., Richard, G., Falk, M. M. (2003). Specific amino-acid residues in the N-terminus TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3189-3201. DOI: 10.1242/jcs.00604
- Lemkul, J. A., Bevan, D. R. (2010). Destabilizing Alzheimer's A β 42 Protofibrils with Morin: Mechanistic Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry*, 49(18), 3935-3946. DOI: 10.1021/bil1000855
- Li, J., Yang, Y., Ning, E., Peng, Y., Zhang, J. (2019). Mechanisms of poor oral bioavailability of flavonoid Morin in rats: From physicochemical to biopharmaceutical evaluations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128, 290-298. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.12.011.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. Alzheimer Disease Agents. [Updated 2020 Feb 3]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548644/>).

Marcianes, P., Negro, S., García-García, L., Montejo, C., Barcia, E., Fernández-Carballido, A. (2017). Surface-modified gatifloxacin nanoparticles with potential for treating central nervous system tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine* 12, 1959-1968. DOI:10.2147/IJN.S130908.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 271-278.

Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of Cell Biology*, 142(1), 117-127. DOI: 10.1083/jcb.142.1.117.

Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hsanaga, S. I., Goedert, M., Hasegawa, M. (2006). Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry*, 45(19), 6085-6094. DOI: 10.1021/bi0600749.

- McGeer, P. L., Schulzer, M., McGeer, E. G. (1996). Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47(2), 425-432. DOI: 10.1212/wnl.47.2.425.
- Monopoli M. P., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), 779-786. DOI: 10.1038/nnano.2012.207
- Moody, D. M. (2006). The blood-brain barrier and the blood-cerebral spinal fluid barrier. *Seminars Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 10(2), 128-131. DOI: 10.1177/1089253206288992
- Mooradian, A. D., Chung, H. C., Shah, G. N. (1997). GLUT-1 expression in the cerebra of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 18(5), 469-474. DOI:10.1016/s0197-4580(97)00111-5.
- Moos, T., Morgan, E. H. (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2(1), 77-95. DOI: 10.1023/a:1006948027674
- Neurauter, G., Scholl-Bürgi, S., Haara, A., Geisler, S., Mayersbach, P., Schennach, H., Fuchs, D. (2013). Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. *Clinical Biochemistry*, 46, 1848-1851. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.015.

-
- Niu, H. Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., Aguinaga-Ontoso I. (2017). prevalencia e incidencia del Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523-532. DOI: 10.1016/j.nrl.2016.02.016.
- O'Brien, R. J., Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
- Ola, M. S., Aleisa, A. M., Al-Rejaie, S. S., Abuohashish, H. M., Parmar, M. Y., Alhomida, A. S., & Ahmed, M. M. (2014). Flavonoid, morin inhibits oxidative stress, inflammation and enhances neurotrophic support in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurological Sciences*, 35(7), 1003-1008. DOI: 10.1007/s10072-014-1628-5.
- Oldendorf, W. H., Marcia, M., Conford, E., Brown, J. (1977). The Large Apparent Work Capability of the Blood-Brain Barrier: A study of the Mitochondrial Content of Capillary Endothelial Cells in Brain and other Tissues of the Rat. *Annals of Neurology*, 1(5), 409-417. DOI: 10.1002/ana.410010502.
- Ong, Z. Y., Chen, S., Nabavi, E., Regoutz, A., Porter, A. E., Dunlop, I. E., Dexter, D., Elson D. (2017). Multibranched Gold Nanoparticles with Intrinsic LAT-1 Targeting Capabilities for Selective Photothermal Therapy of Breast Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(45), 39259-39270. DOI: 10.1021/acsami.7b14851.
- Pandey, V. K., Mathur, A., Khan, M. F., Kakkar, P. (2019). Activation of PERK-eIF2 α -ATF4 pathway contributes to diabetic hepatotoxicity: Attenuation of ER stress by Morin. *Cellular Signalling*, 59, 41-52. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.03.008.
-

- Panhwar, Q. K., Memon, S. (2014). Synthesis of Cr(III)-Morin Complex: Characterization and Antioxidant Study. *The Scientific World Journal, Volume 2014*, 845208. DOI: 10.1155/2014/845208
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., Kanmogne, G. D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology, 1*(3), 223-236. DOI:10.1007/s11481-006-9025-3
- Prusiner, S. B. (2001). Shattuck lecture: neurodegenerative diseases and prions. *The New England Journal of Medicine, 344*(20), 1516-1526. DOI: 10.1056/NEJM200105173442006
- Puris, E., Gynther, M., Auriola, S., Huttunen, K. M., (2020). L-Type amino acid transporter 1 as a target for drug delivery. *Pharm Res., 37*(5), 88. DOI: 10.1007/s11095-020-02826-8
- Rafiei P., Haddadi A. (2017). Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *International Journal of Nanomedicine, 12*, 935-947. DOI: 10.2147/IJN.S121881.
- Rajasekhar, K. Chakrabarti, M., Govindaraju, T. (2015). Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chemical Communications, 51*(70), 13434-13450. DOI: 10.1039/c5cc05264e.
- Rhea, E. M., Rask-Madsen, C., Banks W. A. (2018). Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor. *The Journal of Physiology, 596*(19), 4753-4765. DOI: 10.1113/JP276149

- Rogers, S. L., Friedhoff, L. T. (1998). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses. *British Journal of Clinical Pharmacology* 46(1), 1-6. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1998.0460s1001.x.
- Rolfe, D. F., Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiology Reviews*, 77(3), 731-758. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.731.
- Ronaldson, P. T., Davis, T. P. (2012). Blood-Brain Barrier integrity and glial support: Mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Current Pharmaceutical Desing*, 18(25), 3624-3644. DOI: 10.2174/138161212802002625.
- Salvador-Morales, C., Zhang, L., Langer, R., Farokhzad, O. C. (2009) Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups. *Biomaterials*, 30(12), 2231-2240. DOI: 0.1016/j.biomaterials.2009.01.005.
- Samuels, S. C., Davis, K. L. (1997). A risk-benefit assessment of tacrine in the treatment of Alzheimer's Disease. *Drug Safety* 16 (1), 66-77. DOI: 10.2165/00002018-199716010-00005.
- Sanchez-Covarrubias, L., Slosky, L. M., Thompson, B. J., Davis, T. P., Ronaldson, P. T. (2014). Transporters at CNS Barrier Sites: Obstacles or Opportunities for Drug Delivery? *Current Pharmaceutical Desing*, 20(10), 1422-1449.

- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of Clinical Investigation.*, 97(11), 2517-2524. doi:10.1172/JCI118699
- Sekine, T.; Miyazaki, H.; Endou, H. (2006). Molecular physiology of renal organic anion transporters. *The American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290(2), 251-261. DOI: 10.1152/ajprenal.00439.2004
- Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J. Swai, H. S. (2010). In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 662-671. DOI: 10.1016/j.nano.2010.02.002.
- Sharma H. S., Sharma A. (2012) Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 11(1), 65-80. DOI: 10.2174/187152712799960817
- Sharma, G., Modgil, A., Layek, B., Arora, K., Sun, C., Law, B., Singh, J. (2013). Cell penetrating peptide tethered bi-ligand liposomes for delivery to brain in vivo: biodistribution and transfection. *Journal of Control Release*. 167(1), 1–10. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.016
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., Sugimoto, H. (2008). Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(5), 819-825. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.01.017.

-
- Sicras Mainar, A., Rejas Gutiérrez, J. (2004). Patrón de persistencia de tratamientos anticolinesterásicos en la demencia tipo Alzheimer: análisis comparativo retrospectivo de donepezilo, rivastigmina y galantamina. *Revista de Neurología*, 39(4), 312-316. DOI: 10.33588/rn.3904.2004292.
- Singh, M., Thakur, V., Deshmukh, R., Sharma, A., Rathore, M. S., Kumar, A., Mishra, N. (2018). Development and characterization of morin hydrate loaded micellar nanocarriers for the effective management of Alzheimer's disease. *Journal of Microencapsulation*, 35(2), 137-148. DOI: 10.1080/02652048.2018.1441916.
- Sinha, K., Sadhukhan, P., Saha, S., Pal, P. B., Sil, P. C. (2015). Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating NF- κ B pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(4), 769-783. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.01.008
- Song, Z., Lu, Y., Zhang, X., Wang, H., Han, J., Dong, C. (2016). Novel curcumin-loaded human serum albumin nanoparticles surface functionalized with folate: characterization and in vitro/vivo evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 2643-2649. DOI: 10.2147/DDDT.S112039.
- Takakura, Y., Audus, K. L., Borchardt, R. T. (1991). Blood-Brain Barrier: Transport Studies in Isolated Brain Capillaries and in Cultured Brain Endothelial Cells. *Advances in Pharmacology*, 22, 137-165. DOI: 10.1016/s1054-3589(08)60034-4

- Tang, Z., Bereczki, E., Zhang, H., Wang, S., Li, C., Ji, X., Branca, R. M., Lehtiö, J., Guan, Z., Filipcik, P., Xu, S., Winblad, B., Pei, J. J. (2013). Mammalian target of rapamycin (mTor) mediates tau protein dyshomeostasis: Implication for Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15556-15570. DOI: 10.1074/jbc.M112.435123.
- Tariot, P. N., Farlow, M. R., Grossberg, G. T., Graham, S. M., McDonald, S., Gergel, I. (2004). Memantine Study Group. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 291(3), 317-24. DOI:10.1001/jama.291.3.317.
- Tashima, T. (2020). Smart strategies for therapeutic agent delivery into brain across the blood-brain barrier using receptor-mediated transcytosis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 68(4), 316-325. DOI: 10.1248/cpb.c19-00854.
- Tavakkoli, A., Iranshahi, M., Hasheminezhad, S. H., Hayes, A. W., Karimi, G. (2019). The neuroprotective activities of natural products through the Nrf2 upregulation. *Phytotherapy Research*, 33 (9), 2256-2273. DOI: 10.1002/ptr.6427.
- Tiseo, P. J., Perdomo, C. A., Friedhoff, L. T. (1998). Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46 (1), 19-24. DOI: 0.1046/j.1365-2125.1998.0460s1019.x.

- Tönnies, E., Trushina, E. (2017). Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 57 (4), 1105-1121. DOI: 10.3233/JAD-161088.
- Tosi, G., Vergoni, A.V., Ruozi, B., Bondioli, L., Badiali, L., Rivasi, F., Costantino, L., Forni, F., Vandelli, M.A. (2010). Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution. *Journal of Control. Release*, 145(1), 49–57. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.03.008.
- Ulbrich, K., Hekmatara, T., Herbert, E., Kreuter, J. (2009). Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71(2), 251-256. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.08.021
- United-States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43 NF 38), 2020, Rockville, MD, USA.
- Valls-Pedret, C., Molinuevo, J. L., Rami, L. (2010). Early diagnosis of Alzheimer's disease: the prodromal and preclinical phase. *Revista de Neurología*, 51 (8), 471-480.
- Van Assema, D. M., Lubberink, M., Rizzu, P., van Swieten, J. C., Schuit, R. C., Eriksso, J., Scheltens, P., Koeppe, M., Lammertsma, A. A., van Berkel, B. N. (2012). Blood-brain barrier P-glycoprotein function in healthy subjects and Alzheimer's disease patients: effect of polymorphisms in the ABCB1 gene. *EJNMMI Research*, 2(1), 57. DOI:10.1186/2191-219X-2-57

- Varma, V. R., Oommen, A. M., Varma, S., Casanova, R., An, Y., Andrews, R. M., O'Brien, R., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Toledo, J., Baillie, R., Arnold, M., Kastenmueller, G., Nho, K., Doraiswamy, P. M., Saykin, A. J., Kaddurah-Daouk, R., Legido-Quigley, C., Thambisetty, M. (2018). Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. *PLOS Medicine*, 15(1), e1002482. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002482>
- Vera, M., Barcia, E., Negro, S., Marcianes, P., García-García, L., Slowing, K., Fernández-Carballido, A. (2014). New celecoxib multiparticulate systems to improve glioblastoma treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1-2), 518-527. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.028
- Vyas, A., Jain, A., Hurkat, P., Jain, A., Jain, S. K. (2015). Targeting of AIDS related encephalopathy using phenylalanine anchored lipidic nanocarrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 155-161. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.049
- Waddad, A. Y., Abbad, S., Yu, F., Muyendo, W. L., Wang, J., Lv, H., & Zhou, J. (2013). Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(2), 446-458. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.040.
- Wolburg, H., Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*, 38(6), 323-337. DOI: 10.1016/s1537-1891(02)00200-8.

-
- World Health Organization, Alzheimer's Disease International. (2012). Dementia: a public health priority. Washington, DC: OPS, 2013.
- Yi, J. H., Hazell, A. S. (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochemistry International*, 48(5), 394-403. DOI: 10.1016/j.neuint.2005.12.001.
- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., Abbott, N. J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(5), 592-604. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
- Yu, K. C., Kwan, P., Cheung, S. K., Ho, A., & Baum, L. (2018). Effects of resveratrol and morin on insoluble Tau in Tau transgenic mice. *Translational Neuroscience*, 9, 54-60. DOI: 10.1515/tnsci-2018-0010.
- Zhang, J., Peng, Q., Shi, S., Zhang, Q., Sun, X., Gong, T., Zhang, Z. (2011). Preparation, characterization, and in vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) loaded with morin-phospholipid complex. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3405-3414. DOI:10.2147/IJN.S25824
- Zhang, J., Shuai, X., Li, J., Xiang, N., Gong, T., Zhang, Z. (2015). Biodistribution, hypouricemic efficacy and therapeutic mechanism of morin phospholipid complex loaded self-nanoemulsifying drug delivery system in an experimental hyperuricemic model in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(1), 14-25. DOI: 10.1111/jphp.12492.

- Zhang, Z. T., Cao, X. B., Xiong, N., Wang, H. C., Huang, J. S., Sun, S. G., Wang, T. (2010). Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(8), 900-906. DOI: 20644549
- Zhu, B., Zhang, H., Yu, L. (2017) Novel transferrin modified and doxorubicin loaded Pluronic 85/lipid-polymeric nanoparticles for the treatment of leukemia: In vitro and in vivo therapeutic effect evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 86, 547–554. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.121.
- Zolezzi, J. M., Inestrosa, N. C. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptors and Alzheimer's disease: hitting the Blood-Brain Barrier. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 438-451. DOI:10.1007/s12035-013-8435-5. DOI: 10.1007/s12035-013-8435-5.
