



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
NANOMEDICINAS EN EL TRATAMIENTO DEL
PARKINSON**

Autor: Alejandro González Lázaro

Fecha: Junio 2019

Tutor: M^a Sofía Elisa Negro Álvarez

ÍNDICE

1.	RESUMEN	3
2.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.	OBJETIVO	6
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	6
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
	5.1 NP DE PEG-PLGA.....	6
	5.2 NP DE PLGA	12
	5.3 NP DE QUITOSANO	15
6.	CONCLUSIÓN	18
7.	BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta al Sistema Nervioso Central de manera paulatina y crónica. Actualmente la línea de tratamiento que existe no está centrada en curar la enfermedad, sino que su función consiste en aliviar los síntomas, debido a ello, es un tratamiento de por vida.

Hoy en día se están desarrollando nuevos tratamientos basados en la nanomedicina (NM) para dirigir mejor los fármacos a las células diana consiguiendo así una eficacia mayor de los medicamentos, menos efectos adversos y, en definitiva, mejorar la calidad de vida del paciente.

En este trabajo procederé a revisar algunas estrategias en el tratamiento del parkinsons basados en la NM.

2. INTRODUCCIÓN

La EP es una enfermedad progresiva del sistema nervioso que afecta el movimiento. Los síntomas comienzan gradualmente (www.mayoclinic.org). Es una enfermedad que afecta a 1-2 personas de cada mil. La prevalencia está aumentando con la edad y afecta al 1% de la población mayor de 60 años (Tysnes et al. 2017).

La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra se correlaciona con las manifestaciones motoras de la EP (Rodríguez et al. 2011) (Figura 1). Además, en las neuronas supervivientes aparecen los llamados cuerpos de Lewy. Algunos ejemplos de dichas manifestaciones serían: temblor, bradicinesia, rigidez, acinesia, hipocinesia o afectación del equilibrio.

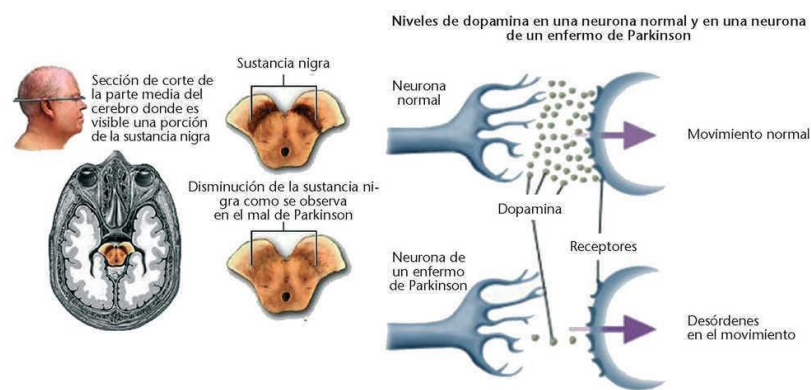


Figura 1: Sustancia nigra y dopamina en la EP. (Tomado de Gómez et al., 2007).

Por otra parte, los síntomas no motores (SNM) en la EP son frecuentes en todos los estadios de la enfermedad, y representan frecuentemente las principales quejas y molestias de los pacientes, de manera que estos influyen en la calidad de vida del

paciente (Rodríguez et al. 2011). Dichos SNM son diversos e incluyen demencia, trastornos psiquiátricos (como depresión, ansiedad, psicosis...), trastornos del sueño y disfunciones autonómicas (estreñimiento, disfunción eréctil, hipotensión postural y trastornos genitourinarios).

Entre las limitaciones que surgen en los tratamientos de la EP se encuentran el acceso de los agentes terapéuticos al lugar de acción, que está condicionado por la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE está compuesta de una serie de paredes de capilares que separan al cerebro de la circulación sanguínea (su función es protectora, ya que impiden la entrada de tóxicos desde la sangre al cerebro). Dichas paredes carecen de hendidura celular y fenestras lo que restringe el paso de solutos (López et al., 2011) (Figura 2). Esta baja permeabilidad se debe a las células endoteliales microvasculares cerebrales primarias las cuales cuentan con unas uniones muy estrechas entre sí, impidiendo el paso de muchas moléculas. Solo aquellas moléculas que tienen un bajo peso molecular y son lipofílicas pueden atravesar las BHE. Además de todas estas barreras existen sistemas de eflujo de fármacos que expulsan aquellas sustancias que han conseguido atravesar la barrera (algunos ejemplos son las p-glicoproteínas o el transportador específico de aniones orgánicos) (López et al., 2011)

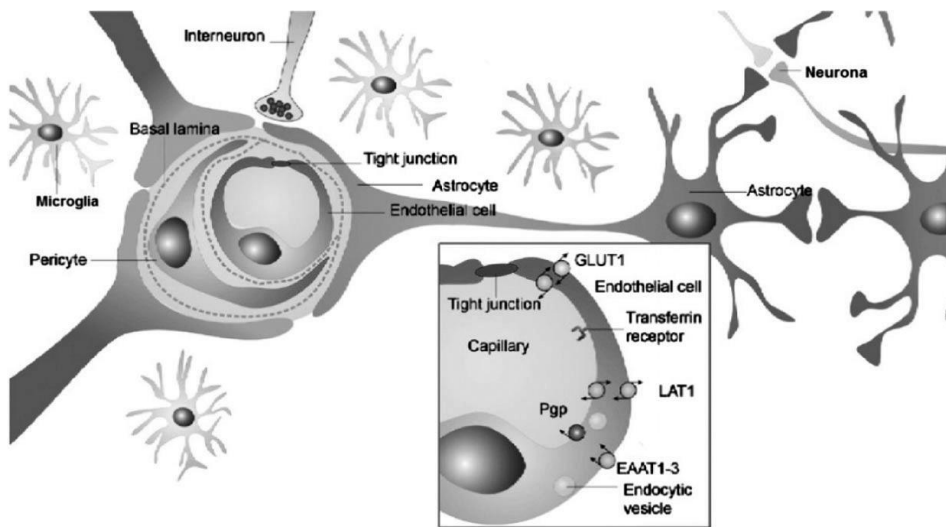


Figura 2: BHE (tomado de: Kataoka et al. 2007).

La dopamina (DA) (principal responsable de la EP) no se puede administrar como tal ya que no atraviesa la BHE y, debido a esto, se utiliza como fármaco un precursor suyo, la levodopa, que sí es capaz de atravesarla y es transformada ya en el cerebro a DA por la dopa-descarboxilasa. El problema de dicho fármaco es que, antes de llegar a su lugar de acción, el 95% es transformado periféricamente a DA por la dopa-descarboxilasa lo que implica la aparición de efectos secundarios sistémicos (hipotensión, vómitos, taquicardias) y que solo una pequeña fracción del fármaco alcance el cerebro (necesitándose dosis muy altas para conseguir el éxito terapéutico) (López et al., 2011).

En la actualidad, en el tratamiento del Parkinson, la NM está adquiriendo un gran interés. La NM es la aplicación de la nanotecnología al ámbito de la salud (www.ciber-bbn.es). A su vez, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología define a ésta como “la investigación y desarrollo a niveles atómico, molecular o macromolecular en el intervalo por debajo de los 100 nm (0.1-100 nm) para crear estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades funcionales nuevas” (López et al. 2011). El objetivo de la NM es dirigir el fármaco directamente al tejido enfermo sin dañar los tejidos sanos, resultado así una terapia más eficaz en el tratamiento de la enfermedad y con menos efectos adversos (www.ciber-bbn.es). Actualmente, la NM comprende el descubrimiento de partículas que puedan ser usadas como sistemas de liberación de fármacos, así como la fabricación de materiales con unas propiedades adecuadas para su utilización en el tratamiento de enfermedades.

Para la administración de fármacos se han propuesto gran cantidad de estructuras (figura 3) tales como nanopartículas, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas, nanotubos, microgeles etc. (Lechuga et al., 2011). Dichas estructuras permiten que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva debido a que pueden atravesar poros y membranas celulares como la BHE aumentando así la efectividad del fármaco y pudiendo reducir las dosis administradas. Una molécula incluida dentro de una nanopartícula (dendrímero, liposoma, micela...) va a llegar a la zona que nosotros queremos sin interactuar a nivel sistémico por lo que habrá una menor incidencia de reacciones adversas y un mayor éxito terapéutico en comparación a los fármacos convencionales.

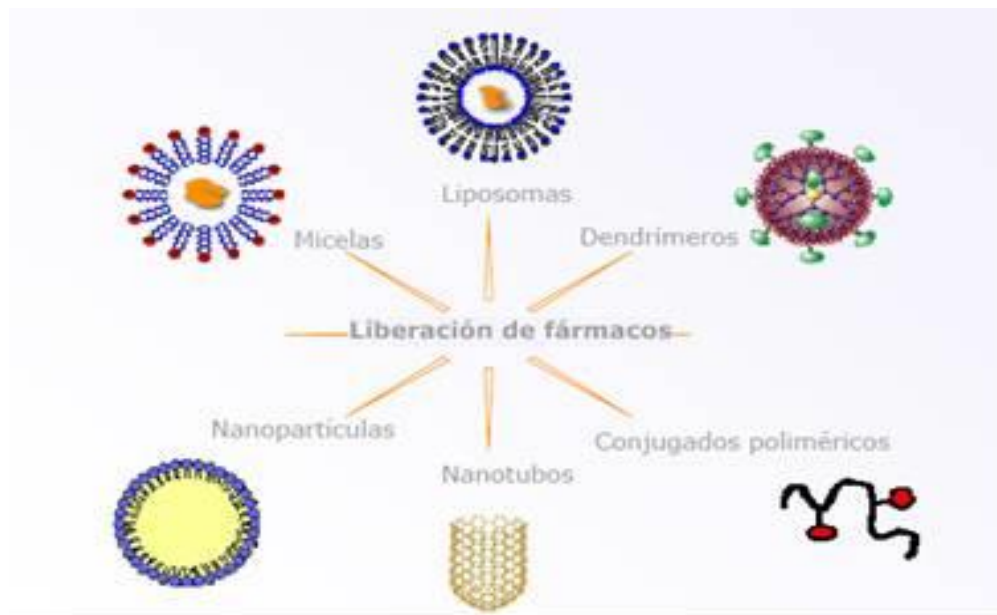


Figura 3: distintos tipos de nanopartículas (tomado de Álvarez et al., 2019).

3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es realizar una investigación bibliográfica sobre nuevos sistemas basados en la NM cuya aplicación terapéutica sea tratar la EP. Se determinarán las capacidades de estos nuevos tratamientos a nivel de disponibilidad, seguridad y eficacia.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se procedió a hacer una revisión bibliográfica de los estudios publicados sobre el tema en cuestión. La información se extrajo de bases de datos como PubMed, Google Académico o de la biblioteca virtual en Salud SciELO utilizando siempre la información más actual. Para ello se buscaron los siguientes términos: nanomedicine AND neurodegenerative diseases, nanomedicine AND EP, nanoparticles AND EP, nanotechnology.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 NP DE PEG-PLGA

NP de PEG-PLGA cargadas con rotigotina (RG) (Bi et al., 2016).

La RG (figura 4) es un agonista dopaminérgico no ergolítico de los receptores D3, D2 y D1. Su efecto beneficioso se debe a la activación de dichos receptores del caudado-putamen en el cerebro (Carretero et al., 2006). La RG ejerce su acción de forma constante durante todo el día e imita de una manera bastante fiel la situación fisiológica del cerebro en ausencia de la enfermedad.

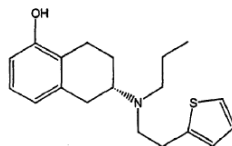


Figura 4: estructura química de la RG (tomado de www.patentados.com)

El material de las NP es el polietilenglicol-ácido poli (láctico-co-glicólico) (PEG-PLGA). Este material es biodegradable (se descompone por procesos metabólicos del

organismo), biocompatible (no provoca rechazo por parte del organismo) y tiene una gran vida media (Bi et al., 2016).

La vía de administración que se ha elegido es la intranasal. La elección de esta vía se debe a que el epitelio nasal es rico en capilares sanguíneos permitiendo el paso del fármaco a vía sistémica rápidamente (Ansorena et al., 2011). Otra de las ventajas que aporta es que su eficacia es comparable a la que tiene la vía parenteral y es menos invasiva que ésta, siendo mejor aceptada por el paciente debido a que no le causa dolor (Florez et al., 2010).

La principal desventaja de esta vía es que la absorción del fármaco se puede ver afectada por la presencia de moco que actúe de barrera, situaciones en las que se secreta mayor cantidad de mucosidad como rinoplastias, neoplasias, malformaciones, patologías intranasales que sufra el paciente (como sinusitis o rinitis) o por el propio aclaramiento mucociliar del paciente (Ansorena et al., 2011). Las NP del estudio contienen en su superficie cadenas de PEG, lo que inhibe las interacciones con la superficie de las células haciendo que sean más fáciles de expulsar de la nariz y, por tanto, perdiendo eficacia (Bi et al., 2016).

Una estrategia para evitar este problema sería modificar las NP con ligandos endógenos para que queden ancladas al epitelio nasal. En este estudio, dicho ligando endógeno es la lactoferrina (Lf). La Lf es una glicoproteína de 80 kDa de la familia de las transferrinas. El receptor de Lf se encuentra en gran cantidad en la superficie apical del epitelio respiratorio, en las células endoteliales cerebrales y en las neuronas (Bi et al. 2016). Además, dicho receptor se encuentra sobreexpresado en las neuronas afectadas de trastornos neurodegenerativos, incluyendo el Parkinson. Por lo tanto, la administración de las NP de PEG-PLGA modificadas con Lf mejoraría la llegada del fármaco al cerebro a través de la vía intranasal (Bi et al., 2016)

Se prepararon dos tipos de NP: unas que no estaban modificadas con Lf y otras que sí tenían la proteína en su superficie. El método que se utilizó para su obtención fue la nanoprecipitación. Este método consiste en provocar el colapso de las cadenas poliméricas cambiando el medio en el que están disueltas por otro en el que no sean solubles (Gutierrez et al., 2017). Se disolvió el PEG-PLGA y la RG en la fase orgánica (acetona) y, posteriormente, se añadió a la fase acuosa (se añadió gota a gota en agua fría). Se puso en agitación constante hasta la completa evaporación de la fase orgánica precipitando entonces el polímero y encapsulando en su interior la RG. Por último, se lavó tres veces con agua ultrapura y se concentraron con ultrafiltración. El resultado de este proceso fue el que se modificó posteriormente para obtener las NP unidas a la Lf.

Se hizo un estudio de optimización del proceso donde las variables independientes eran la concentración del polímero (mg/ml), la relación fase orgánica/fase acuosa, la carga de fármaco teórica y la duración del baño de agua fría. Las variables dependientes eran el diámetro de las partículas (nm) y la eficacia de encapsulación. Finalmente cogieron la fórmula con una concentración de 0,81 mg/ml, una relación entre fases de 5,55, una carga de fármaco del 7,32 % y una duración del baño de 1,59 h. con estos datos se obtuvo unas NP con un tamaño de 58.2 ± 6.2 nm y una eficacia de encapsulación de $92,57\% \pm 9,41\%$.

Posteriormente se hicieron estudios tanto in vitro como in vivo comparando las NP sin modificar, las NP con Lf y el fármaco libre.

El estudio de liberación in vitro se hizo utilizando una técnica de diálisis. Las NP fueron suspendidas en un medio salino (PBS 7,4) dentro de bolsas de diálisis. A tiempos específicos se retiraba un volumen del medio que rodeaba a la bolsa de diálisis y se usaba una técnica de HPLC para medir la cantidad de RG liberada. Como se observa en la figura 5, la RG en solución se liberó prácticamente toda en las primeras cuatro horas mientras que las NP tuvieron un comportamiento dual: primero se observa una liberación exponencial o burst (en la primera media hora) debido a la RG adsorbida en la superficie de las NP que se libera por difusión y disolución y, posteriormente, sí que presenta una liberación más sostenida en el tiempo. El comportamiento de las NP sin modificar respecto a las NP con Lf es similar en este estudio.

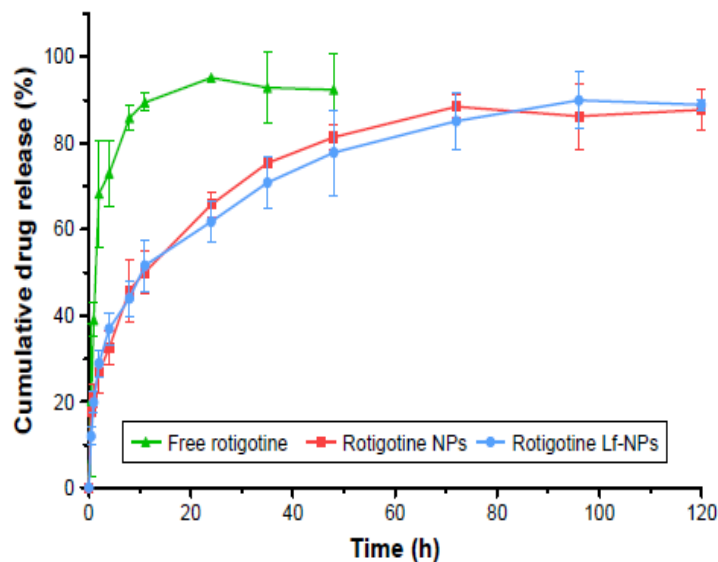


Figura 5: estudios de liberación in vitro de RG libre, RG en NPs y RG en Lf-Np (tomado de Bi et al., 2016).

Para el estudio de toxicidad se incubaron las NPs y Lf-NPs (cargadas de RG y sin cargar en ambos casos) con células 16HBE (células humanas del epitelio bronquial) y SH-SY5Y (células humanas derivadas de neuroblastoma). Se evaluó la viabilidad de dichas células pasadas 24 y 48 horas. Se observó, tal y como se muestra en la figura 6, que las NP sin cargar (NPs y Lf-NPs) no eran tóxicas a ninguna de las concentraciones estudiadas lo que demuestra que el polímero del que están hechas no ejerce efectos perjudiciales sobre las células. Se vio que la solución de RG y las NP cargadas (ambos tipos) no eran significativamente tóxicas a concentraciones bajas, sin embargo, a medida que subíamos la concentración, también se vio que la RG libre comprometía en gran medida la supervivencia de las células en comparación a la misma concentración de NP quedando así demostrado que estas últimas disminuyen la toxicidad de la RG.

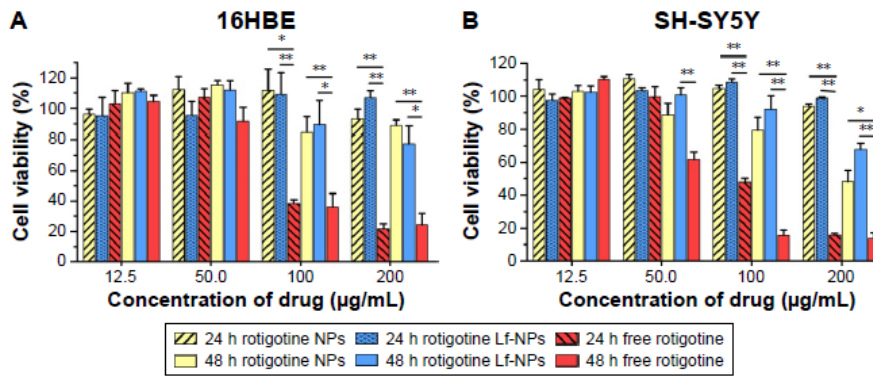


Figura 6: citotoxicidad *in vitro* de RG libre, NPs y Lf-NPs (tomado de Bi et al., 2016).

En el siguiente estudio se utilizaron NPs y Lf-NPs cargadas de cumarina (para poder observar su fluorescencia) con el objetivo de comparar la cantidad captada por cada tipo de célula (16HBE y SH-SY5Y). Se hizo una medición tanto cualitativa (figura 7) utilizando imágenes recogidas por microscopía fluorescente como cuantitativa (figura 8) utilizando citometría de flujo. En todas las concentraciones estudiadas y en ambos tipos de análisis (cualitativo y cuantitativo) se observa que las NP-Lf son captadas en mayor cantidad por ambos tipos de células que sus homólogas sin la proteína. Esto se debe a que dichas células presentan en su superficie el receptor de Lf quedando así demostrado que la modificación de las NP es eficaz en la vectorización hacia células con dicho receptor.

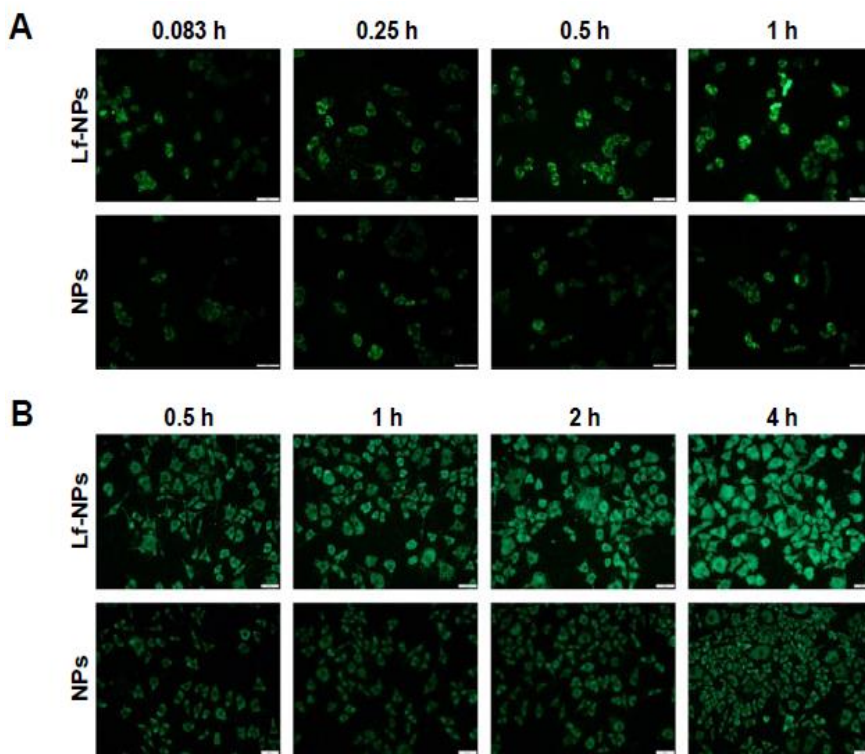


Figura 7: ensayo cualitativo por microscopía fluorescente: A → células 16HBE; B → células SH-SY5Y (tomado de Bi et al., 2016).

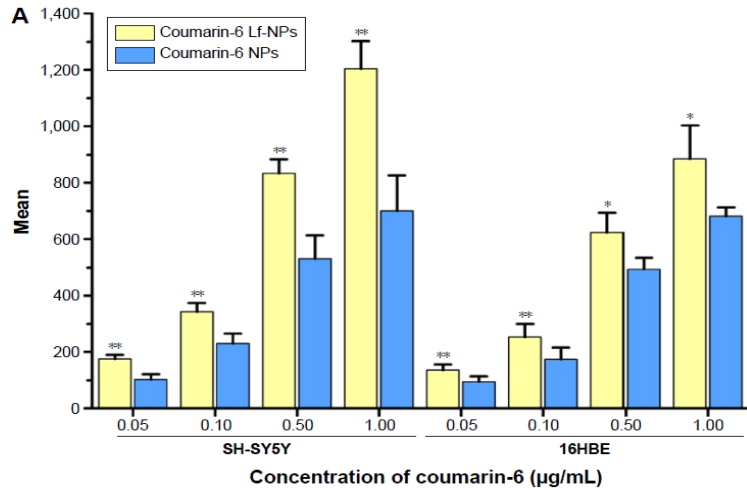


Figura 8: ensayo cuantitativo por citometría de flujo (tomado de Bi et al., 2016).

Además se observa que el proceso de captación de NP es tiempo y concentración dependiente (a medida que aumentan estos dos factores aumenta la captación) lo que es indicativo de un proceso endocítico activo.

Lo siguiente que estudiaron fue la acumulación en el cerebro de NPs y Lf-NPs cargadas de DiR (dioctadecil-3,3,3-tetrametilindotricarboianina iodada) in vivo (utilizaron ratones) mediante fluorescencia. Como vía de administración utilizaron la intranasal. Tal y como vemos en la figura 9 se observaron señales débiles en el grupo al que se le inoculó DiR libre en todas las tomas, debido probablemente al DiR que quedaba en la cavidad nasal. Sin embargo, en ambos grupos de ratones a los cuales se les había administrado NP (Lf-NPs y NPs), se observó un crecimiento en la intensidad de señal a medida que pasaba el tiempo hasta llegar al máximo pasadas 4 horas, lo que nos indica que ambos tipos de NP ceden su contenido de una manera prolongada y dirigida al cerebro. Es más, en la figura 9 también se puede observar que la intensidad de señal es mayor en el grupo de las NP modificadas con Lf que en el grupo de las NP sin modificar, quedando demostrado que la introducción de la Lf es un medio eficaz para

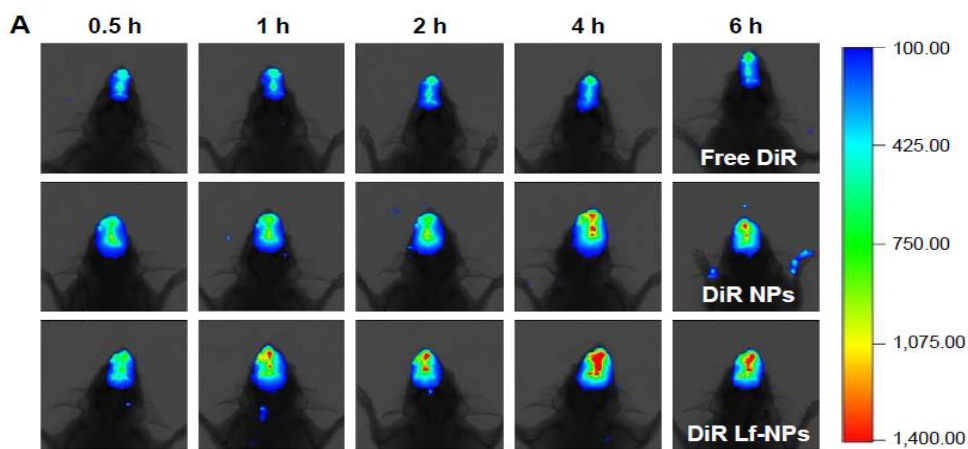


Figura 9: imágenes de la fluorescencia emitida del cerebro de ratones tras la administración de DiR libre, DiR NPs y DiR Lf-NPs (tomado de Bi et al., 2016).

conseguir una terapia localizada en el cerebro (tal y como indicaban los estudios in vitro).

Por último, se realizó un estudio in vivo de la distribución dentro del propio cerebro de NP cargadas con RG. Para ello, se utilizaron ratones y se administraron vía intranasal. Como se observa en la figura 10 la concentración en sangre de ambos tipos de NP son similares a lo largo del tiempo lo que demostraría que la modificación con Lf no perjudica el largo tiempo de circulación que tiene el PEG. Además, también se puede observar que la concentración de RG es mucho mayor en el estriado que en plasma, indicando que la administración intranasal contribuye a la liberación del fármaco en el cerebro. Se detectó RG en el estriado a las 8 horas de la administración, de lo que se extrae que el proceso de liberación es lento y constante imitando mejor a la situación del cerebro en ausencia de enfermedad.

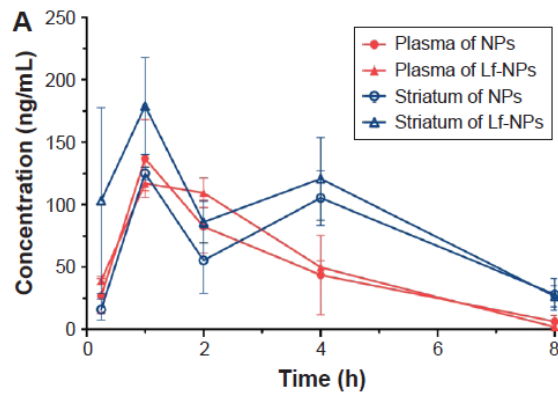


Figura 10: Concentración en sangre y estriado de RG de NPs y Lf-NPs (tomado de Bi et al., 2016).

Respecto a la distribución dentro del propio cerebro, tal y como se muestra en la figura 11, observamos que los valores de concentraciones en las distintas regiones del cerebro son mayores en las NP-Lf. Esto es debido a la interacción de la proteína con su receptor en las células del epitelio respiratorio y en las neuronas. En la figura 14 también queda reflejado que la concentración en las distintas regiones del cerebro es variable. Las altas concentraciones de RG en el estriado (principal afectado en la EP) indican que la intranasal es una vía de administración prometedora en el tratamiento de la EP. Para finalizar, las marcadas concentraciones en el bulbo olfatorio indican que las NP son transportadas al cerebro a través de los nervios olfatorio y trigémino.

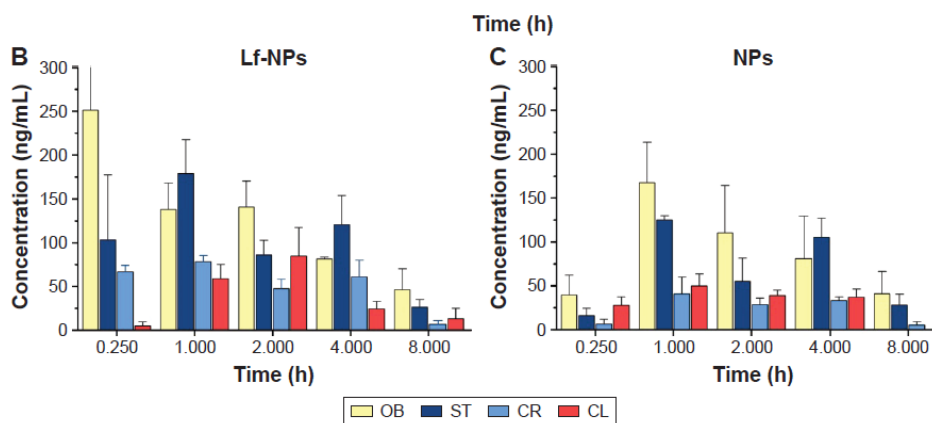


Figura 11: distribución de rotigotina en el cerebro. Lf-NPs y NPs en el bulbo olfatorio (OB), estriado (ST), cerebro al que se le ha extraído el núcleo estriado (CR) y cerebelo (CL) (tomado de Bi et al., 2016).

A la vista de los resultados obtenidos, se concluyó que las NP de RG modificadas con Lf son una prometedora terapia no invasiva para la EP. Se demostró que disminuían la toxicidad de la RG libre y se vio que la modificación con Lf era una estrategia eficaz para la vectorización del fármaco a las células dañadas.

5.2 NP DE PLGA

NP de PLGA cargadas con ropinirol (RP) (Barcia et al., 2017)

El RP (figura 12) es un agonista dopaminérgico D2/D3 no ergolítico que estimula dichos receptores en el estriado (área afectada por la EP). También actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la secreción de prolactina (cima.aemps.es). Está indicado como monoterapia para retrasar la introducción de la levodopa o conjuntamente con ésta en estadios más avanzados de la enfermedad o cuando la levodopa pierde eficacia y se dan fluctuaciones tipo on-off (cima.aemps.es)

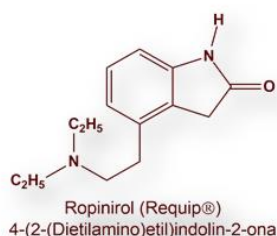


Figura 12: ropinirol (tomado de www.info-farmacia.com).

En el estudio se caracterizaron y evaluaron las NPs en un modelo animal de EP inducido por rotenona (RT) (Barcia et al., 2017). La RT es un compuesto que se extrae de plantas del género *Lonchocarpus* y que es ampliamente utilizada para el control de plagas de diferentes cultivos (Gómez-Chavarín et al., 2013). Tiene una elevada liposolubilidad lo que le permite atravesar fácilmente las membranas biológicas. Tiene un efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se ha visto que la inyección subcutánea de este pesticida en ratas da lugar a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y a la agregación de la proteína α -sinucleína (imitando así algunas características de la EP) (Gómez et al., 2013).

La RT fue disuelta en aceite de girasol para su administración. Se usaron un total de 32 animales (ratas) divididos en 4 grupos de 8 integrantes por grupo:

- Grupo 1 (G1): control. Reciben los vehículos solamente: G1A→aceite de girasol, n=4; G1B→solución salina, n=4
- Grupo 2 (G2): G2A→reciben RT (2mg/kg/día), n=4; G2B→reciben RT (2mg/kg/día) y NP blanco cada 3 días desde el día 15, n=4
- Grupo 3 (G3): animales que reciben RT (2mg/kg/día) durante 35 días y NPs cargadas con RP a 1mg/kg/día cada 3 días a partir del día 15, n=8

- Grupo 4 (G4): animales que reciben RT (2mg/kg/día) durante 35 días y RP en vehículo salino a 1mg/kg/día a partir del día 15.

Las NPs se prepararon por nanoprecipitación. Se eligió debido a que requiere una energía externa baja y porque permitía el uso de acetona como solvente la cual presenta una toxicidad baja en comparación a otros solventes (Katiyar et al., 2016). Se estudió la optimización en el proceso de fabricación de las NPs y se vio que la fórmula más eficiente era aquella en la que se utilizaba 50mg de PLGA y 8mg de RP consiguiéndose un rendimiento del proceso del $56,7\% \pm 5,5$ y una eficacia de la encapsulación del $74,8\% \pm 8,2$.

Se hicieron estudios de liberación del fármaco, se midió el peso de las ratas a diferentes tiempos, se hicieron test de comportamiento a los distintos grupos y se realizaron evaluaciones histoquímicas.

Respecto al perfil de liberación se observa en la figura 13 que, al igual que en el estudio anterior, hay un “burst” inicial del 20% debido al RP adsorbido en la superficie de las NPs. Después se observa una liberación más sostenida en el tiempo (dura 5 días) donde la cinética es de orden 0.

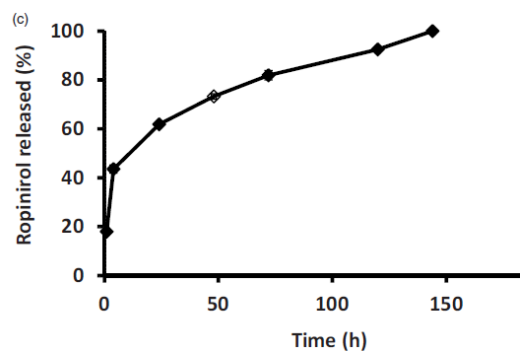


Figura 13: perfil de liberación del RP de las NPs (tomado de Barcia et al., 2017).

Lo siguiente fue evaluar la evolución del peso de las ratas a lo largo del estudio (figura 14). Se tomaron los pesos a los días 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35. Los animales pertenecientes al grupo control (G1) fueron ganando peso a lo largo de los días sin haber diferencias significativas entre ambos subgrupos (G1A y G1B). Los grupos tratados con RT comienzan con una ganancia de peso hasta el día 14 (debido a que se estaba desarrollando la neurodegeneración) y, a partir de ese punto, se observa que en el G2 (no reciben RP) comienzan a bajar de peso mientras que en G3 y G4, a partir del 15 día en tratamiento con RP, comienzan a ganar de peso de forma gradual.

Los test de comportamiento de los grupos de animales contaban con las siguientes pruebas: catalepsia, acinesia, rotarod (mide el equilibrio motor y la coordinación de los animales) y test de natación. Todos los test se realizaron por triplicado en los días 15, 22, 29 y 36. En todos los test se observa (figura 14) que los animales tratados con RT sufren un deterioro motor y, por tanto, sus respuestas y coordinación en comparación al grupo control son deficientes. Además se observa que aquellos grupos que son tratados con RP (G3 y G4) mejoran dichas respuestas respecto al grupo que no recibe RP (G2). Por último, quedó demostrado que el grupo que recibía el RP en NP (G3) obtuvo mejores resultados respecto al grupo que recibía el RP en solución salina (G4) (en algunos casos G3 obtuvo resultados similares al grupo control).

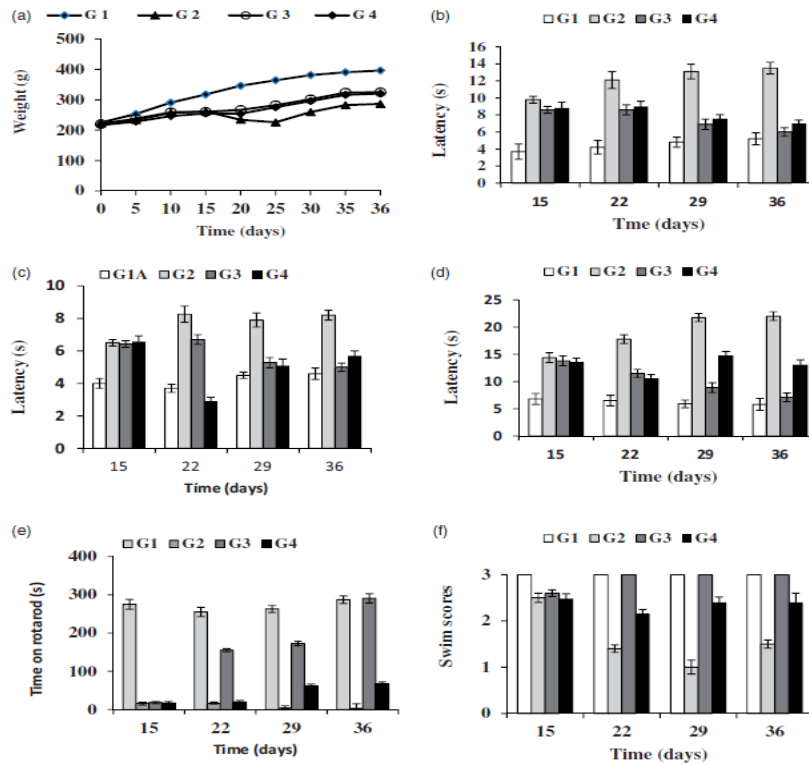


Figura 14: a) evolución del peso de las ratas b) resultados test de catalepsia en barra c) resultados test de catalepsia en rejilla d) resultados test de acinesia e) resultados test de rotarod f) resultados test de natación (tomado de Barcia et al., 2017).

El primero de los estudios histoquímicos que se realizaron fue una tinción de Nissl de un corte del cerebro de las ratas al final del estudio (después de 36 días). Como se observa en la figura 15, el grupo G2 presenta una reducción del número de neuronas en comparación con el grupo control y con los grupos que han recibido RP. A su vez, se ve también que el efecto neuroprotector es mayor en el grupo que ha recibido las NP.

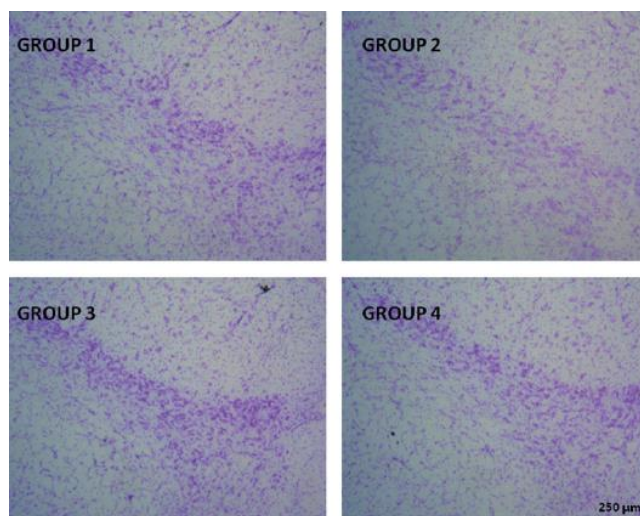


Figura 15: Tinción de Nissl de neuronas de la sustancia nigra de los distintos grupos (tomado de Barcia et al., 2017).

La tirosina hidroxilasa es una enzima que participa en la síntesis de la DA. Se ha demostrado que el estrés oxidativo que induce la exposición a RT (y la que se da en la EP) produce un déficit en el número de neuronas del estriado que poseen dicha enzima y se encargan de la producción de DA. Se procedió a hacer un estudio inmunohistoquímico de dicha enzima en cortes del estriado de los cerebros de las ratas y se midió la fluorescencia que emitían (análisis cualitativo y cuantitativo). Los resultados mostrados en las figuras 16 y 17 ponen de relieve que el grupo G2 presenta una menor cantidad de TH que el resto de grupos y entre los grupos que reciben RP se observa que el G3 tiene mayor cantidad de TH que G4 (tiene unos niveles similares al grupo de control)

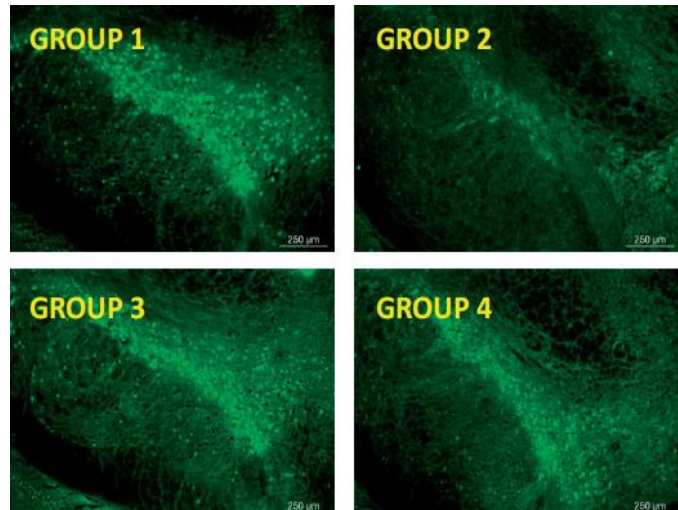


Figura 16: estudio cualitativo de los niveles de TH (tomado de Barcial et al., 2017).

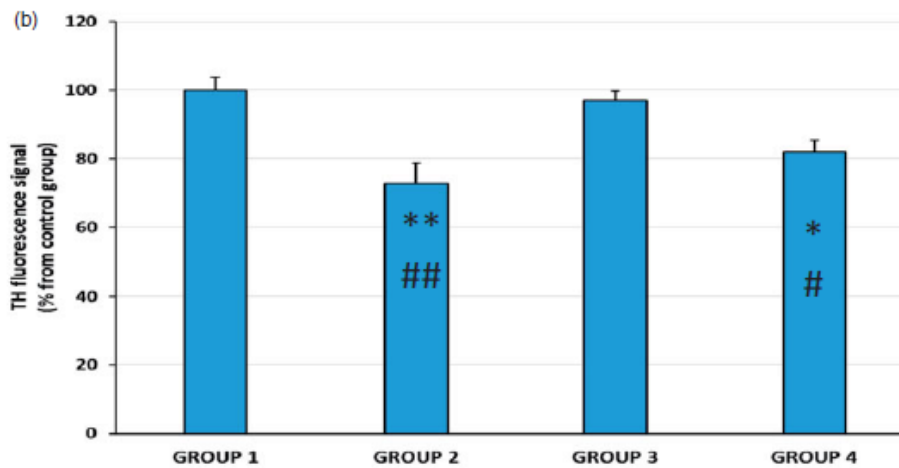


Figura 17: estudio cuantitativo de los niveles de TH (tomado de Barcial et al., 2017).

Con todo se concluyó que las NP de RP resultan una interesante estrategia para el tratamiento de la EP.

5.3 NP DE QUITOSANO

Nanopartículas de quitosano (QT) cargadas con rotigotina (RG) (Shak et al., 2019).

El QT es un aminopolisacárido semisintético obtenido a partir de la quitina de los crustáceos. Se trata de un biopolímero hidrosoluble capaz de formar hidrogeles micro o nanopartículas en condiciones medio ácido suaves (Goycolea et al., 2009). Además, su carácter policationico le confiere alta capacidad para asociarse con macromoléculas terapéuticas, a las cuales protege de la degradación hidrolítica y enzimática del organismo. Dicho polisacárido presenta también mucoadhesividad (evitando el aclaramiento mucociliar), biocompatibilidad, baja toxicidad y ayuda a la absorción de moléculas a través de barreras epiteliales (como el epitelio nasal) debido a que abre las uniones estrechas entre células (Goycolea et al., 2009)

El método que se utilizó para la elaboración de las NP fue la gelificación iónica. Con esta técnica la cubierta de las NP se forma debido a las interacciones electrostáticas que se produce entre un polímero (QT → carga positiva) y un ión de carga opuesta (TPP → carga negativa) (Porrás et al., 2012). Entre las ventajas de este sistema cabe señalar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos agresivos (Goycolea et al., 2009). El ratio entre QT y el TPP influyen en el tamaño de partícula y en los estudios de optimización concluyeron que el ratio óptimo era entre 2 y 1,43 ya que por encima y por debajo de este intervalo el tamaño de las NP no era adecuado o directamente no se formaban. Finalmente, eligieron para el estudio la formulación con una concentración de RG de 0,5 mg/ml dando lugar a unas NP con un tamaño medio de 75,37 nm y una eficacia de encapsulación del 96,08%.

Se midió la fuerza de mucoadhesión de las NP, la liberación in vitro de RG de las NP, la permeabilidad ex vivo usando mucosa nasal de cabra y un examen histopatológico de mucosa nasal.

Se determinó la fuerza de mucoadhesión de las NP tanto blancas como cargadas con rotigotina (Shak et al., 2019). Para ello, se midió su capacidad para unirse a la mucina. Las NP placebo mostraron un 92,6% y las cargadas un 80,98% de mucoadhesión. El descenso en las NP de RG puede ser explicado debido a una reducción de disponibilidad del QT para interactuar con la mucina, lo que se traduciría en una menor penetración de las NP en la capa mucosa (Shak et al., 2019).

El estudio de liberación in vitro se realizó utilizando una técnica de diálisis donde las NP cargadas fueron suspendidas en un medio imitando el fluido nasal (PBS 7,4) dentro de una tubería de diálisis. La concentración de RG se midió en el medio externo utilizando HPLC (Shak et al., 2019). Tal y como se muestra en la figura 18 y, coincidiendo con los estudios anteriores, la liberación fue rápida en las primeras 3 horas, debido a la RG adsorbida en la superficie de las NP; esto fue seguido de una liberación más lenta llegando al 49,45% liberado pasadas 24 horas. La liberación fue más lenta en las NP comparadas con la solución debido a que la encapsulación de la RG aumenta su interacción con el QT retrasando así su liberación al medio.

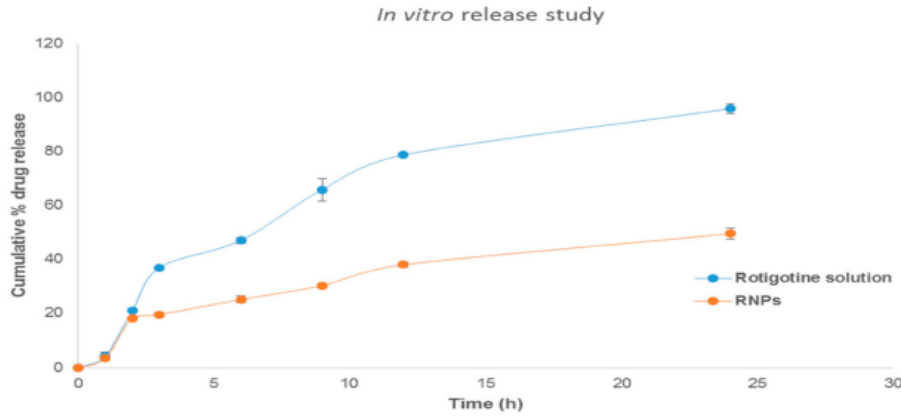


Figura 18: perfil de liberación de la RG de las NP de QT (tomado de Shak et al., 2019).

Lo siguiente fue ver la permeabilidad ex vivo a la mucosa nasal de cabra. La figura 19 muestra la comparación a la permeabilidad nasal como el valor acumulativo de la RG que ha atravesado la mucosa frente al tiempo. En todos los tiempos se observa que el porcentaje de permeabilidad es mayor en la RG liberada de las NP que la que se encuentra en solución. Al final del estudio el porcentaje para las NP era de $92,15 \pm 4,74\%$ mientras que para la RG en solución el valor era de $58,22 \pm 1,75\%$. Además se determinó el valor del coeficiente de permeabilidad para las NP y la RG en solución y los valores fueron $1,95 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $7,31 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Todos los datos de permeabilidad son mejores en las NP debido a que el QT cargado positivamente interacciona con los restos de ácido siálico (cargados negativamente) que hay en la superficie de las células de la mucosa. Este hecho provocaría un cambio en las uniones estrechas entre células de la mucosa, lo que mejoraría el transporte paracelular y la permeabilidad a través de la superficie nasal.

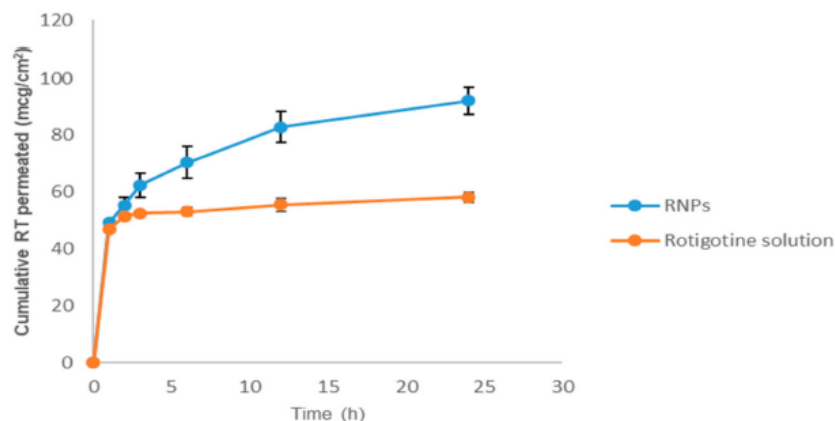


Figura 19: comparativa de la permeabilidad nasal ex vivo entre NP y RG en solución (tomado de Shak et al., 2019).

Por último se hizo un estudio histopatológico utilizando mucosa de cabra para ver el efecto de las NP sobre la integridad de la misma. Como se puede observar en la figura 20, la mucosa normal (control negativo) se encuentra intacta, con un buen revestimiento epitelial y numerosas glándulas. La mucosa tratada con isopropanol (control positivo) presenta un daño extenso afectando al revestimiento epitelial, con ausencia de moco y con tejido necrótico. Por último quedó reflejado que las mucosas tratadas con la RG en solución y con las NP no sufrieron daño alguno, preservando el revestimiento y sin signos de necrosis demostrando que las NP no afectan a la integridad de la mucosa (Shak et al., 2019).

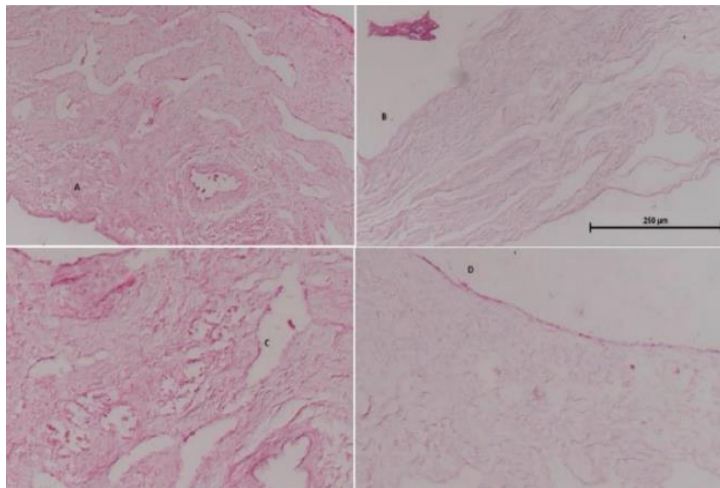


Figura 20: cortes histológicos de mucosa nasal utilizando una tinción hematoxilina-eosina a) control negativo b) control positivo c) solución de RG d) NP (tomado de Shak et al., 2019).

A la vista de los resultados obtenidos se concluyó que las NP de QT son una buena estrategia para su administración intranasal para el tratamiento de la EP debido a que aumentan la permeabilidad de la mucosa a la RG sin poner en peligro la integridad de la misma.

6. CONCLUSIÓN

La eficacia del tratamiento de la EP es limitada debido a la dificultad que tienen los fármacos de llegar a su lugar de acción. Las NPs resultan una interesante estrategia para resolver este problema gracias a su capacidad de atravesar la BHE y liberar el fármaco en el sitio adecuado traduciéndose en un mayor control de la dosis y en una menor incidencia de reacciones adversas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez D. Inyectables de liberación controlada, 2019. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/331571511_Inyectables_de_liberacion_controlada.
- Ansorena S., González E., Merino N., de Pablo E., Seguí A., Texeira F. Administración de midazolam intranasal con atomizador en las urgencias pediátricas. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermería de Urgencias y Emergencias, Puerto de Santa María (Cádiz) 2011.
- Barcia E., Boeva L., García-García L., Slowing K., Fernández-Carbadillo A., Casanova Y., Negro S. Nanotechnology-based drug delivery of ropinirole for Parkinson's disease. *Drug Delivery*. 24: 1112-1123, 2017.
- Bi C., Wang A., Chu Y., Liu S., Mu H., Liu W., Wu Z., Sun K., Li Y. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine*. 11: 6547-6559, 2016.
- Carretero M. Rotigotina. Monoterapia de la Enfermedad de Parkinson. *Offarm*. 25: 11-133, 2006.
- Centro de Información de Medicamentos (CIMA). www.cima.aemps.es
- Centro de Investigación Biomédica en Red. Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina www.ciber-bbn.es, 2014.
- Clínica Mayo www.mayoclinic.org, 2018.
- Farmacia Las Fuentes. www.info-farmacia.com
- Flórez C.I., Romero A. Administración de medicamentos vía intranasal. Manual de procedimientos generales de enfermería. Hospital Universitario Reina Sofía, 2010. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es>
- Gómez A.E. Enfermedad de Parkinson: abordaje terapéutico y farmacológico. *Offarm*. 26: 11-124, 2007.
- Gómez M., Díaz R., Morales R., Fernández J., Roldán G., Torner C. Efecto de la exposición al pesticida rotenona sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico nigro-estriatal en ratas. *Salud Mental*. 36: 1-8, 2013.
- Goycolea F.M., Remuñán-López C., Alonso M.J. Nanotecnología Farmacéutica: Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano (Monografía XXVIII). Real Academia de Farmacia, 2009. Disponible en: <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
- Gutiérrez E. Nanopartículas poliméricas: preparaciones y aplicaciones. XIV curso de iniciación a la investigación de la estructura de la materia: de las partículas elementales a los sistemas de alto peso molecular, 2017. Disponible en: <http://www.iem.cfmac.csic.es>
- Kataoka K., Scholz C. Polymers in Biomedical Applications. *Prog Polym Sci*. 32: 755-1134, 2007.
- Katiyar SS., Muntimadugu E., Rafeequi Ta., Domb AJ., Khan W. Co-delivery of rapamycin-and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. *Drug delivery* 23: 2608-2616, 2015.

- Lechuga L.M. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. Biotecnología aplicada a la salud humana: 98-112, 2011. Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/44635>
- López T., Ortiz E., Esquivel D., Schifter L., Martínez L. Nanomedicina: aplicación en enfermedades neurológicas, 2011. Disponible en: <https://docplayer.es/14225176-Nanomedicina-aplicacion-en-enfermedades-neurologicas.html>
- Novedades en inventos, patentes y modelos industriales. www.patentados.com, 2010.
- Porras M., Madrigal S., Vega J.R. Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubus glaucus*) y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 22: 81-91, 2012.
- Rodríguez M., Cervantes A. Detección y manejo de síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson: impacto en su prevalencia. Revista médica de Chile. 139: 1032-1038, 2011.
- Shak A., Md S., Kumar S., Madheswaran T., Alhakamy N., Aldawsary H., Radhakrishnan A. Fabrication, Optimization, and Evaluation of Rotigotine-Loaded Chitosan Nanoparticles for Nose-To-Brain Delivery. *Pharmaceutics* 11:26, 2019.
- Tysnes O.B., Stornstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Trans.* 124: 901-905, 2017.