

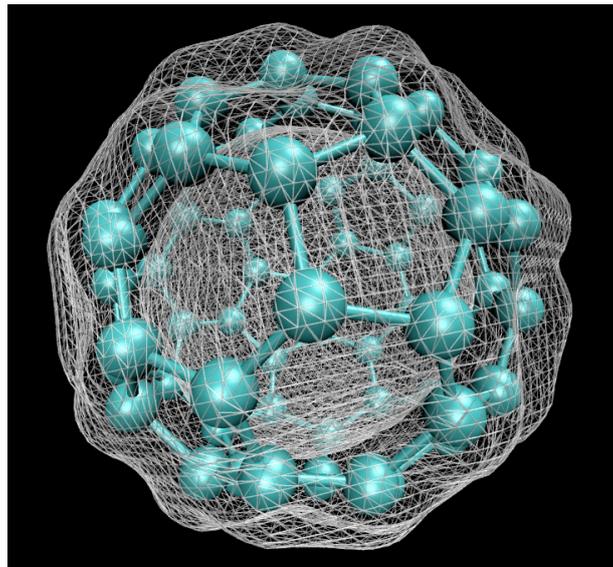


UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

LA NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS AL CEREBRO



JESÚS MEJÍAS SANTOS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO. GRADO EN FARMACIA

Revisión bibliográfica

LA NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS AL CEREBRO

Alumno: Jesús Mejías Santos

Tutores: Dr. Manuel Bueno Martínez y Dra. Inmaculada Molina Pinilla

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Sevilla, a 10 de Julio de 2020

ÍNDICE

Resumen.....	5
1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	7
3. Metodología.....	7
4. Resultados y discusión.....	8
4.1. Concepto de nanopartículas, su uso en la medicina y su evolución histórica.....	8
4.2. Nanopartículas portadoras para la liberación de fármacos al cerebro.....	11
4.3. Métodos de preparación.....	18
4.4. Requisitos de las nanopartículas como nanosistemas de administración para cruzar la BHE.....	21
4.5. Vías de administración.....	25
4.6. Aplicaciones actuales.....	27
4.6.1. Enfermedades neurodegenerativas.....	27
4.6.2. Tumores Neurológicos.....	31
4.6.3. Enfermedades neuroinflamatorias y otras enfermedades.....	32
4.7. Relación riesgo/beneficio del uso de nanomedicinas.....	33
5. Conclusiones.....	34
6. Bibliografía.....	35

RESUMEN

La nanotecnología es una herramienta que está tomando fuerza e interés en los últimos años debido a sus características únicas que la hacen un foco de atención para distintas industrias y diversos campos económicos, entre los que se encuentra la nanomedicina, disciplina en la cual se han hecho avances muy prometedores en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, muchas enfocadas a utilizar la nanotecnología para mejorar la vehiculización de fármacos ya existentes y darles acceso a lugares del organismo donde no podían llegar o donde no llegan a una concentración adecuada. El sistema nervioso central es un sistema que cuenta con múltiples mecanismos de defensa que dificultan su acceso a la mayor parte de los medicamentos y metabolitos, la barrera hematoencefálica (BHE) representa un obstáculo insuperable para la mayoría de medicamentos entre los que se incluyen los medicamentos neurológicos, citostáticos, antibióticos, etc. Una alternativa eficiente para administrar medicamentos, incluso péptidos y macromoléculas, a través de esta barrera es el empleo de nanopartículas poliméricas. Debido a estos mecanismos de defensa los tratamientos de la gran mayoría de patologías del SNC no tienen una buena evolución y respuesta, dando muchos de ellos importantes efectos secundarios fuera del sistema a tratar; la nanotecnología no solo es una herramienta con un gran potencial para mejorar el tratamiento con fármacos que ya se usan a día de hoy, logrando efectos terapéuticos máximos con efectos secundarios mínimos, sino también la de incluir otros nuevos fármacos que por sus características fisicoquímicas no podrían atravesar la BHE. En este trabajo fin de grado se hace una revisión de la nanotecnología como ciencia, una clasificación de los nanomateriales que se usan para transportar fármacos al cerebro, como se producen y sus posibles aplicaciones, así como sus potenciales riesgos para la salud.

Para hacer este trabajo de fin de grado se han utilizado las siguientes palabras clave: *Nanotechnology; Nanoparticles; Organic nanoparticles; Brain targeting; Nanomedicines.*

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se puede definir como la ciencia y la ingeniería involucradas en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya organización funcional más pequeña, en al menos una dimensión, está en la escala nanométrica o una billonésima parte de un metro. A estas escalas, la consideración de moléculas individuales y

grupos interactivos de moléculas en relación con las propiedades macroscópicas en masa del material o dispositivo se vuelven importantes, ya que tiene un control sobre la estructura molecular fundamental, lo que permite el control sobre las propiedades químicas y físicas macroscópicas (Silva, 2004) (Figura 1).

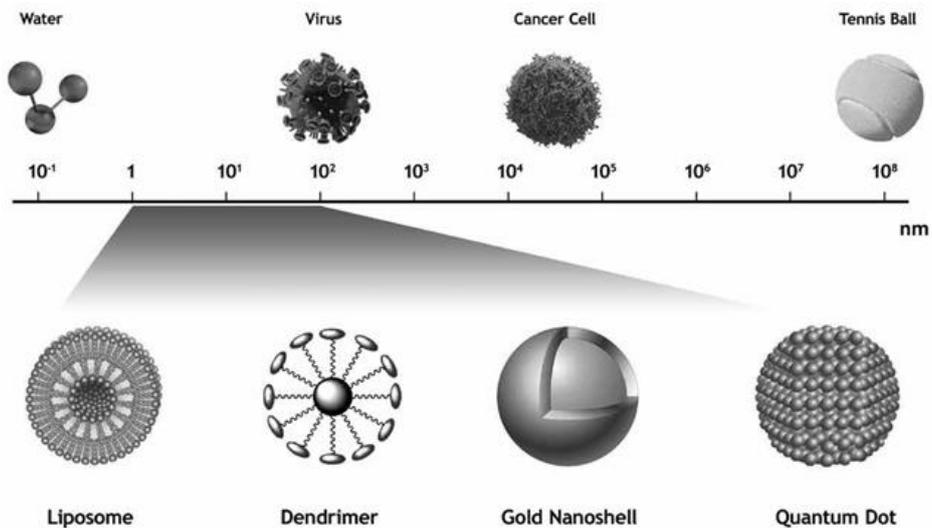


Figura 1. Resumen comparativo de escala de tamaños (Krúpa et al, 2014)

En la actualidad, la nanotecnología se usa con frecuencia en diversas áreas como en la textil, la agrícola, la electrónica, en la ciencia forense, en el espacio, en la construcción, en el medio ambiente, en la cosmética y en la médica. Aún es desconocido el papel que desempeñará esta nueva disciplina en nuestra sociedad, aunque ya algunos expertos prevén que pueda ser una pieza fundamental en el futuro de la industria y la medicina.

La definición clásica de nanopartículas que aparece en la “*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*” y en la “*Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*” se formuló hace ya más de 40 años, es: *Las nanopartículas para fines farmacéuticos son partículas coloidales sólidas que varían en tamaño de 1 a 1000 nm (1 μ m), y consisten en materiales macromoleculares en los que el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se disuelve, atrapa o encapsula, o el principio activo está adsorbido o unido* (Kreuter, 2014).

Un requisito extremadamente importante para los sistemas de administración cerebral basados en nanopartículas es que éstas deben ser rápidamente biodegradadas, en un período de tiempo de no más de unos pocos días. Las partículas no degradables, como los fullerenos, las partículas metálicas, los sistemas tóxicos como los puntos cuánticos o los nanotubos de carbono, pueden tener efectos dañinos similares al asbesto, y por lo tanto no son útiles (Wohlfart et al, 2012).

Las nanopartículas orgánicas son biodegradables y las más biocompatibles, dando menos problemas en los ensayos *in vivo* y haciéndolas las candidatas ideales para convertirse en vehículos para el SNC y el abordaje de la BHE como su mayor obstáculo a superar. Las nanopartículas biodegradables se utilizan con frecuencia para mejorar el valor terapéutico de diversos medicamentos y moléculas bioactivas solubles/insolubles en agua al mejorar la biodisponibilidad, la solubilidad y el tiempo de retención. Estas formulaciones de nanopartículas y medicamentos reducen los gastos del paciente y los riesgos de toxicidad. La nanoencapsulación de medicamentos (nanomedicinas) aumenta la eficacia, la especificidad, la tolerabilidad y el índice terapéutico de los medicamentos correspondientes. Estas nanomedicinas tienen muchas ventajas en la protección de la degradación prematura, en la interacción con el entorno biológico, en la mejora de la absorción en el tejido seleccionado, en la biodisponibilidad, en el tiempo de retención y en la mejora de la penetración intracelular (Kumari et al, 2010). Las nanomedicinas o nanofármacos es aún un campo con mucho por investigar y muchas dificultades que abordar, que está en pleno auge y donde ya algunos expertos las ven como una revolución en la medicina, siendo más cautos no se puede negar la gran versatilidad y futuras posibles aplicaciones que tiene esta reciente rama de la medicina.

En el presente trabajo fin de grado se trata de hacer una revisión de la nanotecnología y su avance como ciencia, prestando especial atención en los avances enfocados en la mejora y nuevas vías de administración de fármacos al cerebro, y su potencial toxicidad.

2. OBJETIVOS

1. Conocer la situación actual de las nanopartículas y las características que necesitan éstas para poder administrar fármacos al cerebro.
2. Hacer una recopilación de los posibles usos de los nanofármacos en enfermedades neurológicas.
3. Conocer los posibles beneficios y riesgos de la administración de nanopartículas en seres humanos.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo de revisión bibliográfica cuyo título es “La nanotecnología como herramienta para el transporte de fármacos al cerebro” han sido empleadas diferentes fuentes de información. Entre ellas destaca el portal web de la biblioteca

de la Universidad de Sevilla (<http://fama.us.es/>), a través de la cual se puede acceder a recursos electrónicos como: (a) Scopus: Elsevier. Scopus [en línea], [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <https://www.scopus.com/>; (b) SciFinder: American Chemical Society. SciFinder [en línea], [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <https://scifinder.cas.org/>

Además, han sido empleadas otras bases de datos de acceso virtual, artículos y revistas científicas, libros, tesis, etc. Todo ello con el fin de elaborar un trabajo que recopile la información más actualizada y completa. Se ha tenido en consideración la relevancia y la actualidad de los artículos utilizados asignándose preferentemente los publicados durante los últimos diez años. Los resultados obtenidos de la búsqueda en este período de tiempo han sido aproximadamente cincuenta y nueve mil artículos, todos ellos relacionados con la nanotecnología (Scopus 27/03/2020). Este resultado supone un poco más del doble de los encontrados antes del año 2010, veintiocho mil artículos (Scopus 27/03/2020), por lo que se destaca un incremento considerable en el interés y en la investigación en este campo. De entre los artículos encontrados en la última década, unos dos mil quinientos se centran en la administración de nanomedicinas al cerebro y diez mil lo hacen en los nanomateriales poliméricos.

Para hacer esta búsqueda bibliográfica se han utilizado las siguientes palabras clave: *Nanotechnology; Nanoparticles; Organic nanoparticles; Brain targeting; Nanomedicines.*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concepto de nanopartículas, su uso en la medicina y su evolución histórica

Para entender qué son las nanopartículas, primero debemos saber cuál es la definición y el concepto de nanomaterial, que en sí mismo no es una tarea sencilla, dado que distintas organizaciones como la Comisión y el parlamento Europeo, la Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA), la Organización Internacional de Normalización (ISO) y distintos gobiernos de países como Canadá, Francia, Australia o Dinamarca entre otros (Boverhof et al, 2015), han dado distintas definiciones que en ocasiones suelen ser inconsistentes y en algunos parámetros incluso contradictorias. Podemos observar como las características que se consideran en las distintas definiciones actuales del término "*nanomaterial*" son diversas, y las propiedades estudiadas varían entre diferentes nanopartículas, estas características son: solubilidad, capacidad para formar aglomerados, umbral de distribución, la forma en cómo se producen y propiedades novedosas (con respecto a sus materiales originales). Como referencia podemos

tomar la definición dada por La Organización Internacional de Normalización (ISO) que definió a un **nanomaterial** como un "*material con cualquier dimensión externa en la nanoescala o que tiene estructura interna o estructura de superficie en la nanoescala*" y define una **nanopartícula** como un "*nanoobjeto con las tres dimensiones externas en la nanoescala donde las longitudes de los ejes más largos y más cortos del nano-objeto no difieren significativamente*". La nanoescala se define como el rango de tamaño que aproximadamente va de 1 a 100 nm (ISO, 2017). El tamaño es la característica que define fundamental a todos los nanomateriales, y donde particularmente coinciden todas las definiciones dadas. Si bien el tamaño es un concepto fácil de entender, es más difícil de aplicar porque no hay límites físicos o químicos naturales que delineen la "nanoescala". Por convención, el rango de 1-100 nm es el rango de tamaño más comúnmente utilizado en los materiales de referencia, pero no hay un límite real que marque claramente el final de la nanoescala desde una perspectiva química o biológica. En la actualidad no es extraño utilizar nanosistemas de 300, 500 nm incluso pudiendo llegar a los 1000 nm según los objetivos de estos.

El diseño de sistemas de administración de medicamentos es una disciplina cada vez más valiosa en el desarrollo farmacéutico, que permite la manipulación voluntaria de los índices terapéuticos y de los perfiles farmacológicos. En los futuros tratamientos se pasará a un transporte eficiente y específico desde el sitio de administración hasta los tejidos afectados por la enfermedad. Esto explica el desarrollo de vehículos que pueden alterar la farmacocinética y la farmacodinámica de los agentes terapéuticos, como prioridad en la investigación de la industria farmacéutica y médica. Esta necesidad surge principalmente debido a las enormes barreras que un fármaco debe superar antes de llegar a su sitio objetivo dentro del cuerpo. En general, el empleo de las nanopartículas para la administración de fármacos puede ofrecer varias ventajas como: una mayor biodisponibilidad del fármaco, una mayor longevidad y estabilidad, la posibilidad de tener una administración específica hacia un tejido o célula, una actividad prolongada en el tejido objetivo y, sobre todo, la capacidad de cruzar barreras fisiológicas muy selectivas.

Podríamos definir a las nanopartículas portadoras de fármacos como sistemas coloidales de estructuras de tamaño nanométrico, en un rango de 1 a 500 nm. Pueden obtenerse a partir de materiales poliméricos o lipídicos, y pueden encapsular agentes terapéuticos, modificando el perfil y la velocidad de liberación del fármaco en el cuerpo humano. El tamaño, la carga superficial, la morfología y la composición de la matriz juegan un papel fundamental para su destino *in vivo*, y todas estas características se pueden modular para obtener un perfil de liberación modificado, así como una actividad biológica y compatibilidad adecuadas. Los

sistemas coloidales son administrables por todas las vías (oral, pulmonar, nasal y oftálmica) e incluso por la vía intravenosa, ya que su tamaño está por debajo de los vasos más pequeños (5–6 μm de diámetro) (Craparo et al, 2011).

Para explicar la evolución de las nanopartículas y la nanotecnología debemos fijarnos en la historia de estas, cabe mencionar que tienen una historia más larga de la que podríamos pensar en un principio, y que gracias a los descubrimientos arqueológicos que se han ido encontrando a lo largo de la historia podemos remontar los inicios de la nanotecnología hasta hace más de 4500 años. Así, se han encontrado refuerzos de las matrices de cerámica con nanofibras de asbesto natural, y el uso de arcillas de tamaño nanométrico para blanquear lana y ropa en Chipre. Del mismo modo, también los antiguos egipcios empleaban nanopartículas de ≈ 5 nm de sulfuro de plomo para tintes capilares o la creación en torno al siglo III a. C. del “azul egipcio” que fue el primer pigmento sintético que los egipcios prepararon y utilizaron con una mezcla sinterizada de vidrio y cuarzo de tamaño nanométrico. Sin embargo, una pieza de vidrio romana es el ejemplo más famoso del antiguo uso de nanopartículas metálicas. La copa *Lycurgus* es una copa romana de vidrio del siglo IV, hecha de un vidrio dicróico que muestra diferentes colores: rojo cuando la luz la ilumina por detrás y verde cuando la luz la ilumina por delante (Figura 2). Estudios recientes encontraron que la copa *Lycurgus* contiene nanopartículas de una aleación de Ag-Au, en una proporción de 7:3 además de aproximadamente un 10% de cobre (Jeevanandam et al, 2018).



Figura 2. Comparación de la copa *Lycurgus* según desde donde incide la luz.
The British Museum

Teniendo en cuenta estos antecedentes históricos de las nanopartículas, podemos observar que el uso tradicional de estas ha sido la decoración aprovechando sus particularidades, por ejemplo, en la reflexión de la luz. Pero ¿dónde y cuándo se produjeron las primeras nanopartículas farmacéuticas?, se puede afirmar legítimamente que todo comenzó en la ETH en Zurich, Suiza, en los laboratorios del profesor Peter P. Speiser, donde junto con su alumno de doctorado Gerd Birrenbach en 1973, tras 4 años de intenso trabajo, presentó su tesis:

"Über Mizellpolymerisate, mögliche Einschlußverbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung als Adjuvantien" (Acerca de las micelas polimerizadas, complejos de inclusión potencial (nanocápsulas) y su uso como adyuvantes), siendo el primer documento donde la palabra "nanocápsulas" se usó por primera vez. Se produjo un incremento en el interés de la industria por la nanotecnología pero los nanosistemas son complejos y el camino para convertirlos en sistemas clínicos útiles comercializables era más largo de lo esperado. Los liposomas fueron los primeros productos en llegar al mercado alrededor de 1990 (por ejemplo, Alveofact, un surfactante pulmonar liposomal), volvió a producirse un nuevo impulso a la nanotecnología, cuando las nanopartículas proporcionaron una solución para la formulación de medicamentos de baja solubilidad o con un difícil acceso a la zona de acción. Por ejemplo, en terapia genética el uso de nanopartículas como vectores portadores juega un papel muy relevante, dado que, la transfección se logra mediante liposomas cargados positivamente, pero también por nanopartículas poliméricas o lipídicas. A diferencia de los virus naturales, que también se pueden emplear como vectores transportadores, los sistemas sintéticos están bien definidos y pueden producirse de manera más controlada (Müller y Keck, 2010).

4.2. Nanopartículas portadoras para la liberación de fármacos al cerebro

Gracias a su potencial, se está diseñando una amplia gama de sistemas de administración de medicamentos para mejorar el tratamiento de los trastornos del sistema nervioso central (SNC), ya que la permeabilidad restringida de la barrera hematoencefálica (BHE) requiere enfoques más sofisticados con el objetivo de obtener la mejora del rendimiento del fármaco. Los principales sistemas de administración nanoparticulados dirigidos al cerebro son: liposomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, y micelas poliméricas. Tienen un gran potencial en la administración de fármacos al SNC, aunque no son los únicos nanomateriales que se usan, sí son los más prometedores y los que mejores resultados han dado a la hora de atravesar la BHE de manera eficiente y sin efectos tóxicos importantes.

Liposomas. Los liposomas representan la primera generación de los nuevos portadores coloidales, que revolucionaron el escenario en la administración parenteral de fármacos. La palabra liposoma deriva de dos palabras griegas: lipos (grasa) y soma (cuerpo o estructura), y en general, se definen como vesículas esféricas con tamaños de partículas que varían de 30 nm a varios micrómetros, y consisten en una o más bicapas lipídicas o lamelas que rodean las unidades acuosas, donde los grupos de cabeza polar están orientados en la vía de las fases acuosas interiores y exteriores (Akbarzadeh et al, 2013), haciéndolos ideales para la administración de fármacos tanto lipófilos como hidrófilos. Por tanto, los liposomas se pueden clasificar por su tamaño y número de estas lamelas:

- Pequeñas vesículas unilamelares (SUV) entre 10-50 nm.
- Grandes vesículas unilamelares (LUV) entre 50-1000 nm.
- Vesículas multilamelares (MLV) entre 20–100 nm, de esta además existen varios tipos, según la conformación de las bicapas internas.

Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol, tocoferol, marcadores fluorescentes u otros componentes, introducidos en la bicapa lipídica con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular como puede ser carga superficial, reducir la permeabilidad de la membrana o incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa, estas características, además son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen, por poner unos ejemplos, el DSPE (*1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) o el DPPC (*1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) que son saturados, y también mencionar el DOPC (*1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) y el DOPS (*1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine*) que son insaturados. La presencia o ausencia de insaturaciones confiere diferencias notables en la flexibilidad de las membranas liposomales. Además, para mayor variedad pueden combinarse dos fosfolípidos permitiendo un alto margen de flexibilidad, así como de carga superficial. Si se utilizan fosfolípidos funcionalizados se puede modificar la superficie del liposoma.

Las formulaciones liposomales usadas actualmente tienen tiempos de circulación prolongados y el sistema reticuloendotelial no las elimina de la circulación. Tales liposomas se modifican mediante: (1) la adición de lípidos cargados (positivo o negativo); (2) modificaciones en la composición lipídica de la membrana liposomal; (3) unión covalente de polímeros (liposomas furtivos); o (4) unión de proteínas, que pueden reconocer poblaciones celulares seleccionadas (Shapira et al, 2009).

Se han empleado de manera efectiva liposomas dirigidos con el péptido PTD_{HIV-1} y cargados con Epirubicina y celecoxib, un potente quimioterápico y un inhibidor de la COX-2 respectivamente, en el tratamiento del glioma cerebral en modelos *in vitro* e *in vivo* en ratas (Ju et al, 2016). El péptido PTD_{HIV-1} es un péptido de penetración celular (CPPs) rico en arginina, y por tanto cargado positivamente. Esta carga es la que se considera responsable de promover la absorción gracias a la interacción con las células aniónicas de la barrera hematoencefálica (BHE). Una posible aplicación tanto diagnóstica como terapéutica en la enfermedad de Alzheimer es el empleo de liposomas conjugados en su superficie con curcumina, que presenta una alta afinidad por la placa amiloide. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que retrasan la agregación y la secreción del péptido-A β , previniendo la acción tóxica de estos (Lazar et al, 2013).

La gran cantidad de productos que usan liposomas para administrar fármacos, nos da una idea del gran potencial que tienen los liposomas como nanovehículos. Sin embargo, presentan también numerosas desventajas como: su mala estabilidad, su baja eficacia de encapsulación, sus diversas interacciones celulares y de adsorción, su eliminación más rápida por el RES (se requiere PEG), que junto con el gran costo y complejidad de su fabricación, dificultan grandemente una comercialización exitosa (Antimisiaris et al, 2018).

Nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas basadas en lípidos incluyen “*solid lipid nanoparticles*” (SLN) y “*nanostructured lipid carriers*” (NLC), con un diámetro promedio de 40-1000 nm y morfología esférica. Tanto los SLN como los NLC están compuestos de lípidos y tensioactivos de fase sólida. La fase dispersa es grasa sólida, y los tensioactivos se usan como emulsionantes. Los componentes lipídicos de los SLN son todos sólidos tanto a temperatura corporal como a temperatura ambiente y pueden ser triglicéridos altamente purificados, mezclas complejas de glicéridos o incluso ceras. Los tensioactivos se usan en concentraciones de 0.5% a 5% para mejorar la estabilidad. La selección adecuada de lípidos y tensioactivos puede afectar las propiedades fisicoquímicas del nanovehículo (Naseri et al, 2015). Los NLC consisten en una matriz lipídica sólida no estructurada hecha de una mezcla de lípidos sólidos y líquidos mezclados y una fase acuosa que contiene un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos. Típicamente, los lípidos sólidos se mezclan con lípidos líquidos en una proporción de 70:30 hasta una proporción de 99,9:0,1 mientras que el contenido de tensioactivo varía 1.5%-5% (m/v) (Beloqui et al, 2016). Los NLC muestran una mayor capacidad de carga y una mayor estabilidad durante el almacenamiento.

Los SLN y NLC se preparan a partir de lípidos fisiológicos (triglicéridos, ácidos grasos, esteroides, ceras, etc.), los componentes más abundantes en las nanopartículas lipídicas, son los lípidos que son sólidos a la temperatura corporal 37 °C, como la trimiristina, tripalmitina, cetil palmitato, gliceril behenato, ácido esteárico y triglicéridos caprílico/cáprico. Los tensioactivos iónicos y no iónicos comúnmente más usados son: polisorbatos (Tween 80), lecitinas, poloxámeros, derivados de ácidos grasos y sus combinaciones.

La mayor ventaja de los SLN y NLC con respecto a los liposomas, es la capacidad de producción a gran escala a un bajo costo, facilitando mucho más su futura comercialización. Además, debido a sus características lipofílicas y por lo general su pequeño tamaño, podrían atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) a través de las uniones estrechas entre las células endoteliales, o bien, por endocitosis o transcitosis. También son sistemas en los que pueden hacerse modificaciones en la superficie, por ejemplo incluyendo lípidos funcionalizados o polímeros como el PEG.

Con respecto a su uso como vehículos de transporte de fármacos al SNC, encontramos en la literatura diversas investigaciones clínicas. Así, se han empleado sistemas SLN dirigidos con lactoferrina, con el fin de transportar por endocitosis mediada por receptor de lactoferrina (Lfr) expresado en las células endoteliales de la BHE, y cargados con docetaxel para el tratamiento de tumores cerebrales. En estudios realizados *in vitro* se ha observado que los SLN cargados con docetaxel y dirigidos con lactoferrina presentan una mayor eficiencia que cuando se emplea docetaxel en solución (Singh et al, 2016). Otro estudio empleó SLN cargadas con docetaxel y ketoconazol, un antifúngico que en este caso se usa debido a que inhibe la glicoproteína P de eflujo (MDR1) en las células endoteliales de la BHE. Además, se emplea ácido fólico para promover la endocitosis mediada por el receptor de ácido fólico situado en la BHE. Este sistema de transporte demostró ser, en modelos *in vitro* e *in vivo* en ratas, el más eficiente y el que más fármaco transportó al cerebro, en comparación con la administración de docetaxel en solución, de SLN cargados con docetaxel o de SLN cargados con docetaxel y ketoconazol (Venishetty et al, 2013).

Los sistemas NLC también se utilizan frecuentemente en investigaciones clínicas como sistemas de transporte al cerebro. Así, por ejemplo, se han utilizado NLC dirigidos con lactoferrina y cargados con curcumina, se empleó un modelo de rata con enfermedad de Alzheimer para evaluar los efectos terapéuticos, y los resultados indicaron que los NLC dirigidos conferían la máxima estabilidad a medida que avanzaban a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Los estudios de imagen *ex vivo* demostraron que Lf-mNLC (NLC modificado con lactoferrina) podría penetrar óptimamente la BHE y acumularse preferentemente en el cerebro, en las zonas del córtex y el tercer ventrículo (Meng et al, 2015).

También se han empleado los NLC para transportar baicaleína, un modulador alostérico del receptor GABA_A con propiedades ansiolíticas sin efectos sedativos o miorelajantes. Se administraron por vía intravenosa a ratas y los niveles plasmáticos de baicaleína cuando se utilizaron los NLC fueron mucho más altos (con una vida media más larga) que cuando se empleó el fármaco libre. Los NLC provocan mayores acumulaciones de baicaleína en la corteza cerebral y el tronco encefálico en comparación con la solución acuosa (Tsai et al, 2012).

Algunos de los inconvenientes de los SLN son imprevisibilidad y tendencia a la gelación, expulsión del principio activo, crecimiento de las partículas lipídicas por agregación, transiciones polimórficas, etc. Los NLC presentan menos inconvenientes al ser la segunda generación de SLN pero con una cinética variable en los procesos de distribución y eliminación, requieren el uso de surfactantes durante su producción, son susceptibles a la maduración de Ostwald y la carga superficial tiene un marcado efecto sobre su estabilidad (Antimisiaris et al, 2018).

Nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales, que oscilan desde 1-1000 nm, y que suele dividirse en dos tipos: nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas consisten en nanopartículas núcleo-cubierta, con una cubierta rígida que rodea el núcleo; que podría definirse como un espacio de reserva. El núcleo puede ser semisólido o líquido a temperatura ambiente, ya sea lipófilo o hidrófilo. Las nanoesferas consisten en matrices homogéneas cuya masa entera es sólida y generalmente son esféricas, la formación de una u otra estructura depende de la estructura del polímero, así como del método de preparación (Fornaguera y Solans, 2016) (Figura 3).

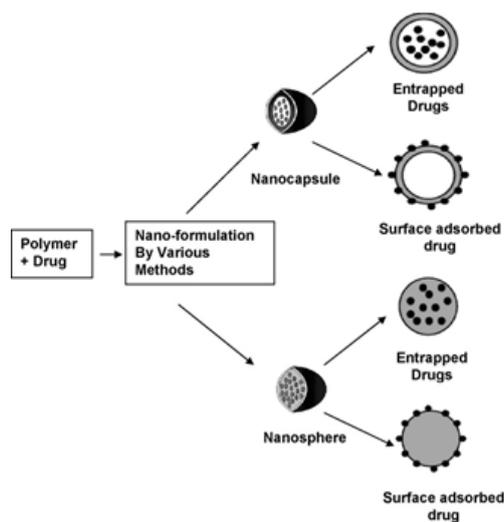


Figura 3. Tipos de nanopartículas biodegradables: de acuerdo con la organización estructural, y el modo en el que las moléculas del fármaco están atrapadas en el interior o adsorbidas en superficie (Kumari et al, 2010)

Las nanopartículas poliméricas se forman a partir de copolímeros biocompatibles y biodegradables con baja solubilidad en agua, las más comunes y ampliamente utilizadas son ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), poli(alquil cianoacrilatos), quitosano y gelatina (Kumari et al, 2010). Las nanopartículas poliméricas pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) generalmente por endocitosis seguida de transcitosis, la mayoría de ellas mediada por un ligando-receptor específico. Por ejemplo, se cree que las nanopartículas de poli(butil cianoacrilato) recubiertas con polisorbato 80 cruzan la BHE a través de la adsorción plasmática de las apolipoproteínas B y E, lo que resulta en endocitosis mediada por receptor de las células endoteliales de los capilares sanguíneos cerebrales. Estas apolipoproteínas cruzan normalmente la BHE (Silva, 2004), por eso se dice que el polisorbato 80 (o Tween 80) tiene un efecto de direccionamiento pasivo hacia la BHE. Aunque

también pueden ocurrir otros procesos como la modulación de las uniones estrechas entre las células endoteliales de la BHE o por la inhibición de la glicoproteína P de eflujo (o conocida en inglés como “multidrug resistance protein 1” (MDR1)) y contribuyendo a la liberación óptima de medicamentos para el cerebro. Los materiales poliméricos tienen una buena combinación de características para su uso: son estables y permiten una alta carga de muchos compuestos, proporcionan un buen control sobre la cinética de liberación del fármaco, se pueden modificar fácilmente para ajustar bien sus propiedades, y muchos polímeros tienen una larga historia de uso seguro en humanos (Patel et al, 2012).

Las nanopartículas de poli (butil cianoacrilato) (PBCA) fueron el primer sistema de nanopartículas basado en polímeros utilizado para administrar medicamentos al SNC. En estos primeros estudios, las nanopartículas de PBCA se cargaron con dalargin (un hexapéptido con actividad opioide), algunas se recubrieron con polisorbato 80 y otras no, y se administraron por vía intravenosa, con el objetivo de lograr concentraciones a nivel terapéutico de fármacos dentro del SNC. Los estudios *in vivo* demostraron que las partículas de PBCA cargadas con dalargin tuvieron un efecto antinociceptivo, con mayor efectividad si estaban recubiertas con polisorbato 80 (ya se estaba empezando a dilucidar el efecto de direccionamiento pasivo) (Kreuter et al, 1995).

Los poliésteres como el poli(ácido láctico) (PLA) y el poli(ácido glicólico) (PGA), y su copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) también se han estudiado ampliamente debido a su historial de uso seguro en medicina. De manera análoga a la investigación comentada anteriormente que empleaba PBCA recubierto con polisorbato 80, también se ha demostrado que el recubrimiento de la superficie de nanopartículas de PLGA con polisorbato 80 y poloxamer 188 mejoran la penetración en el SNC. Se ha descrito como nanopartículas de PLGA cargadas con paclitaxel, un potente quimioterápico, y dirigidas con glutatión, con el fin de facilitar la endocitosis a través de los transportadores de glutatión en la barrera hematoencefálica, se mostraron prometedoras para los tratamientos de tumores cerebrales y glioblastomas (Geldenhuys et al, 2011).

Las nanopartículas de quitosano pueden usarse para administrar por vía intraperitoneal dopamina al SNC, pudiendo mejorar el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Trapani et al, 2011), este estudio se comenta más adelante en este trabajo fin de grado. El quitosano es un polímero que puede presentar carga positiva, lo que lo convierte en un material atractivo al mejorar la interacción con las células aniónicas de la BHE.

Micelas poliméricas. Las micelas poliméricas han llamado la atención recientemente como una nueva nanopartícula para la administración de fármacos, la versatilidad de las micelas

producidas a partir de copolímeros anfífilicos como nanoestructuras autoensambladas (≈ 10 a 200 nm) ha señalado avances significativos en el área biomédica debido a sus diversas funciones y éxito clínico (Kataoka et al, 2001). La mayoría de las micelas poliméricas estudiadas para la administración de fármacos están compuestas por copolímeros dibloque o tribloque o polímeros de injerto con un segmento hidrofóbico e hidrofílico o copolímeros iónicos con un segmento hidrofílico y un segmento iónico. Las micelas de copolímero de bloque se pueden clasificar en función del tipo de fuerzas intermoleculares que gobiernan la segregación del segmento central en el entorno acuoso, por ejemplo, micelas anfífilicas (interacciones hidrofóbicas), micelas complejas de poliiiones (PICM; interacciones electrostáticas) y micelas formadas por complejación de metales (Kang et al, 2005). Las micelas poliméricas que más se usan son las anfífilicas, que se componen de dos partes, el núcleo hidrófobo que actúa como reservorio de fármacos hidrófobos, y se compone de polímeros como poli(ácido D,L-láctico) (PDLLA), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli(ϵ -caprolactona) (PCL). En cambio, para la parte externa hidrofílica de la micela se suele usar el PEG, debido a su baja toxicidad y una combinación muy atractiva de propiedades que dan mucha estabilidad al nanosistema. Pero no es el único, también se pueden usar polímeros como poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenimina) (PEI), poli(2-etil-2-oxazolona) (PEOz), poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP), dextrano, poli(ácido acrílico) y poli(ácido aspártico) (Deshmukh et al, 2017).

Se pueden encontrar en la bibliografía diferentes estudios que emplean micelas poliméricas. Por ejemplo, se han utilizado micelas poliméricas, conteniendo PEG en su superficie y empleando como director el ligando *p*-HA (ácido *p*-hidroxibenzoico), como vehículos para mejorar el transporte de docetaxel, un potente quimioterápico lipófilo y con baja solubilidad, en tumores cerebrales y glioblastoma. Este estudio se ha realizado tanto *in vitro* como *in vivo* en ratas, demostrándose una mejora importante tanto en la concentración alcanzada en el cerebro, como la prolongación en la vida media del fármaco (Zhang et al, 2013). Liu y colaboradores han utilizado micelas poliméricas autoensambladas a partir de polietilenglicol conjugado con colesterol y conteniendo TAT (activador transcripcional) en su superficie, un péptido de penetración celular (CPPs) rico en arginina y con carga positiva la cual interacciona con las células aniónicas de la BHE, con una estructura general TAT-PEG-b-Col. Estas micelas poliméricas se usaron para administrar ciprofloxacino, el antibiótico más potente de la familia de las fluoroquinolonas y con un amplio espectro, a través de la barrera hematoencefálica (BHE) en ensayos *in vitro* e *in vivo* en ratas, mostrándose como transportador adecuado para el tratamiento de infecciones cerebrales, generalmente las meningitis bacterianas (Liu et al, 2008).

De particular interés es la clase de copolímeros en tribloque tipo ABC de PEO-b-PPO-b-PEO conocidos comercialmente como Pluronic® (también conocidos como Poloxamers). Se ha documentado que presentan actividad farmacológica de manera intrínseca, en concreto inhiben específicamente la producción de ATP en las mitocondrias, dando un efecto inhibitorio de la glicoproteína P de eflujo (MDR1) dependiente de ATP. Es una glicoproteína bastante abundante en la barrera hematoencefálica (BHE) y además gran número de cánceres tienen o desarrollan una sobreexpresión de dicha proteína, generando resistencia al tratamiento quimioterápico. Se ha demostrado que el copolímero actúa potenciando anticancerosos como la doxorubicina y el paclitaxel.

4.3. Métodos de preparación

Liposomas. Existen varios métodos de preparación, y generalmente todos ellos implican tres etapas básicas: 1) Secado de lípidos a partir de disolventes orgánicos, 2) Dispersión del lípido en medios acuosos y 3) Purificación del liposoma resultante.

Los métodos más comunes a la hora de preparar liposomas son los métodos de dispersión mecánica, que incluye métodos como la sonicación, la extrusión de membrana, la hidratación de la película de lípidos mediante agitación manual, no manual o liofilización, entre otras. La purificación de los liposomas, es decir, la eliminación de los surfactantes y del material no autoensamblado, se lleva a cabo a través de diálisis, cromatografía de permeación en gel, entre otros métodos (Akbarzadeh et al, 2013) (Figura 4).

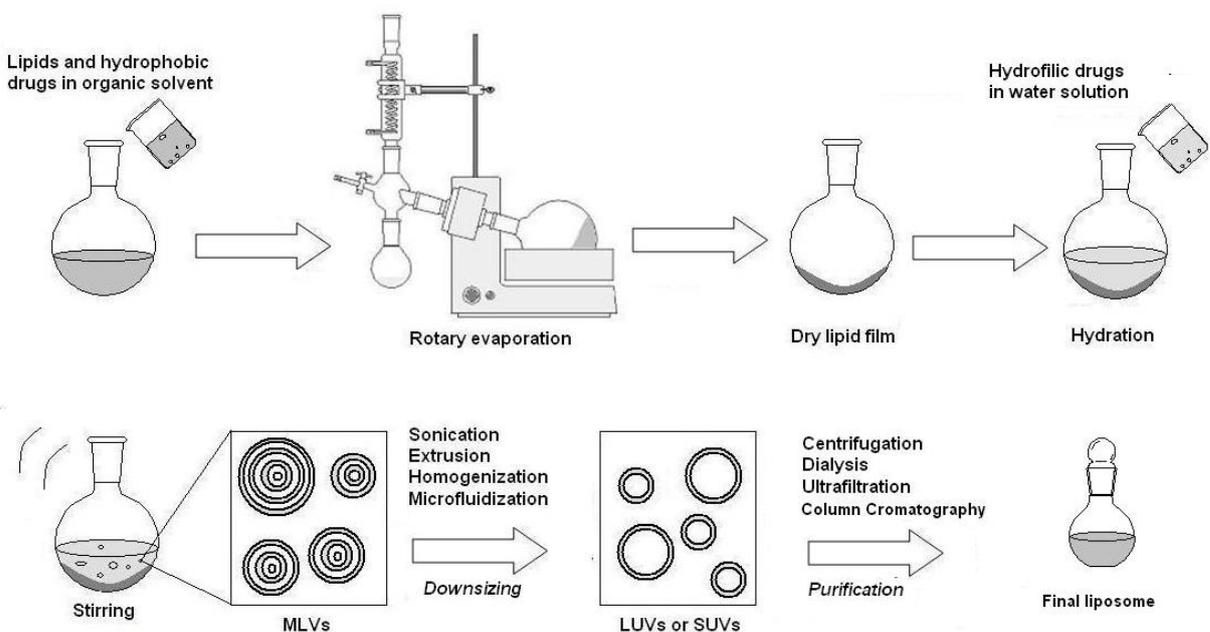


Figura 4. Esquema de preparación y purificación de liposomas (de Araújo Lopes et al, 2013)

Nanopartículas lipídicas. Existen varias técnicas de producción de nanopartículas lipídicas, como: (1) Homogeneización a alta presión (HPH); (2) Emulsión/evaporación de disolventes; (3) Extracción de emulsiones con fluido supercrítico (SFEE); (4) Ultrasonificación; (5) homogeneización a alta velocidad y secado por pulverización (Naseri et al, 2015).

Nanopartículas poliméricas. Los métodos de preparación de nanopartículas poliméricas se pueden clasificar en tres grandes métodos, que a su vez engloban a varios procedimientos: preparación de nanopartículas a partir de una dispersión de polímeros preformados, polimerización de monómeros *in situ* y Gelatina iónica o coacervación de polímeros hidrófilos (Nagavarma et al, 2012).

El método más común para la formación de nanopartículas es a través de polímeros preformados, donde se incluyen procedimientos como, la emulsión/evaporación, la nanoprecipitación, la precipitación salina, la emulsificación/difusión, la diálisis o la extracción a través de fluidos supercrítico. Entre ellas destaca la emulsión/evaporación, esta técnica es la más utilizada, y dependiendo de la hidrofilia del fármaco a encapsular, podremos elegir la emulsión simple o doble (Ramalho y Pereira, 2016). Este método consiste en la emulsión de dos fases, una fase acuosa con un emulsionante, y una fase orgánica inmiscible en agua, con un principio activo y un polímero que formará la nanopartícula. La dispersión de las fases se consigue mediante la sonicación o bien empleando un agitador que permita regular la velocidad. Una vez formada la emulsión se procede a la evaporación de la fase orgánica, precipitando las nanopartículas poliméricas y encapsulando el principio activo. La emulsión/evaporación nos aporta como principal ventaja la creación de nanopartículas de tamaño y morfología controlada (Figura 5).

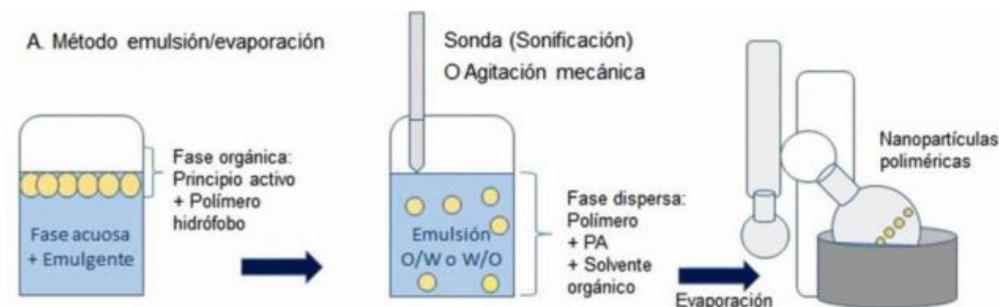


Figura 5. Esquema del método de emulsión/evaporación (Urrejola et al, 2018)

Micelas poliméricas. Los métodos tradicionales de preparación de las micelas poliméricas utilizando disolventes orgánicos, es un método ya en desuso debido a las trazas de impurezas residuales que contenían tras su preparación y que impedían su uso en clínica.

Alternativamente, la copolimerización inducida por radiación usando rayos γ , haz de electrones, plasma, microondas y radiación UV es bastante adecuada para sintetizar copolímeros anfifílicos y proporciona mayor eficiencia, mayor comodidad y evita iniciadores tóxicos (Tanaka et al, 2005). Igualmente, las micelas poliméricas como nanosistema de administración es reciente, y aún queda muchos problemas por resolver, el camino que hay hasta la comercialización es aún larga, incluso comparándola con otros nanosistemas.

4.4. Requisitos de las nanopartículas como nanosistemas de administración para cruzar la barrera hematoencefálica

Para saber cuáles son las características que deben cumplir las nanopartículas para que éstas atraviesen la barrera hematoencefálica (BHE), debemos, en primer lugar, definir y conocer las características de esta barrera altamente selectiva. La BHE consiste en una monocapa de células endoteliales polarizadas negativamente conectadas por uniones estrechas y complejas. Varias células como los astrocitos, las neuronas y los pericitos controlan dinámicamente las funciones de la BHE. Las células endoteliales del cerebro están separadas de estas otras células por una lámina basal, cuyos componentes son colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y sulfato de heparano, que a su vez pueden estar involucrados en el transporte de fármacos.

Además, los capilares del cerebro y la médula espinal de los vertebrados carecen de los pequeños poros que permiten el movimiento rápido de solutos desde la circulación hacia otros órganos. Los microvasos constituyen aproximadamente el 95% del área superficial total de la BHE, y representan la ruta principal por la cual los fármacos pueden entrar al cerebro. Sin embargo, la compleja estructura de la BHE, la presencia de altos niveles de proteínas de transporte de eflujo, incluida la glicoproteína P (P-gp o MDR1) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos-1 (MRP1), y la expresión de enzimas metabólicas plantean obstáculos para la entrada del fármaco al cerebro (Craparo et al, 2011) (Figura 6).

Una de las posibilidades para evitar esta barrera se basa en las características únicas que presentan los nanofármacos para interactuar con las células formadoras de la BHE a nivel molecular. Por tanto, la absorción de los fármacos u otros compuestos (como ácidos nucleicos, proteínas, medios de contraste o radiofármacos) podrían lograrse sin interferir con la función normal del cerebro. Sin embargo, estos nanofármacos deben optimizarse en relación con su tamaño, su forma y modificaciones de superficie a fin de facilitar la absorción, liberación y entrada de fármacos en la BHE.

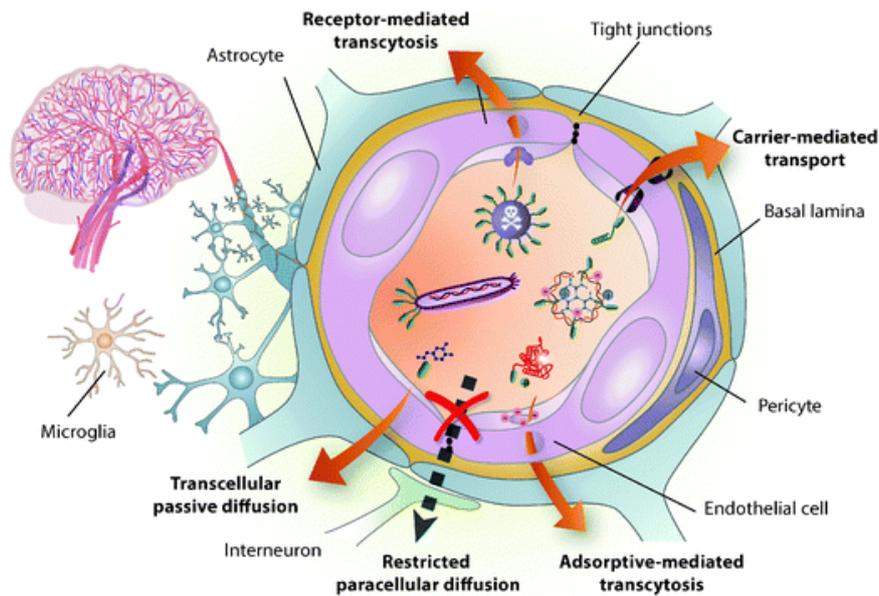


Figura 6. Representación esquemática de las células y los mecanismos de transporte que componen la barrera hematoencefálica (Oller-Salvia et al, 2016)

Tamaño y morfología. Una de las características más importantes de un nanofármaco es la vida media de este en el torrente sanguíneo, retrasando la excreción glomerular por el riñón y la absorción por el sistema retículo-endotelial (RES), o también conocido como sistema fagocítico mononuclear (MPS), en el hígado, bazo y pulmón. El RES se encarga de opsonizar y eliminar por fagocitosis toda partícula o cuerpo extraño facilitando su eliminación posterior de la circulación, este proceso depende principalmente del tamaño de la partícula, la carga y las propiedades de superficie. Las nanopartículas son reconocidas por este sistema como una partícula extraña y potencialmente tóxica precipitando su eliminación antes de completar su función. Para evitar esta rápida absorción por el sistema reticuloendotelial y, por lo tanto, evitar la filtración por el hígado y el bazo; se indica que su tamaño debe estar en el rango de 120-200 nm. Por lo tanto, es posible decir que las nanopartículas por debajo de 200 nm tienen una circulación sanguínea prolongada que conduce a un aumento del tiempo durante el cual las nanopartículas permanecen en contacto con la BHE (u otro entorno objetivo) y posibilitan la absorción por el cerebro (Gomes et al, 2016). Así mismo, las nanopartículas que presentan un periodo de circulación largo pueden acumularse lentamente en sitios patológicos con vasculatura afectada y con fugas (por efecto mejorado de permeabilidad y retención-EPR, también llamado acumulación pasiva) como en tumores, inflamaciones y áreas infartadas, facilitando la administración de fármacos en estas áreas. Con respecto al cerebro, ciertas enfermedades neuroinflamatorias, como la esclerosis múltiple que tienen una permeabilidad vascular alterada, y ciertos tipos de tumores, como el glioma cerebral, afectan a la

permeabilidad de la barrera hematoencefálica dado que esta se daña, y hay un efecto mejorado de retención y permeabilidad para nanopartículas en los alrededores del glioma (Ju et al, 2016), no sin haber pasado la BHE antes que aunque dañada, sigue ejerciendo un papel selectivo según su estado degenerativo.

Además, el tamaño de partícula afecta también significativamente la absorción celular y tisular, las células endoteliales de la BHE no son una excepción. El mecanismo principal implicado en la transcitosis, es la absorción de las nanopartículas por endocitosis, que consiste en la producción de vesículas endocíticas, generadas a partir de las invaginaciones de la membrana plasmática, que permiten la incorporación de sustancias extracelulares en las células. Es un proceso complejo que involucra muchos componentes como receptores y diferentes vías de señalización. Hay dos rutas principales para la endocitosis:

- Endocitosis mediada por clatrina, que tiene lugar en áreas enriquecidas con clatrina de la membrana celular, formando vesículas endocíticas de hasta 200 nm de diámetro.
- Endocitosis mediada por caveolina, que tiene lugar en balsas lipídicas donde se producen invaginaciones de la membrana plasmática de aproximadamente 80 nm de tamaño.

La interacción de los diferentes tipos de nanopartículas con estos dos mecanismos endocíticos juega un papel relevante en la capacidad final de una nanopartícula dada para cruzar con éxito la BHE. Como se indicó anteriormente, la vía final de entrada de nanopartículas en las células endoteliales por transcitosis se determina mediante el paso inicial de endocitosis. Las nanopartículas con un tamaño inferior a 200 nm (el tamaño límite estimado para que una nanopartícula sufra endocitosis a través de un mecanismo mediado por clatrina) tienen más posibilidades de cruzar eficientemente la BHE (Ceña y Játiva, 2018). Por lo tanto, se estima que las nanopartículas de tamaño 100-200 nm adquieren las mejores propiedades para la prolongación del tiempo de circulación sanguínea, y también para la absorción celular y paso a través de la BHE.

En cuanto a la morfología de las nanopartículas, es también un factor determinante a la hora de discernir la interacción de las nanopartículas con los componentes y estructuras biológicas. La forma esférica es la más utilizada, por tres razones, es la forma que aparece naturalmente en los métodos de preparación de nanopartículas, tienen un relación superficie-volumen muy alta, y se ha publicado que las nanopartículas con formas no esféricas se acumulan en órganos como el hígado o el bazo, donde se eliminarán.

Propiedades de superficie. Las propiedades de superficie de las nanopartículas son un factor determinante tanto para el tiempo de retención y eliminación de estas, como para la biodistribución final *in vivo*, dado que es tanto el escudo, como la primera línea de interacción

con el organismo. Lo deseable es una cubierta de un material hidrófilo, a fin de disminuir las posibles interacciones con el sistema inmune, en este sentido el componente de recubrimiento ya sea unido covalentemente o adsorbido más utilizado es el polietilenglicol (PEG), debido a que proporciona una combinación muy atractiva de propiedades, tales como excelente solubilidad en soluciones acuosas, alta flexibilidad de sus cadenas poliméricas, baja toxicidad, inmunogenicidad y antigenicidad. La PEGilación implica el injerto de PEG en la superficie de las nanopartículas, en donde las unidades de etilenglicol forman asociaciones estrechas con las moléculas de agua, lo que resulta en la formación de una capa hidratada. Esta capa hidratada a su vez dificulta la adsorción de proteínas y la eliminación posterior por parte del sistema retículo-endotelial (RES).

Se han intentado efectos de protección similares con diferentes compuestos como: alcohol polivinílico (PVA), poliaminoácidos, poloxamer, y polisacáridos como el quitosano, un ejemplo a destacar en los recubrimientos. El efecto positivo del quitosano sobre la liberación de fármacos a través de los epitelios se debe a una combinación de sus propiedades mucoadhesivas y a su capacidad para abrir las uniones estrechas entre células epiteliales, facilitando así el transporte de fármacos, sobre todo fármacos macromoleculares, a través del epitelio (Expósito-Harris, 2010). Es esta última característica como promotor de la absorción la que hace interesante su adsorción en la superficie de las nanopartículas, dado que, aumenta la permeabilidad del epitelio al abrir estas uniones estrechas, por lo que el quitosano se podría utilizar en lugar del PEG para cruzar la BHE, aunque a día de hoy el PEG sigue siendo el recubrimiento más usado.

La carga superficial, influye en la interacción de las nanopartículas con las estructuras biológicas, es un punto clave a tener en cuenta a la hora de diseñar nanopartículas destinadas a tratar enfermedades neurológicas. Como las células endoteliales de la BHE son aniónicas, las nanopartículas catiónicas la penetrarán de manera más eficiente, aunque la carga catiónica no es un requisito para penetrar la BHE, y cuanto menor sea la carga superficial (en valor absoluto), menor será la activación de la sistema inmunitario. En contraste, las superficies cargadas negativamente, aunque no están específicamente definidas como apropiadas para cruzar el BHE, también podrían considerarse al diseñar nanopartículas para enfermedades neurológicas, ya que son ventajosas en términos de evitar la interacción de las nanopartículas con los componentes sanguíneos, prolongando así su vida media en la sangre. Por lo tanto, se debe realizar una evaluación precisa de la carga superficial para cada sistema (Fornaguera y Solans, 2016).

Finalmente, otro factor importante cuando se estudia la superficie de las nanopartículas es la presencia de elementos directores, es decir, nanopartículas con ligandos unidos a la superficie tales como péptidos de penetración celular, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas (que además pueden tener una unión mejorada con los receptores o componentes celulares específicos del cerebro) que permiten que las nanopartículas viajen desde la sangre al tejido objetivo por transcitosis endotelial o se mantengan en los microvasos del tejido objetivo. De todos los sistemas de transporte endógeno, el transporte mediado por receptor (RMT) es la estrategia más atractiva, teniendo en cuenta que en la BHE tenemos ciertos RMT sobreexpresados, por la propia naturaleza metabólica del cerebro, entre los que encontramos a los receptores de insulina, leptina, factor de crecimiento similar a la insulina, transferrina y lipoproteína de baja densidad (LDL). De los cuales los más estudiados y prometedores a la hora de dirigir nanopartículas al cerebro son los ligandos de receptores de insulina o transferrina. Algunos ejemplos de fármacos administrados empleando nanopartículas conjugadas con transferrina incluyen paclitaxel y daunorubicina como agentes terapéuticos contra el cáncer, y diclorhidrato de quinina y artemisinina como medicamentos contra la malaria (Gan y Feng, 2010). Para cualquier nanopartícula individual, los elementos directores utilizados deben estudiarse cuidadosamente, ya que la eficacia de este direccionamiento puede variar.

Además de estas características cruciales a la hora de atravesar la BHE, hay que prestar atención también a otros factores como la estabilidad coloidal y que nuestro nanosistema sea estable tanto en su preparación como para su administración al organismo, y como se mencionó previamente en esta revisión, deben ser rápidamente biodegradables, no más de unas horas o días, al fin de evitar posibles daños o acumulación en el SNC.

4.5. Vías de administración

Sobre las vías de administración de nanopartículas, podemos deducir que existen cuatro posibles vías para llevar nuestros nanosistemas al cerebro, aunque en la práctica lo podemos reducir a dos grandes vías que son la intravenosa y vía intranasal, como las más mejores. Sobre las otras dos posibles vías tenemos la intracraneal y la administración oral, ambas con grandes inconvenientes que imposibilitan su uso clínico. Sobre la vía intracraneal, podemos decir que la mayor ventaja que tiene es que evita la BHE, haciendo la formulación de estas nanopartículas algo más fácil al no tener que añadir polímeros de protección o ligandos específicos. Sin embargo, las desventajas son más numerosas: las nanopartículas permanecen en el sitio de inyección, sin capacidad de diseminarse dentro del cerebro, lo que reduce el posible efecto terapéutico, y lo más importante, estos procedimientos requieren un procedimiento quirúrgico

muy invasivo y agresivo, que no es agradable para el paciente. La única aplicación de la vía intracraneal consiste en la aplicación directa de nanopartículas durante la extirpación de un tumor, por ejemplo, aprovechando la exposición del tejido diana. Sin embargo, esto apenas se ha realizado debido a las desventajas mencionadas anteriormente (Fornaguera y Solans, 2016).

La administración oral, aunque se antoje la administración más preferible al ser la vía más natural y menos invasiva, tiene grandes problemas que resolver debido a la gran complejidad que atañe producir una nanopartícula que no solo soporte las enzimas digestivas y la gran variabilidad de pH que hay dentro del tubo digestivo y tenga una buena absorción en el intestino, si no, además debe de estar diseñada para poder atravesar la BHE y llegar a una concentración adecuada al cerebro sin provocar toxicidad. Estas características hacen difícil la formulación de estos nanosistemas por vía oral, al menos en el corto plazo. Sin contar las posibles y múltiples interacciones con los alimentos o distintos fármacos concomitantes. Aunque la administración oral sea la vía ideal y a la que en un futuro se debe aspirar, no es la prioritaria en la investigación clínica debido a estos inconvenientes y su comercialización muy lejana.

Vía intranasal. La vía intranasal es una prometedora vía de administración por su principal ventaja, que es la evasión de la barrera hematoencefálica, a través del neuroepitelio olfatorio, ubicado en la cavidad nasal, que es la única porción del SNC expuesta externamente. Nuevas técnicas de espectroscopía y microscopía han demostrado que las nanopartículas (> 20 nm) pueden cruzar las células epiteliales por vías transcelulares (transporte desde la membrana apical a la membrana basolateral). El tamaño nanométrico de las nanopartículas permite potencialmente su transporte a través de las neuronas olfativas hasta el cerebro a través de las diversas vías endocíticas de las células sustentaculares o neuronales en la membrana olfatoria. El destino de las nanopartículas en la vía endocítica está relacionado con su tamaño y características de superficie, que son factores potencialmente útiles para mejorar su captación celular en las células epiteliales olfativas. Su principal desventaja es que la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas para ser transportados directamente desde la nariz al cerebro después de la administración intranasal es muy baja (normalmente menos del 0.1%) (Tosi et al, 2013).

Podemos citar, un estudio que usó nanopartículas de quitosano sin ninguna modificación de superficie, para administrar estradiol por vía intranasal y vía intravenosa, con unos resultados que mostraron que la vía intranasal alcanzó una mayor concentración y un menor tiempo de llegada al cerebro con respecto a la vía intravenosa (Wang et al, 2008).

Vía intravenosa. Esta vía de administración es la que más se ha estudiado, la más adecuada y la más prometedora a la hora de administrar nanopartículas al cerebro, tiene una serie de ventajas como son una máxima reproducibilidad, la ausencia de barreras biológicas (a excepción de la barrera hematoencefálica), y un control rápido y directo sobre la concentración del fármaco en el organismo.

Las principales desventajas de la inyección intravenosa también se comparten con todas las otras vías de administración. Es la interacción con los componentes sanguíneos, como los macrófagos, y las vías del sistema retículo endotelial que pueden opsonizar las nanopartículas con la consiguiente absorción y acumulación en el hígado, el bazo o pulmones. Por otra parte, la adsorción de proteínas sanguíneas en las nanopartículas que conducen a una corona proteica específica, pueden dificultar su entrega a los sitios objetivo y pueden cambiar radicalmente su biodistribución, tanto para bien como para mal (Tosi et al, 2013). También deberíamos mencionar, la dificultad que supone la utilización de esta vía para un uso diario y continuado, tanto por los daños a los vasos sanguíneos, como por la necesidad de administración por personal sanitario.

4.6 Aplicaciones actuales

Las nanopartículas se han usado en múltiples modelos de enfermedades neurológicas en animales e incluso algunas han llegado a las primeras etapas de estudios en fase clínica.

4.6.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, la característica común de estas enfermedades es que cursan con un proceso crónico de pérdida neuronal y muerte celular. Las causas exactas que causan dichas enfermedades aún se desconocen, pero parece que hay un fuerte componente genético y una fuerte relación con el envejecimiento.

Enfermedad de Alzheimer. Se considera la enfermedad neurodegenerativa más común, casi el 1% de la población entre las edades de 50 a 70 años padece la enfermedad de Alzheimer, y el porcentaje afectado aumenta hasta el 50% después de los 70 años. Actualmente, no existe una cura disponible para tratar la enfermedad de Alzheimer, y las intervenciones terapéuticas están dirigidas a controlar los efectos degenerativos. La mayoría de los medicamentos disponibles actualmente son inhibidores de la acetilcolinesterasa, que retrasan la descomposición de la acetilcolina en las etapas iniciales de la enfermedad. Los síntomas clínicos primarios detectados incluyen demencia, junto con dificultades de aprendizaje y cognición, las etapas posteriores de la enfermedad están acompañadas por un aumento de la irritabilidad, la

confusión y los cambios de comportamiento. Una característica particular observada en el cerebro del paciente con enfermedad de Alzheimer es la presencia de un patrón único de placas de beta-amiloide y nudos neurofibrilares, como resultado de un metabolismo alterado de la proteína precursora amiloide, es la agregación de estas placas la responsable del daño neuronal. El futuro del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer radica en centrarse en prevenir la formación de placa beta-amiloide o promover su eliminación. Las nanopartículas se centran en la vehiculización de los 3 tipos de fármacos con uso clínico, que son los inhibidores de la acetilcolinesterasa, solubilizadores de la placa amiloide y antioxidantes.

-Inhibidores de la acetilcolinesterasa: inhibidores reversibles como el donepezilo, que se usa actualmente en el tratamiento de la enfermedad, empleándose para su transporte nanopartículas de PLGA recubiertas con polisorbato 80. Los resultados demostraron que se producía una absorción de las nanopartículas en el cerebro, y la farmacocinética reveló una liberación repentina al principio, que fue seguida por una liberación lenta en el cerebro, haciéndola ideal para un futuro tratamiento (Bhavna et al, 2014). En otro estudio en el que se emplearon ratones, se utilizó tacrina, que fue el primer inhibidor de la acetilcolinesterasa de acción central aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en nanopartículas de poli(*n*-butil cianoacrilato) recubiertas de polisorbato 80. Se encontró que este sistema producía un aumento en la captación del fármaco 4 veces superior en comparación con el fármaco libre (Wilson et al, 2008) (Figura 7).

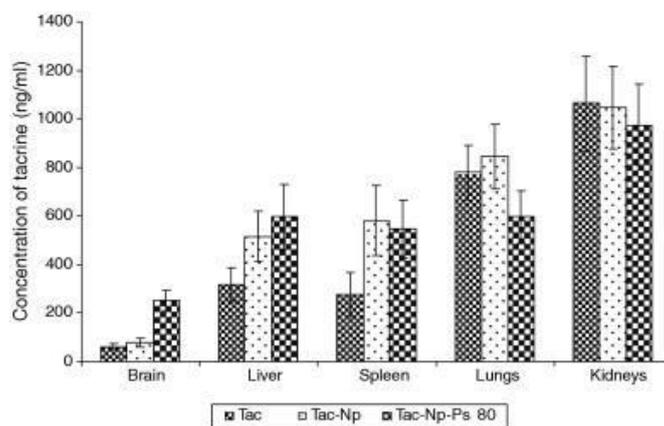


Figura 7. Concentraciones de tacrina en diferentes órganos después de la inyección intravenosa de formulaciones de nanopartículas de poli(*n*-butil cianoacrilato). Tac (solución tacrina); Tac-Np(tacrina-nanopartículas); Tac-Np + Ps80 (tacrina-nanopartículas recubiertas con 1% de Ps 80) (Wilson et al, 2008)

-Antioxidantes: Hay indicios que parecen apuntar a que el péptido-A β produce ROS (especies reactivas de oxígeno) y que las ROS promueve la producción del péptido-A β , y en la perspectiva de bloquear este proceso se han empleado antioxidantes para obtener una función

neuroprotectora. El ácido ferúlico es de naturaleza antioxidante y antiinflamatoria, los estudios sobre el ácido ferúlico cargados en SLN (*Solid Lipid Nanoparticles*), han indicado que puede prevenir la muerte celular evitando el estrés oxidativo (bloqueando esta cascada) en las neuronas (Picone et al, 2009).

-Solubilizadores de la placa amiloide: En esta revisión ya se han mencionado dos estudios que usan curcumina como principio activo ante la agregación de la placa amiloide. Por un lado, se han utilizado liposomas conjugados en su superficie con curcumina, demostrando tanto *in vitro* como en modelos de rata *in vivo*, un retraso en la agregación y la secreción del péptido-A β . El otro estudio empleó NLC (*nanostructured lipid carriers*) utilizando lactoferrina en su superficie como elemento director y cargados con curcumina. Se comprobó que este sistema era eficaz a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica acumulándose en el cerebro, y por tanto, mejorando los daños patológicos causados por el péptido-A β tanto *in vitro* como en modelos de rata *in vivo*.

Enfermedad de Parkinson. Otro trastorno cerebral neurodegenerativo importante que afecta a una gran parte de la población es la enfermedad de Parkinson, que afecta al 1% de la población de 65 años o más. Patológicamente, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra causa la enfermedad de Parkinson. Los principales síntomas de la enfermedad son causados por esta deficiencia dopaminérgica en el cuerpo estriado e incluyen temblores, hipocinesia, disminución del equilibrio y rigidez del cuerpo. El agente principal de la enfermedad de Parkinson es la presencia de inclusiones eosinofílicas intracelulares llamadas cuerpos de Lewy, que son agregados de proteínas anormales. Los cambios en el SNC asociados con la enfermedad de Parkinson incluyen agregación de proteínas, neuroinflamación, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y daños a la integridad de la barrera hematoencefálica. Actualmente, sólo existen terapias que tratan los síntomas, facilitando el aumento del período de acción de la dopamina y/o reflejando las acciones dopaminérgicas. Principalmente el uso que se hace de los nanoportadores, es para la prolongación del efecto y la mejora de la llegada, generalmente de la levodopa, al cerebro. Haciendo que haya un efecto más prolongado y más focalizado de la dopamina, asemejándose más a las condiciones previas a la patología, disminuyendo también la concentración total en el organismo que generalmente causa efectos secundarios. También se usan para entregar factores neuroprotectores para prevenir la neurodegeneración.

Se han usado liposomas furtivos (modificados en la superficie con polietilenglicol) y dirigidos con clorotoxina (CITx), un péptido que se une específicamente a los gliomas cerebrales y a las células endoteliales vasculares en proliferación, para la mejora de la administración de la levodopa. La modificación con la clorotoxina facilitó en gran medida la absorción de liposomas

por las células endoteliales microvasculares cerebrales *in vitro*. Después de la inyección intraperitoneal a ratones, los liposomas furtivos modificados cargados con levodopa, aumentaron significativamente la distribución de dopamina y ácido dihidroxifenilacético (metabolito de la levodopa), en la sustancia nigra y estriada. Estos liposomas cargado con levodopa atenuaron significativamente los trastornos conductuales graves, y disminuyó la pérdida de neuronas dopaminérgicas positivas para tirosina hidroxilasa. (Xiang et al, 2012).

También se han empleado nanopartículas de quitosano con dopamina adsorbida en la superficie, administradas por vía intraperitoneal con el fin de aumentar su concentración en la vía nigroestriada. Se observó cómo estas nanopartículas de quitosano liberaban la dopamina de manera rápida y pulsante a la vez que prolongada, con un pico máximo a los 80 min y su desaparición a los 120 min. Demostrándose que este sistema era efectivo a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica y entregar el neurotransmisor (Trapani et al, 2011) (Figura 8).

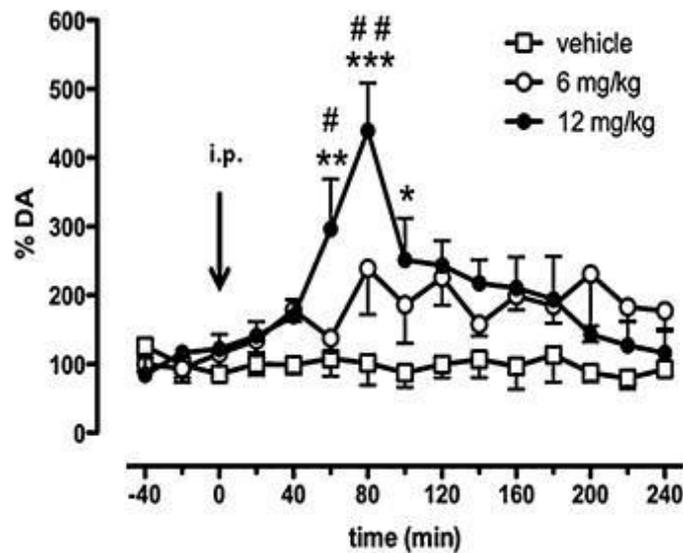


Figura 8. Efecto de inyecciones únicas (6–12 mg / kg, i.p.) de DA/CSNP(5) sobre la dopamina durante 4h en el cuerpo estriado de ratas despiertas (Trapani et al, 2011)

Así mismo, se ha utilizado una formulación nanomicelar soluble en agua de coenzima Q10, un conocido antioxidante, para tratar la enfermedad de Parkinson inducida por MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) en ratas. Este sistema se demostró eficaz a la hora de detener la neurodegeneración, pero no fue capaz de revertirla (Sikorska et al, 2014). Estas nanomicelas podrían usarse no solo como un agente profiláctico de la enfermedad, sino también como un coadyuvante de otros fármacos que se puedan transportar en su interior o en su superficie.

4.6.2. Tumores Neurológicos

Los tumores cerebrales se dividen en dos grupos: primarios, que se origina y reside en el cerebro, y secundarios (metastásicos), que se originan en un cáncer primario fuera del sistema nervioso central y posteriormente se extiende al cerebro. Los tumores metastásicos son más frecuentes que los tumores primarios en pacientes adultos mientras los primarios son los tumores sólidos más frecuentes en la infancia. Los tumores cerebrales más frecuentes en todos los grupos de edad son los tumores que se originan en las células gliales (gliomas), que representan un amplio espectro de tumores que van desde tumores con un crecimiento lento hasta tumores altamente agresivos.

A lo largo de esta revisión hemos mencionado varios estudios que utilizan las nanopartículas para la vehiculización de quimioterápicos, como el docetaxel por SLN (*solid lipid nanoparticles*) dirigidos en su superficie por lactoferrina, o por micelas poliméricas con propilenglicol (PEG) en su superficie y dirigidos por *p*-HA (ácido *p*-hidroxibenzoico), o incluso docetaxel junto a ketoconazol en SLN dirigidas con ácido fólico, también el paclitaxel se vehiculizó en nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)) dirigidas con glutatión, y la epirrubicina (junto a un inhibidor selectivo de la COX-2 como el celecoxib) en liposomas dirigidos con el péptido PTD_{HIV-1}.

Además, hay varias nanopartículas que han conseguido pasar a las fases iniciales de los estudios clínicos, actualmente para el glioblastoma, hay 10 nanomateriales que se están investigando para su posible uso (Tabla 1). Los datos se obtuvieron mediante la búsqueda en el registro de ensayos clínicos <https://clinicaltrials.gov/> y, con las palabras clave "micelle", "nanoparticle", "liposome", "nanomedicine(s)" en la fecha del 23 de abril de 2019 (Zottel et al, 2019).

Disease	Agent	Clinical Trial Number	Phase
Recurrent high grade glioma Newly diagnosed glioblastoma	ABI-009 (Nab-Rapamycin)	NCT03463265	II
Recurrent high grade glioma	NL CPT-11 (Nanoliposomal CPT-11)	NCT00734682	I completed
Recurrent high grade glioma	Ferumoxytol	NCT00769093	I
Glioblastoma	9-ING-41	NCT03678883	I/II
Recurrent high grade glioma	Liposomal irinotecan	NCT02022644	I
Recurrent malignant glioma or solid tumors and brain metastases	2B3-101	NCT01386580	I/II
Children and adolescents with refractory or relapsed malignant glioma	Myocet	NCT02861222	I
Glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma	Doxorubicin	NCT02758366	II
Recurrent glioblastoma or gliosarcoma	NU-0129	NCT03020017	I
Recurrent glioblastoma	SGT-53	NCT02340156	II
Recurrent glioblastoma	RNL (rhenium nanoliposomes)	NCT01906385	I

Tabla 1. Lista de ensayos clínicos de glioblastoma basados en el uso de nanomateriales (Zottel et al, 2019)

4.6.3. Enfermedades neuroinflamatorias y otras enfermedades

La enfermedad neuroinflamatoria autoinmune más común es la esclerosis múltiple una enfermedad del cerebro y la médula espinal en el que el sistema inmunitario ataca la vaina protectora (mielina) que recubre las fibras nerviosas, y causa problemas de comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo. Es una enfermedad degenerativa, sin cura y que con el tiempo, puede causar el deterioro o daño permanente de los nervios pudiendo provocar discapacidad. El tratamiento de la esclerosis múltiple debería tener como objetivo tratar la respuesta inmune y tener un papel neuroprotector y neuroregenerador.

Algunos estudios han usado liposomas a la hora de vehicular fármacos o péptidos para tratar la esclerosis múltiple, por ejemplo liposomas cargados con un derivado de glucocorticoide, en donde el derivado de glucocorticoide es un profármaco que es convertido a glucocorticoide activo en los fluidos corporales. El efecto terapéutico de esta composición farmacéutica se comprobó *in vivo* con modelos apropiados de esclerosis múltiple y cáncer (Barenholz et al, 2015). Otra composición para el tratamiento de la esclerosis múltiple emplea al primer péptido de la proteína básica de mielina (MBP, *myelin basic protein*), donde estos péptidos se encapsulan en liposomas manosilados (liposomas modificados con manosa). Estas proteínas actúan como epítomos principales de células B en pacientes que padecen esclerosis múltiple. Se descubrió que la administración de formulaciones liposomales que comprenden estos péptidos a modelos de esclerosis múltiple en roedores dio como resultado un suministro

mejorado de estos péptidos a las células inmunes, por lo tanto, una reducción estadísticamente significativa de la parálisis (Gabivov et al, 2013).

Otras enfermedades neurológicas en las cuales también se ha hecho uso de las nanopartículas son por ejemplo, en la esquizofrenia donde se utilizó SLN (*solid lipid nanoparticles*) para vehiculizar clozapina mejorando tanto su tiempo de circulación como su concentración en sangre y en el cerebro (Manjunath y Venkateswarlu, 2005), en la epilepsia donde se usó nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)) recubiertas en la superficie con poloxamer-188 y cargadas con carbamacepina produciendo un alto efecto anticonvulsivo, y mostrando una eficacia a un 1 mg/kg comparable a una concentración de 30 mg/kg de carbamacepina en solución (Zybina et al, 2018). En los accidentes cerebrovasculares se han probado nanopartículas de quitosano dirigidas con transferrina y cargadas con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) o con inhibidor del péptido caspasa-3 (z-DEVD-FMK), mostrando una reducción de la pérdida de sangre después de una oclusión de la arteria de 2h en el locus cerebral medio (Yemisci et al, 2014).

4.7. Relación riesgo/beneficio del uso de nanomedicinas

La nanotoxicología es una disciplina muy reciente, que ha empezado a tomar interés especialmente debido a las crecientes aplicaciones de nanomateriales en la industria de la biomedicina, biotecnología y medio ambiente. Pero aún hace falta un mayor número de estudios, dado que, a pesar de que hay numerosos estudios clínicos que usan nanopartículas en diagnóstico o terapias de enfermedades cerebrales, el número de estudios que investigan el potencial neurotóxico de estas nanopartículas es muy limitado, faltando además una estandarización de dichos estudios. Vamos a centrarnos en los posibles efectos neurotóxicos de los nanosistemas que hemos expuesto en este trabajo de fin de grado, que aunque especialmente diseñados para no ser tóxicos, no están exentos de efectos adversos.

Las desventajas de las nanopartículas poliméricas implican la agregación y una potencial toxicidad asociada con los procesos de degradación y sus materiales residuales. Un estudio se centró en la evaluación de neurotoxicidad *in vivo* de nanopartículas de quitosano modificado con polisorbato 80 después de la inyección intravenosa en ratas. Los resultados mostraron una acumulación dependiente de la dosis de las nanopartículas en la corteza frontal y el cerebelo, con apoptosis neuronal, leve respuesta inflamatoria, aumento de estrés oxidativo y pérdida de peso corporal. Además, se han evaluado efectos neurotóxicos después de la exposición a nanopartículas de poli(butil cianoacrilato) como sistemas de administración de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Aunque los resultados *in vitro* mostraron un aumento en

la muerte celular asociada con una alta dosis de nanopartículas, la inyección de la misma dosis en ratas no produjo ninguna muerte neuronal. Con respecto a los liposomas tenemos un estudio que informó de la evaluación *in vivo* de la eficacia de la terapia anticancerígena de liposomas cargados con cisplatino y los efectos neurotóxicos asociados a los liposomas libres de fármacos. Con respecto a la neurotoxicidad, la administración de los liposomas sin fármaco indujo cambios neuropatológicos de mínimos a severos en las ratas de control, específicamente neuroinflamación y necrosis (Teleanu et al, 2019). Los SLN y NLC debido a su baja solubilidad tienen pocos efectos tóxicos, aunque sí se han publicado un aumento de la peroxidación lipídica (y por tanto un aumento del estrés oxidativo), una disminución de enzimas como la GR (glutación reductasa) y la GPx (glutación peroxidasa) y un fuerte aumento de la GST (glutación S-transferasa), junto con un inducción de la respuesta inmune aumentando el número de leucocitos totales, principalmente células mononucleares. Aunque en ensayos *in vivo* no se ha publicado ninguna muerte, ni ningún cambio de peso en los órganos (incluido el cerebro), concluyendo que no induce toxicidad, contrariamente a los efectos observados *in vitro* (Winter et al, 2016).

La asociación de nanopartículas orgánicas junto con fármacos muy tóxicos, fármacos con poca o nula capacidad para pasar la barrera hematoencefálica, o fármacos con muy baja vida media en sangre, son un sistema de administración muy prometedor para las enfermedades neurológicas, dado que, mejoran mucho los perfiles y los efectos tóxicos tan problemáticos de estos fármacos. Aunque estos nanosistemas puedan tener efectos tóxicos *per se* en el cerebro, muchas veces estos efectos son reversibles, leves o no se manifiestan *in vivo*, haciendo que la asociación con fármacos con una clínica compleja pueda ser beneficiosa; no por tanto, deja de ser prioritario la reducción o supresión de estos potenciales efectos tóxicos, y el estudio más en profundidad de estos nanosistemas en el ámbito toxicológico sobretodo en el largo plazo.

5. CONCLUSIONES

- Las nanopartículas son un área de investigación reciente y en una continua evolución, con un gran potencial aplicable a muchas áreas de la sociedad donde cabe destacar la nanomedicina, como una alternativa a los tratamientos convencionales.
- Las distintas nanopartículas y sus respectivos métodos de preparación, deben seguir desarrollándose con el objetivo de optimizar tanto sus parámetros de estabilidad como los posibles efectos adversos intrínsecos de los nanosistemas.
- Las nanopartículas como sistemas transportadores de fármacos al cerebro se han posicionado como un sistema prometedor en las nuevas líneas de investigación médica. Diversos estudios, *in vivo* e *in vitro*, ponen de manifiesto su capacidad a la hora de pasar

la BHE y entregar el fármaco en el tejido diana. Aún son necesarios muchos más estudios en fase clínica para poder aclarar el potencial real de estos nanosistemas.

- No se conoce con exactitud los posibles riesgos que pueden tener estas nanopartículas sobretodo en el largo plazo bajo una administración repetida. Se deben realizar muchos más estudios en este ámbito, y las autoridades administrativas deberán de legislar para asegurar el uso seguro y responsable de estos nanomateriales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8: 102.
- Antimisiaris S, Mourtas S, Papadia K. Chapter 7 Brain targeting with lipidic nanocarriers. En: Grumezescu AM, editor. *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications.* 1ª edición. Países bajos. Elsevier; 2018. p. 255-324.
- Barenholz Y, Gabizon AA, Avnir Y. Liposomal compositions of glucocorticoid and glucocorticoid derivatives. USA; US8932627B2, 2015.
- Beloqui A, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine.* 2016; 12(1): 143–161.
- Bhavna MS, Ali M, Baboota S, Sahni JK, Bhatnagar A, Ali J. Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting, *Drug Dev Ind Pharm.* 2014; 40(2): 278–287.
- Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9): 941-951.
- Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, Clancy SF, Lafranconi M, West J, Gordon SC. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2015; 73(1): 137-150.
- Ceña V, Játiva. Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine (Lond).* 2018; 13(13): 1513–1516.

- Cerna T, Stiborova M, Adam V, Kizek R, Eckschlager T. Nanocarrier drugs in the treatment of brain tumors. *J Cancer Metastasis Treat.* 2016; 2: 407-416.
- Craparo EF, Bondì ML, Pitarresi G, Cavallaro G. Nanoparticulate Systems for Drug Delivery and Targeting to the Central Nervous System. *CNS Neurosci Ther.* 2011; 17: 670–677.
- de Araújo Lopes S C, dos Santos Giuberti C, Rocha TGR, dos Santos Ferreira D, Leite EA, Oliveira MC. Chapter 4: Liposomes as carriers of anticancer drugs. En: Rangel L, editor. *Cancer treatment conventional and innovative approaches.* 1ª ed. Reino Unido: IntechOpen: 2013. p. 85-124.
- Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, Nadagouda MN, Aminabhavi TM. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm.* 2017; 532(1): 249-268.
- Expósito-Harris R, Heras-Caballero AG (dir), Acosta-Contreras FN (dir). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. [Tesis doctoral en Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2010 [citado 29 de abril de 2020]. Recuperado a partir de: <https://eprints.ucm.es/11160/>
- Fornaguera C, Solans C. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery in Neurological Diseases. *Curr Pathobiol Rep.* 2016; 4: 189-197.
- Gang CW, Feng SS. Transferrin-conjugated nanoparticles of Poly(lactide)-D-a-Tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomaterials.* 2010; 31(30): 7748-7757.
- Gabivov A, Belogurov A, Ponomarenko N, Smirnov I, Bacon A, Gregoriadis G. Liposomes containing oligopeptide fragments of myelin basic protein, a pharmaceutical composition and a method for treatment of multiple sclerosis. USA; US20130058994A1, 2013.
- Geldenhuys W, Mbimba T, Bui T, Harrison K, Sutariya V. Brain-targeted delivery of paclitaxel using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *J Drug Target.* 2011; 19: 837–845.
- Gomes MJ, Mendes B, Martins S, Sarmiento B. Chapter 36: Nanoparticle Functionalization for Brain Targeting Drug Delivery and Diagnostic. En: Aliofkhazraei M, editor. *Handbook of Nanoparticles.* 1ª ed. Alemania: Springer: 2016. p. 941-959.
- ISO (Organisation Internationale de Normalisation). ISO/TR 18401:2017(en). 2017 [en línea]. [Consultado en abril 2020]. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en>

- Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Alain Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018; 9: 1050–1074.
- Ju RJ, Zeng F, Liu L, Mu LM, Xie HJ, Zhao Y, Yan Y, Wu JS, Hu YJ, Lu WL. Destruction of vasculogenic mimicry channels by targeting epirubicin plus celecoxib liposomes in treatment of brain glioma. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 1131-1146.
- Kang N, Perron ME, Prud'homme RE, Zhang Y, Gaucher G, Leroux JC. Stereocomplex Block Copolymer Micelles: Core–Shell Nanostructures with Enhanced Stability. *Nano Lett.* 2005; 5: 315-319.
- Kataoka, K, Harada, A, Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 47: 113–131.
- Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA, Passage of peptides through the blood–brain barrier with colloidal polymer particles(nanoparticles). *Brain Res.* 1995; 674: 171–174.
- Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 71: 2-14.
- Krůpa P, Řehák S, Diaz-Garcia D, Filip S. Nanotechnology - new trends in the treatment of brain tumors. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2014; 57(4): 142–150.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 75: 1-18.
- Lazar AN, Mourtas S, Youssef I, Parizot C, Dauphin A, Delatour B, Antimisiaris SG, Duyckaerts C. Curcumin-conjugated nanoliposomes with high affinity for A β deposits: Possible applications to Alzheimer disease. *Nanomedicine.* 2013; 9: 712-721.
- Liu L, Venkatraman S, Yang YY, Guo K, Lu J, He B, Mochhala S, Kan L. Polymeric Micelles Anchored With TAT for Antibiotic Delivery. *Biopolymers.* 2008; 90(5): 617-623.
- Manjunath K, Venkateswarlu V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release.* 2005; 107: 215–228.
- Meng F, Asghar S, Gao S, Su Z, Song J, Huo M, Meng W, Ping Q, Xiao Y. A novel LDL-mimic nanocarrier for the targeted delivery of curcumin into the brain to treat Alzheimer's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 134: 88-97.

- Müller RH, Keck CM. Pharmaceutical nanoparticles—From their innovative origin to their future. *Int J Pharm.* 2010; 390: 1–2.
- Nagavarma BVN, Yadav HKS, Ayaz A, Vasudha LS, Shivakimar HG. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012; 5(3): 16-23.
- Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(3): 305-313.
- Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Giralt E, Teixidó M. Blood–brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev.* 2016; 45(17): 4690-4707.
- Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64: 701-705.
- Picone P, Bondi ML, Montana G, Bruno A, Pitarresi G, Giammona G, Di Carlo M. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by A β oligomers: Improved delivery by solid lipid nanoparticles. *Free Radical Res.* 2009; 43(11): 1133–1145.
- Prokop A, Davidson JM. Nanovehicular intracellular delivery systems. *J Pharm Sci.* 2008; 97(9): 3518–3590.
- Ramalho MJ, Pereira MC. Preparation and Characterization of Polymeric Nanoparticles: An Interdisciplinary Experiment. *Journal of Chemical Education.* 2016; 93(8): 1446-1451.
- Shapira I, Budman DR, Bradley T, Gralla R. Evolving lipid-based delivery systems in the management of neoplastic disease. *Oncol Rev.* 2009; 3: 113–124.
- Sikorska M, Lanthier P, Miller H, Beyers M, Sodja C, Zurakowski B, Gangaraju S, Pandey S, Sandhu JK. Nanomicellar formulation of coenzyme Q10 (Ubisol-Q10) effectively blocks ongoing neurodegeneration in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model: potential use as an adjuvant treatment in Parkinson’s disease. *Neurobiol Aging.* 2014; 35: 2329-2346.
- Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol.* 2004; 61: 216-220.
- Singh I, Swami R, Pooja D, Jeengar MK, Khan W, Sistla R. Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *J Drug Target.* 2016; 24(3): 212–223.

- Tanaka H, Sato N, Matsuyama T. Conformational Transition of the Core Chain in Radiation-Modified Polysilane Micelles Formed in Selective Solvents. *Langmuir*. 2005; 21(17): 7696-7701.
- Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu RI. Neurotoxicity of Nanomaterials: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials*. 2019; 9(1): 96.
- Tosi G, Ruozi B, Vandelli MA. Brain targeting with polymeric nanoparticles: which administration route should we take?. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8(9): 1361-1363.
- Trapani A, De giglio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, Cassano T, Gaetani S, Cuomo V, Trapani G. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int J Pharm*. 2011; 419: 296–307.
- Tsai MJ, Wu PC, Huang YB, Chang JS, Lin CL, Tsai YH, Fang JY. Baicalein loaded in tocol nanostructured lipid carriers (tocol NLCs) for enhanced stability and brain targeting. *Int J Pharm*. 2012; 423: 461-470.
- Urrejola MC, Soto LV, Zumarán CC, Peñaloza JP, Álvarez B, Fuentesvilla I, Haidar ZS. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de auto-ensamblaje capa por capa (layer-by-layer self-assembly). *Int J Morphol*. 2018; 36(4): 1463-1471.
- Venishetty VK, Komuravelli R, Kuncha M, Sistla R, Diwan PV. Increased brain uptake of docetaxel and ketoconazole loaded folate-grafted solid lipid nanoparticles. *Nanomedicine*. 2013; 9(1): 111-121.
- Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 70: 735–740.
- Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(nbutylcyanoacrylate) nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 70(1): 75–84.
- Winter E, Dal Pizzol C, Locatelli C, Crezkynski-Pasa TB. Development and Evaluation of Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Study of Toxicity In Vitro and In Vivo. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016; 16(2): 1321-1330.
- Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release*. 2012; 161: 264-273.

- Xiang Y, Wu Q, Liang L, Wang X, Wang J, Zhang X, Pu X, Zhang Q. Chlorotoxin-modified stealth liposomes encapsulating levodopa for the targeting delivery against the Parkinson's disease in the MPTP-induced mice model. *J Drug Target.* 2012; 20(1): 67-75.
- Yemisci M, Caban S, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Novoa-Carballal R, Riguera R, Fernandez-Megia E, Andrieux K, Couvreur P, Capan Y, Dalkara T. Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014; 35: 469–475.
- Zhang Z, Wei X, Zhang X, Lu W. p-Hydroxybenzoic acid (p-HA) modified polymeric micelles for brain-targeted docetaxel delivery. *Chin Sci Bull.* 2013; 58(21): 2651-2656.
- Zottel A, Videtič Paska A, Jovcevska I. Nanotechnology Meets Oncology: Nanomaterials in Brain Cancer Research, Diagnosis and Therapy. *Materials.* 2019; 12: 1588.
- Zybina A, Anshakova A, Malinovskaya J, Melnikov P, Baklaushev V, Chekhonin V, Maksimenko O, Titov S, Balabanyan V, Kreuter J, Gelperina S, Abbasova K. Nanoparticle-based Delivery of Carbamazepine: A Promising Approach for the Treatment of Refractory Epilepsy. *Int J Pharm.* 2018; 547(1-2): 10-23.