



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON SUPERFICIE  
MODIFICADA COMO POTENCIALES TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS A  
TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

LF. OSCAR ESCALONA RAYO

TUTOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CIUDAD DE MÉXICO. JUNIO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE**

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO**

**VOCAL**

**DRA. HELGI HELENE JUNG COOK**

**VOCAL**

**DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**VOCAL**

**DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS**

**SECRETARIO**

**DR. ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA**

**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DEL  
PROYECTO REALIZADO EN LA MAESTRÍA**

**Publicaciones**

Escalona-Rayo O, Fuentes-Vázquez P, Leyva-Gómez G, Cisneros B, Villalobos R, Magaña JJ, Quintanar-Guerrero D. Nanoparticulate strategies for the treatment of polyglutamine diseases by halting the protein aggregation process. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(6):871–88.

**Congresos**

XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Septiembre 2016, Huatulco, México. Modalidad: Cartel. Título: “Preparación y optimización de nanopartículas poliméricas con superficie modificada para la adsorción de fármacos hidrosolubles”.

**Tutor**

Dr. David Quintanar Guerrero.

**Lugar donde se realizó la tesis**

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Universidad Nacional Autónoma de México.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por la formación recibida durante mis estudios.

Al **posgrado de Ciencias Químicas** de la **UNAM** por permitirme ser parte de uno de los mejores programas del país.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca recibida durante la realización de la Maestría. **No. de Becario 576545.**

A los proyectos **PAPIIT-2019143, CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 y PIAPI 001** por el financiamiento otorgado durante la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero** por el apoyo y confianza que me brindó al permitirme realizar este trabajo, por lo cual siento un profundo respeto y a quien considero un ejemplo a seguir.

A los miembros de mi jurado: **Dra. Raquel López Arellano, Dra. Helgi Helene Jung Cook, Dra. Maria Josefa Bernad Bernad, Dr. Fransisco Hernández Luis y Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha** por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A la **M. en C. Samantha Jardón Xicoténcatl** del Laboratorio Biología Celular y Morfología Veterinaria, UNAM-FES Cuautitlán, por su apoyo proporcionado en los estudios relacionados con las líneas celulares.

A la **M. en IQ. Alicia del Real López** por el apoyo proporcionado en los estudios de microscopía electrónica de barrido.

## DEDICATORIAS

Con todo mi cariño y amor dedico este trabajo a mi madre **Elisa Rayo Calderón** y a mi padre **Sergio Escalona Gil** que han sido mi motor y soporte para seguir adelante, los amo y siempre voy a estar agradecido por su apoyo incondicional.

A mis hermanos **Cristian Escalona Rayo** y **Elizabeth Escalona Rayo** quienes siempre han estado orientándome y siguen a mi lado apoyándome en todo lo que necesito, los amo.

A **Paulina Fuentes Vázquez** por su apoyo y cariño incondicional, gracias por todos los momentos y aventuras compartidos, siempre contarás conmigo.

A todos mis **amigos** y **compañeros** del Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica y anexas, gracias por su apoyo y por compartir grandes momentos.

A **Dios** que sin él todo esto no hubiera sido posible.

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
CONTENIDO DE FIGURAS .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO DE REFERENCIA.....	2
2.1. ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	2
2.1.1. Autofagia como una prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central.....	6
2.1.2. Limitaciones de la terapia.....	7
2.2. BARRERAS BIOLÓGICAS CONTRA EL TRATAMIENTO EFECTIVO DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	8
2.2.1. Barrera hematoencefálica (BHE) .....	9
2.2.2. Mecanismos de transporte de agentes terapéuticos hacia el cerebro.....	11
2.3. APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO DE NANOTRANSPORTADORES PARA AGENTES TERAPÉUTICOS HACIA EL CEREBRO 14	
2.3.1. Nanopartículas.....	18
2.3.2. Preparación de nanopartículas poliméricas .....	19
2.3.3. Principales características de las nanopartículas poliméricas .....	19
2.3.4. Limitaciones de las nanopartículas poliméricas.....	21
III. JUSTIFICACIÓN .....	22

IV. HIPÓTESIS.....	23
V. OBJETIVOS.....	24
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	25
6.1. Diagrama de flujo de la metodología experimental. ....	25
6.2. Selección de los materiales .....	26
6.2.1. Fármaco.....	26
6.2.2. Materiales para las nanopartículas .....	27
6.3. Preparación de las nanopartículas .....	27
6.3.1. Preparación de las nanopartículas de PLGA con rapamicina.....	27
6.3.2. Diseño experimental.....	29
6.4. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	31
6.4.1. Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (PDI).....	31
6.4.2. Potencial zeta (PZ) .....	31
6.4.3. Eficiencia de entrapamiento (EE) de Rapamicina en las nanopartículas .....	32
6.4.4. Morfología de las nanopartículas optimizadas .....	32
6.4.5. Evaluación de las interacciones de las nanopartículas optimizadas .....	32
6.5. Estabilidad de las nanopartículas optimizadas .....	33
6.6. Citotoxicidad de las nanopartículas optimizada.....	33
6.6.1. Cultivo celular .....	33
6.6.2. Ensayo de citotoxicidad .....	33
6.6.3. Evaluación del citoesqueleto de actina.....	34



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
7.1. Preparación y optimización de las nanopartículas .....	35
7.1.1. Ajuste y validación del modelo .....	37
7.1.2. Tamaño de partícula (TP).....	40
7.1.3. Índice de polidispersión (PDI) .....	43
7.1.4. Potencial zeta (PZ) .....	45
7.1.5. Eficiencia de entrapamiento (EE) .....	47
7.1.6. Efecto de la purificación y liofilización sobre el TP, PDI y PZ de las nanopartículas....	48
7.1.7. Optimización de las nanopartículas.....	49
7.2. Caracterización de las nanopartículas optimizadas .....	50
7.3. Estabilidad de las nanopartículas .....	54
7.4. Citotoxicidad .....	56
VIII. CONCLUSIONES.....	60
IX. PERSPECTIVAS .....	61
X. REFERENCIAS .....	62
XI. ANEXOS .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de las enfermedades neurodegenerativas. Adaptada de referencias 16-19.....	4
Tabla 2. Agentes terapéuticos y sus limitaciones utilizados para inducir autofagia. ....	7
Tabla 3. Variables codificadas en el DBB para el desarrollo de las nanopartículas. ....	29
Tabla 4. Composición del diseño experimental (DBB). ....	30
Tabla 5. Variables de respuesta observadas en el diseño experimental para las nanopartículas.....	37
Tabla 6. Ajuste de los datos al modelo lineal y cuadrático. ....	38
Tabla 7. Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta en función de los factores estudiados.....	38
Tabla 8. Características fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas. ....	51
Tabla 9. Respuestas analíticas correspondientes a la adecuabilidad del sistema. ....	71
Tabla 10. Coeficientes y límites del intercepto (b) y pendiente (m). ....	71
Tabla 11. Coeficientes de variación y prueba t de student calculadas para evaluar la precisión y exactitud del sistema. ....	72
Tabla 12. Resultados obtenidos para los parámetros de desempeño de la validación.....	73
Tabla 13. Precisión del método de preparación de nanopartículas. ....	74
Tabla 14. Análisis de varianza para las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad. ....	75
Tabla 15. Pruebas de múltiple rangos para el PZ (RAP-PLGA-PVA NPs), TP y EE (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs) por el tiempo de almacenamiento. Método: 95% Tukey HSD. ....	76

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de células gliales y gliomas. Modificada de referencia 12. ...	3
Figura 2. Representación esquemática del proceso de agregación de proteínas en enfermedades neurodegenerativas.....	5
Figura 3. Representación esquemática de las principales barreras que limitan la penetración de fármacos al cerebro. Modificada de referencia 4. ....	9
Figura 4. Representación esquemática de los principales mecanismos de transporte a través del cerebro. Modificada de referencia 4.....	12
Figura 5. Representación esquemática de la morfología de las NPs más comúnmente utilizadas para una terapia eficaz en las enfermedades neurodegenerativas. Modificada de referencia 55. ....	15
Figura 6. Representación esquemática del camino seguido por NPs hacia el cerebro para la entrega exitosa <i>in vivo</i> de agentes terapéuticos en enfermedades poliQ. (A) Una vez dentro de la circulación sistémica, las NPs protegen a los agentes terapéuticos de la degradación y prolongan su tiempo de circulación. Además, deben cruzar varias barreras fisiológicas como BHE. Los mecanismos de transporte BHE mediados por receptores y adsorbentes son los más utilizados por NPs. (B) Las NPs median la entrada celular y permiten el escape endosomal, la liberación del fármaco podría lograrse en el citoplasma, incluso hasta en el núcleo celular. ....	17
Figura 7. Diagrama de flujo experimental para el desarrollo de potenciales nanotransportadores de Rapamicina hacia el SNC.....	25
Figura 8. Estructuras químicas de los componentes utilizados. ....	26
Figura 9. Representación esquemática del método de preparación de las nanopartículas. ....	28
Figura 10. Representación esquemática de los aspectos mecánicos relacionados con la formación de partículas mediante el método de emulsificación-difusión. ....	36
Figura 11. Precisión del método de preparación de las nanopartículas. Promedio $\pm$ error estándar medio (n = 3).....	39
Figura 12. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el tamaño de partícula.....	42

Figura 13. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el índice de polidispersión.....	44
Figura 14. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el potencial zeta.....	46
Figura 15. Gráficos 3D de superficie de respuesta para la eficiencia de entrapamiento.....	48
Figura 16. Contornos de la superficie de respuesta estimada.....	50
Figura 17. Distribución del tamaño de partícula para: (RAP-PLGA-PVA NPs, negro), (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs, rojo) y (RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs, verde).....	51
Figura 18. Micrografías MEB de las nanopartículas optimizadas.....	52
Figura 19. Termogramas obtenidos por DSC de los componentes puros y formulados en las nanopartículas optimizadas.....	53
Figura 20. Variación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad. Promedio $\pm$ error estándar medio (n = 3).....	55
Figura 21. Citotoxicidad de Rapamicina en disolución y cargada en las nanopartículas optimizadas. Promedio $\pm$ error estándar medio (n = 6).....	56
Figura 22. Micrografías de fluorescencia del citoesqueleto después de la exposición A) Control, B) SLN de Rapamicina, C) RAP-PLGA-PVA NPs, D) RAP-PLGA-PVA-P80 NPs y E) RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs.....	58
Figura 23. Gráfico que representa la linealidad del sistema en metanol.....	72
Figura 24. Gráfico que representa la precisión del sistema en metanol.....	73
Figura 25. Gráfico de medias y 95.0% de Tukey HSD del efecto del tiempo de almacenamiento sobre el TP, PDI, PZ y EE de las nanopartículas optimizadas.....	75

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) tales como gliomas y neurodegeneración se caracterizan por la degeneración progresiva de la estructura y función del SNC, conduciendo a la muerte neuronal y glial [1-2]. El principal obstáculo en el tratamiento de enfermedades del SNC es la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual selectivamente regula y limita el paso un gran número de fármacos hacia el SNC [3]. Muchos de estos fármacos son sustratos de los transportadores de eflujo en la BHE y no logran alcanzar concentraciones terapéuticas en el SNC. Estas proteínas de eflujo de fármacos no solamente se expresan en la BHE sino que también en las células glioma. Por lo tanto, uno de los retos más importantes es superar estas barreras y lograr optimizar la vectorización de agentes terapéuticos hacia el SNC [3].

La nanotecnología farmacéutica se centra principalmente en la formulación de nanopartículas, con tamaños que oscilan de 1–1000 nm. Estos nanotransportadores pueden ser de diferentes tipos, principalmente de naturaleza polimérica, lipídica e inorgánica [4]. Debido a las propiedades de los agentes terapéuticos como pobre estabilidad en fluidos biológicos, rápida degradación enzimática, propiedades farmacocinéticas desfavorables, éstos pueden ser formulados en nanopartículas para superar dichas limitantes [5]. Las nanopartículas presentan importantes propiedades tales como alta estabilidad química y física, factibilidad de incorporar moléculas hidrófilas e hidrófobas, así como la posibilidad de ser administrados a través de diferentes vías, incluyendo la oral, inhalatoria y parenteral. Además, estos nanotransportadores pueden ser funcionalizados para aumentar el ingreso de fármacos al SNC [4].

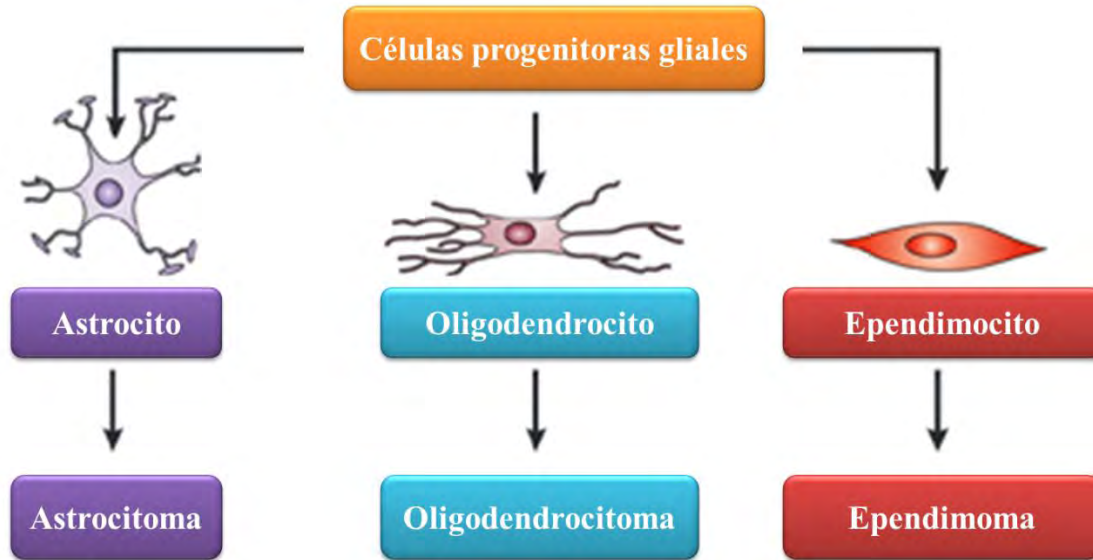
Considerando lo anterior, los objetivos principales de este trabajo de investigación fueron desarrollar, caracterizar, optimizar y evaluar nanopartículas poliméricas capaces de incorporar moléculas con muy escasa solubilidad en agua como es la Rapamicina, un fármaco conocido por inducir la autofagia, la cual es una prometedora estrategia terapéutica con las enfermedades del SNC. Por otro lado, considerando las excelentes propiedades de los surfactantes para atravesar barreras biológicas, como la BHE, también investigamos el efecto de la modificación superficial con surfactantes sobre las propiedades fisicoquímicas y anticancerígenas de las nanopartículas cargadas con Rapamicina.

## II. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1. ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Sistema Nervioso Central (SNC), conformado por el cerebro y la médula espinal, es el encargado de gobernar funciones muy variadas, destacando las relacionadas con el proceso de aprendizaje, lenguaje, memoria y coordinación de los movimientos corporales. Su adecuado funcionamiento es de vital importancia para mantener las conexiones en todo el cuerpo que permiten el correcto desempeño del organismo. Numerosas enfermedades pueden afectar tanto al cerebro como a la médula espinal y, eventualmente, comprometer su integridad. Dentro de éstas se pueden incluir: infecciones bacterianas o virales, parálisis cerebral, accidentes cerebrovasculares, así como también, cáncer y neurodegeneración [1-2].

Los tumores del SNC se consideran los más devastadores de todos los cánceres ya que afectan predominantemente a las células del cerebro o de la médula espinal, las cuales son vitales para regular el equilibrio neurológico [6]. Estos tumores afectan a personas de todas las edades debido a anomalías en el desarrollo o a la genética. Las diferentes células implicadas en los tumores del SNC son células gliales, células no neuronales y células de Schwann. El 70% de los cánceres cerebrales son específicos de células gliales [7]. Los factores de riesgo involucrados en la tumorigénesis glial son la exposición a químicos, radiación ionizante, infección viral y manipulación genética. Los gliomas se caracterizan por un alto potencial proliferativo, comportamiento de crecimiento infiltrativo, heterogeneidad intratumoral y recidiva tumoral [8]. La Organización Mundial de Salud clasifica a los tumores del SNC con base en criterios morfológicos que determinan el linaje celular, el grado de agresividad y el pronóstico a largo plazo. El aspecto fenotípico de las células tumorales según su posible origen astrocitario (astrocitoma), oligodendroglioma (oligodendroglioma), mixto (oligoastrocitoma) y ependimario (ependimoma), Figura 1. El grado de malignidad va de I a IV y depende de características funcionales como la proliferación celular, la presencia de mitosis o signos de apoptosis, la presencia de neo proliferación vascular y área de necrosis [9]. Las etapas tardías del cáncer del SNC están asociadas con un pronóstico deficiente y la tasa de supervivencia promedio de los pacientes diagnosticados con gliomas malignos generalmente no excede de dos años [10-11].



**Figura 1. Representación esquemática de células gliales y gliomas. Modificada de referencia 12.**

El término neurodegeneración abarca una gran variedad de condiciones que son esporádicas y/o familiares, caracterizadas por la degeneración progresiva de la estructura y función del SNC, conduciendo a muerte neuronal y atrofia cerebral. Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes son las enfermedades de Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), enfermedades Poliglutaminicas (poliQ) como la enfermedad de Huntington (HD) y algunas Ataxias Espino-Cerebelosas y las enfermedades Priónicas [13]. La Tabla 1 engloba a las enfermedades neurodegenerativas más importantes, sus características y sintomatología. Es aceptado que los principales factores de riesgo que pueden causar neurodegeneración son la edad y mutaciones genéticas específicas. A este respecto, la población mundial avanza particularmente hacia el envejecimiento y un gran número de ancianos se ven afectados por estos desordenes.

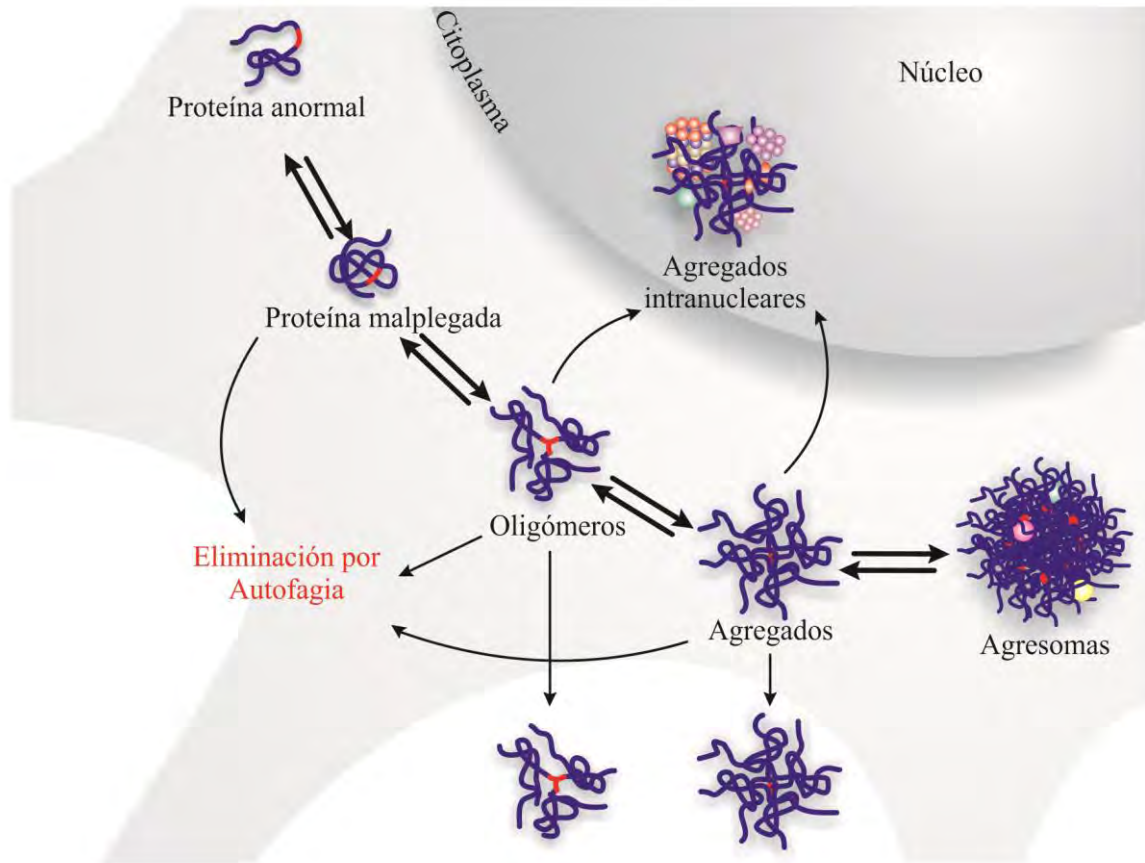
Morfológicamente, la pérdida neuronal se asocia con el malplegamiento y agregación de proteínas tóxicas que conducen a la acumulación intra y/o extracelular de agregados anormales en células específicas, principalmente neuronas y glía [14], Figura 2. El conocimiento reciente en el campo soporta la idea de que la acumulación de proteínas mutantes o malplegadas dentro y fuera de las neuronas es un evento que contribuye a trastornos neurodegenerativos, por lo que la disfunción y muerte neuronal causada por la agregación de estas proteínas representa uno de los mayores retos para el desarrollo de terapias [15].

**Tabla 1. Principales características de las enfermedades neurodegenerativas. Adaptada de referencias 16-19.**

Enfermedad	Proteínas	Patología	Áreas afectadas	Síntomas
Alzheimer	A $\beta$ y Tau	Placas A $\beta$ y enredo Tau	Hipocampo y corteza frontal	Perdida de la memoria, cambio de personalidad, preocupación y depresión
Parkinson	$\alpha$ -sinucleína y Tau	Cuerpos de Lewy y enredo	Sustancia negra y PFC	Deterioro de la coordinación sensorimotora y cognición
<b>Enfermedades de la poliglutamina</b>				
Huntington	Huntingtin	Agregados en el citoplasma y núcleo	Estriado	Movimientos incontrolados, torpeza y deterioro del equilibrio
SBMA	Receptor Andrógeno	Agregados en el citoplasma y núcleo	Médula espinal y tronco encefálico	Debilidad muscular proximal y bulbar, atrofia, fasciculación.
DRPLA	Atrophin-1	Agregados en el núcleo	Sistemas dentatorubral y palidoluisiana	Ataxia, epilepsia, mioclonía, corea, demencia
SCA1	Ataxina-1	Agregados en el núcleo	Cerebelo	Ataxia, disartria, deterioro motor progresivo, problemas cognitivos
SCA2	Ataxina-2	Agregados en el núcleo	Cerebelo	Ataxia, hiporreflexia, disartria, parkinsonismo, alteración sensorial, retraso mental.
SCA3	Ataxina-3	Agregados en el núcleo	Médula espinal	Ataxia, distonía, parkinsonismo, disfagia
SCA6	Canales de calcio	Agregados en el citoplasma	Cerebelo	Ataxia, disartria, trastornos oculomotores, neuropatía periférica
SCA7	Ataxina-7	Agregados en el núcleo	Retina del ojo	Ataxia, degeneración retiniana, disfagia, disartria, trastornos del sueño
SCA17	Tata-binding protein	Agregados en el núcleo	Cerebelo	Ataxia, deterioro cognitivo, epilepsia
Prión	PrP <sup>Sc</sup>	Placas amiloideas	SNC completo	Pérdida de memoria, trastorno del movimiento
ELA	SOD1	Cuerpos de Bunina	Neurona motora del SNC	Alteraciones de la actividad muscular
Taupatías	Tau	Lesiones desmielinizantes	Materia blanca del cerebro y médula espinal	Discapacidad física y cognitiva

Notas: SBMA = Atrofia Muscular Espino-Bulbar. DRPLA = Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana. SCA = Ataxias Espino-cerebelosa. ELA = Esclerosis Lateral Amiotrófica.





**Figura 2. Representación esquemática del proceso de agregación de proteínas en enfermedades neurodegenerativas.**

La acumulación gradual de proteínas mutadas o malplegadas con el tiempo conduce a la pérdida progresiva de la estructura y/o función de las neuronas y, finalmente, a la muerte neuronal [20]. En muchos de los casos las proteínas anormales son eventualmente depositadas intra y extracelularmente como agregados insolubles, tales como plaquetas y desarreglos neurofibrilares, condición conocida como amiloidosis, un proceso asociado con neurodegeneración. Esta agregación de proteínas malplegadas es altamente regulada por factores genéticos y ambientales [21]. Interesantemente, muchas de las proteínas amiloides (ej.  $A\beta$ ,  $\alpha$ -sinucleína, huntingtin, prion, etc.) son de naturaleza metaestables y no cristalinas, las cuales tienen estructuras nativas similares [22]. Normalmente, cuando las proteínas se someten a cambios conformacionales en condiciones específicas se desnaturalizan o malpliegan, éstas son replegadas en el retículo endoplásmico (ER) o son degradadas en el lisosoma, pero cuando el sistema falla, eventualmente se produce la acumulación de agregados fibrilares insolubles llamados amiloides [23]. Recientemente, se ha propuesto que los

agregados proteicos solubles y prefibrilares, particularmente dodecámeros (u oligómeros más grandes) con conformaciones específicas, son más neurotóxicos que los agregados amiloides [24]. La orientación terapéutica para agregados proteicos es un reto debido a que 1) los agregados proteicos prefibrilares pueden tener múltiples conformaciones estructurales, 2) no todos los agregados son tóxicos y 3) las diferentes especies generadas pueden causar toxicidad a través de diferentes mecanismos [25].

### **2.1.1. Autofagia como una prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central**

La autofagia ha tomado gran relevancia ya que se ha vinculado a la fisiología humana y las enfermedades. La regulación de este mecanismo está implicada en numerosos procesos fisiopatológicos, destacando el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas [26]. La autofagia es un proceso de degradación celular que se caracteriza por la formación de vesículas llamadas autofagosomas, las cuales envuelven componentes celulares destinados a su degradación enzimática [27]. Los metabolitos generados como resultado de la autofagia son reutilizados como fuente de energía o para construir nuevas macromoléculas [28].

El rol de la autofagia en el contexto del cáncer sigue siendo controvertido. Se ha demostrado que la resistencia tumoral a terapias contra el cáncer como la radioterapia y quimioterapia, se asocia a una sobre regulación de la autofagia. Sin embargo, numerosos estudios han establecido que la autofagia es un proceso esencial en la supresión tumoral. En consecuencia, la autofagia se concibe como una estrategia para mediar la acción antitumoral de diversos fármacos [29-30].

Los mecanismos involucrados para la depuración de agregados proteicos en la célula incluyen chaperonas moleculares, el sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia. A pesar de que un grado moderado de autofagia ha mostrado jugar un papel importante en la extensión de la vida, la sobreestimulación de la autofagia puede conducir a muerte celular [15]. La falla de los sistemas proteolíticos es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas y cada vez más se reconoce que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de estas enfermedades. Por lo tanto, la aceleración de la depuración de agregados mediante el mejoramiento de los principales mecanismos celulares de depuración podría representar una alternativa importante en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En las células de mamíferos, el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) y la autofagia-lisosomal son dos mecanismos que funcionan para depurar proteínas citosólicas mal plegadas [31]. El SUP es ideal

para remover proteínas malplegadas o dañadas cuando no es posible el repliegue, mientras que la autofagia favorece la depuración de grandes complejos oligoméricos. Con respecto a la modulación del sistema UPS, diferentes componentes tales como interferon- $\beta$ , benzamil, Y-27632 y H1152 (inhibidores de quinasas asociadas a rho) pueden inducir este mecanismo y significativamente reducen la presencia de agregados en modelos *in vitro/in vivo* de las enfermedades AD, PD, HD, SCA3 y SCA7 [32-35].

La evidencia de los beneficios del mejoramiento de la autofagia se ha obtenido mediante el uso de rapamicina, el compuesto más conocido capaz de regular el sistema autofagia/lisosoma a través de la inhibición de mTOR, un regulador negativo de la autofagia. La autofagia inducida por rapamicina se ha observado que degrada diferentes formas de  $\alpha$ -sinucleína, htt y ataxina-3 [36-37]. Sin embargo, se han planteado algunas preocupaciones con respecto al uso prolongado de la rapamicina debido a los potenciales efectos secundarios relacionados con la inhibición de mTOR y su control de varios procesos celulares. Como alternativas a los potenciadores de la autofagia dependientes de mTOR, los agentes mTOR independientes podrían ofrecer perfiles más seguros. En este sentido, el litio y trehalosa reducen significativamente la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína, htt y PrP patológicos a través de un mecanismo mTOR independiente, el cual depende de los niveles de inositol [38-39].

### 2.1.2. Limitaciones de la terapia

Aunque los recientes avances en el desarrollo de terapias eficaces contra las enfermedades del SNC, los estudios clínicos que utilizan los fármacos mencionados anteriormente son limitados, Tabla 2.

**Tabla 2. Agentes terapéuticos y sus limitaciones utilizados para inducir autofagia.**

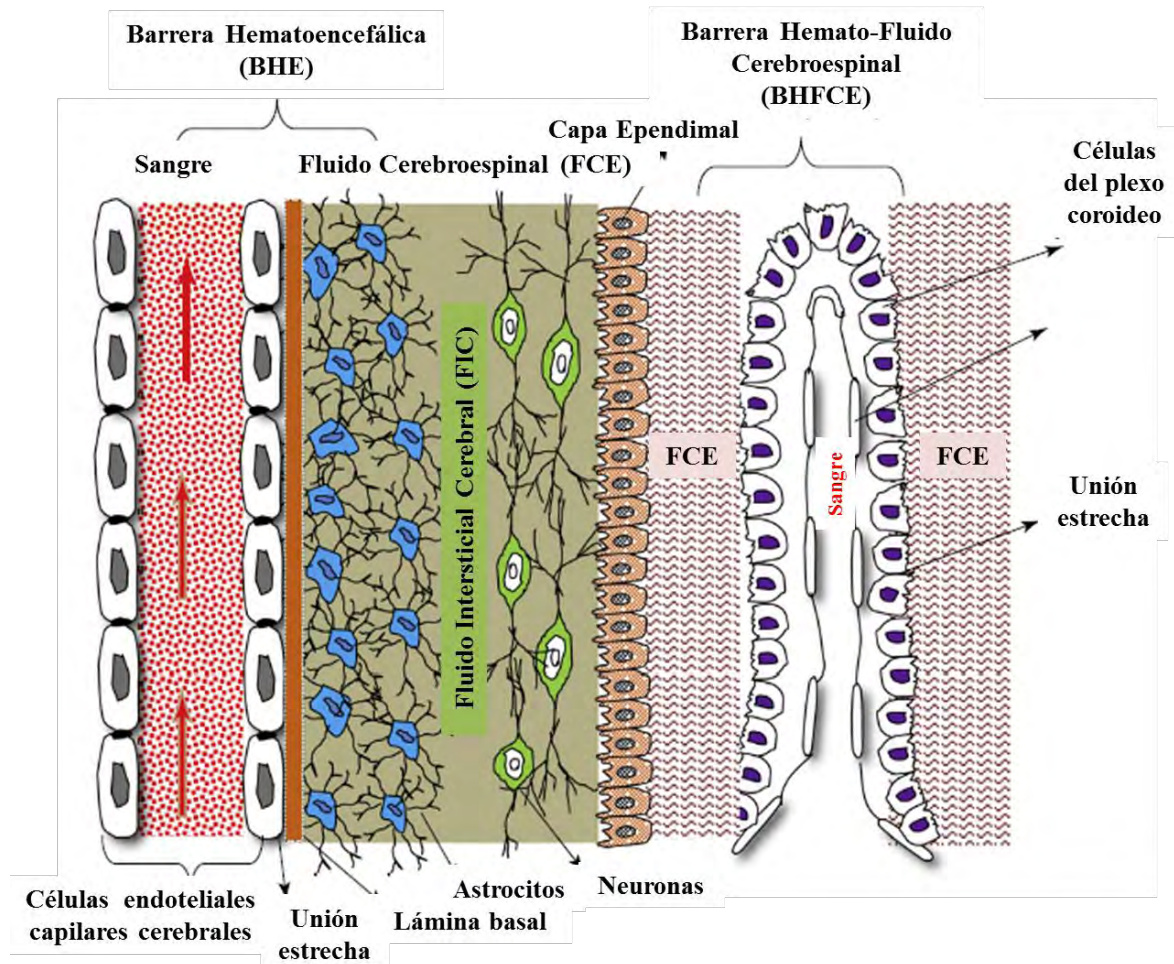
Agente terapéutico	PM	Limitaciones
Benzamil	319.75	Baja solubilidad en agua.
Y-27632	247.34	Tiempo de vida media corto.
H1152	319.42	-----
$\beta$ -Interferon		Tiempo de vida media corto, baja biodisponibilidad.
Rapamicina	914.17	baja solubilidad en agua, baja estabilidad en disoluciones acuosas.
Temsirolimus	1030.29	baja solubilidad en agua.
Cloruro de litio	42.39	Dosis terapéuticas neurotóxicas.
Trehalosa	378.33	No atraviesa BHE.
TAT-beclin 1	3741.10	Fotoinestable.

Cuando un fármaco hidrofílico es administrado intravenosamente en el cuerpo, con baja unión a proteínas, el fármaco es rápidamente eliminado de la sangre por filtración renal mediante la orina [40]. En el caso de fármacos lipofílicos, la depuración renal se reduce significativamente en comparación con la de los fármacos hidrofílicos debido a un aumento en la unión a proteínas séricas. Los fármacos lipofílicos a menudo se transforman en metabolitos hidrofílicos en el hígado y se excretan en la bilis o se eliminan por orina. Una vez que un fármaco se encuentra en circulación sanguínea, es necesario monitorizar su concentración lo suficiente como para describir completamente su comportamiento [41]. Los perfiles farmacocinéticos en la sangre son de gran importancia para obtener parámetros claves que cuantitativamente describan el comportamiento de los fármacos en el cuerpo. Estos parámetros farmacocinéticos incluyen la concentración máxima ( $C_{max}$ ), el área bajo la curva (AUC), el tiempo de vida media biológica ( $t_{1/2}$ ), la depuración (Cl) y el tiempo medio de residencia (MRT) o tiempo promedio que un fármaco permanece en el cuerpo. Cuando un fármaco experimenta una circulación sanguínea prolongada, a menudo se observan valores altos en el AUC,  $t_{1/2}$  y MRT, y Cl bajos. Por lo contrario, si los fármacos se eliminan rápidamente del cuerpo se obtienen valores en AUC,  $t_{1/2}$  y MRT bajos, además de valores altos de Cl. Los parámetros farmacocinéticos también se utilizan para decidir la dosis y el régimen de dosis para mantener una concentración sanguínea deseable con efectos secundarios mínimos. La concentración sanguínea de fármacos está altamente correlacionada con su eficacia y toxicidad. Una alta acumulación de un fármaco en el tejido diana puede dar lugar a un efecto terapéutico mejorado y, al contrario, una gran cantidad de fármaco distribuida a órganos no-objetivos puede causar toxicidad no deseada. Por esta razón, los estudios de farmacocinética y biodistribución son extremadamente importantes durante el desarrollo de agentes terapéuticos [42]. Además, de sus propiedades intrínsecas, existen diferentes barreras biológicas que bloquean su paso hacia el SNC.

## **2.2. BARRERAS BIOLÓGICAS CONTRA EL TRATAMIENTO EFECTIVO DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Los tratamientos modernos para enfermedades neurodegenerativas emplean fármacos de alto peso molecular, productos biotecnológicos, tales como proteínas recombinantes y enzimas, anticuerpos monoclonales, RNAi, oligonucleótidos antisentido, etc. La mayoría de estos agentes terapéuticos no pueden permear hacia el cerebro debido a la presencia de dos barreras anatómicas dinámicas: la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera hemato-fluido cerebrospinal (BHFCE) también conocida como fluido cerebrospinal (FCE) [3-4]. Además de estas dos barreras físicas, la presencia de enzimas metabolizadoras de agentes terapéuticos en las dos interfaces provee una barrea

enzimática adicional, Figura 3. Por lo tanto, uno de los retos más importantes es superar estas barreras para lograr optimizar la penetración de agentes terapéuticos dirigidos hacia el SNC.



**Figura 3. Representación esquemática de las principales barreras que limitan la penetración de fármacos al cerebro. Modificada de referencia 4.**

### 2.2.1. Barrera hematoencefálica (BHE)

La barrera hematoencefálica (BHE) representa un obstáculo anatómico si se desea ingresar al cerebro; es desarrollada por la función coordinada de múltiples tipos de células con el objetivo de limitar la penetración de sustancias nocivas. Representa un escudo neuroprotector que actúa de manera selectiva en contra de las sustancias provenientes de la sangre, suministra nutrientes a los tejidos cerebrales y filtra los compuestos nocivos del cerebro hacia el torrente sanguíneo. La BHE

es producto del trabajo en conjunto del endotelio microvascular cerebral, las neuronas, la matriz extracelular, la membrana basal y las células gliales, tales como astrocitos y pericitos [43].

La BHE es una barrera única y selectiva conformada principalmente por células endoteliales que rodean los capilares cerebrales, forman el sustrato anatómico denominado endotelio microvascular cerebral, el cual regula el transporte de solutos y otras sustancias incluyendo a los agentes terapéuticos dentro y fuera del cerebro, crucial para la actividad neuronal y el funcionamiento adecuado del SNC. Las células endoteliales están completamente cubiertas por una lámina basal rodeada por los extremos de astrocitos [44], consta de colágeno tipo IV, fibronectina y laminina. En esta membrana se incrustan pericitos, cubriendo alrededor del 20-30% de las células endoteliales [45]. Las células endoteliales de la BHE se distinguen de las de la periferia por el aumento del contenido mitocondrial, la falta de fenestraciones, mínima actividad pinocitótica y la presencia de uniones estrechas complejas debido a la interacción de varias proteínas transmembranales, tales como ocludinas, claudinas y las moléculas de adhesión-unión JAMs, que dividen las membranas de las células endoteliales en dos lados distintos; luminal (lado de la sangre) y abluminal (lado del cerebro), siendo las responsables de impedir el transporte paracelular de diversas moléculas, conformando así una barrera fisiológica y farmacológica [46].

Los pericitos incrustados en la lámina basal entrelazan los capilares [47] y tienen importantes funciones: median procesos inflamatorios, regulan la actividad de las células endoteliales cerebrales e inducen estructuras capilares a las que se asocian rápidamente [48]. Los astrocitos de la sustancia gris se caracterizan por abundantes apéndices citoplasmáticos gruesos y núcleos grandes, cuyas terminaciones forman estructuras tipo tapa (*cap-like*) conocidas como *end-feet*. Éstas se unen firmemente a las neuronas y capilares, lo que regula la interacción directa entre estas células [47]. Los astrocitos también son capaces de secretar una gama de importantes factores de crecimiento y citoquinas que contribuyen en gran medida al fenotipo de las células endoteliales, lo que conduce a la formación de uniones más estrechas, así como la expresión y polarización de la localización de enzimas y transportadores específicos [49]. Las células endoteliales capilares del cerebro también están unidas por uniones adherentes y se localizan cerca del lado basolateral de las células endoteliales; consisten en cadherinas que interactúan en presencia de iones de calcio. Así mismo, las cadherinas están unidas al citoesqueleto de actina por medio de cateninas. Ambas uniones son necesarias para formar la BHE [47,50].

La BHE cumple diversas funciones: primero, mantener el ambiente interno del cerebro, mantener el fluido intersticial cerebral (FIC) y la composición del fluido cerebroespinal (FCE) dentro de límites específicos, de tal forma que las neuronas puedan realizar sus complejas funciones integradoras. En

segundo lugar, se encuentra la neuroprotección, debido a que el SNC frecuentemente es expuesto a una amplia gama de metabolitos neurotóxicos y xenobióticos que pueden causar muerte celular. La BHE también protege al cerebro de las fluctuaciones en la composición iónica que pueden ocurrir después de una comida o ejercicio, lo que podría perturbar la sinapsis y la señalización axonal. Ayuda a mantener separados los neurotransmisores de acción central y periférica. Finalmente, la renovación y drenaje continuo de FCE e FIC ayuda a eliminar moléculas más grandes y metabolitos cerebrales, manteniendo así el microambiente cerebral [51]. La capacidad de una sustancia particular para cruzar la BHE e ingresar al cerebro depende de varios factores pero, en general, existe una relación entre la lipofilia y la penetración cerebral para ciertos solutos, es decir, a mayor lipofilia se espera un mayor ingreso al SNC. Sin embargo, algunas de las sustancias lipofílicas no entran en el cerebro tan fácilmente como se podría predecir a partir de su solubilidad lipídica. Estos solutos y en muchos casos sus metabolitos, son eliminados activamente del SNC por transportadores de eflujo [49].

La barrera hemato-fluido cerebroespinal (BHFCE) es la segunda barrera más importante del SNC después de la BHE. Está formada por células epiteliales del *plexus* coroideo rodeando a los capilares fenestrados que se unen por proteínas de uniones estrechas. La función principal de estas células es secretar y mantener la composición homeostática del FCE. La BHFCE controla la penetración de moléculas dentro del fluido intersticial del parénquima cerebral regulando el intercambio de moléculas entre la sangre y el FCE [46].

Además de las barreras físicas BHE y BHFCE, se ha identificado la presencia de enzimas metabolizadoras de fármacos en los microvasos cerebrales, plexos coroideos, leptomeninges y en algunos órganos circunventriculares. Éstas incluyen hemoproteínas del citocromo P450, varias monooxigenasas del citocromo P450, NADPH-citocromo P450 reductasas, UDP-glucuronosil transferasas, fosfatasas alcalinas, glutatión peroxidasa (GSH) y epóxido hidrolasas. Es probable que los productos de degradación o de biotransformación sean eliminados del cerebro por sistemas de transporte específicos dentro de la BHE o por difusión desde el parénquima hacia el FCE por flujo [3].

### **2.2.2. Mecanismos de transporte de agentes terapéuticos hacia el cerebro**

Existen varias rutas de transporte a partir de las cuales las moléculas pueden ingresar al cerebro. Los nutrientes, iones y otras moléculas atraviesan la BHE mediante difusión paracelular a través del complejo juncional o mediante la vía transcelular, Figura 4.



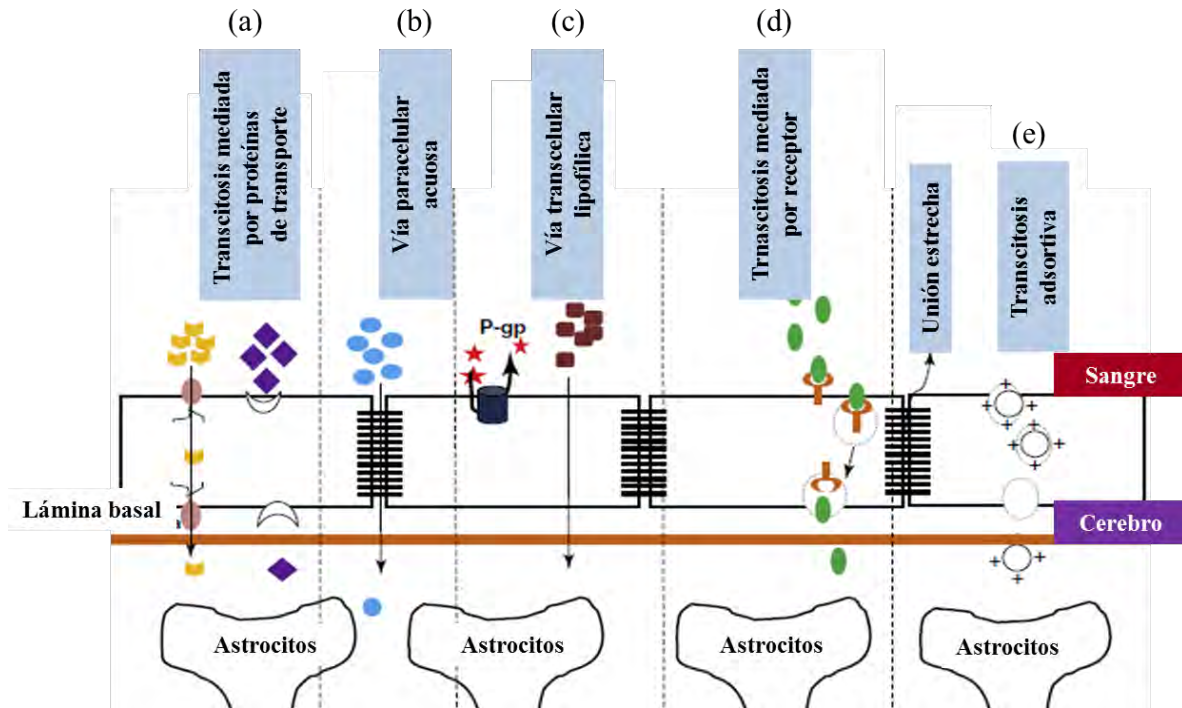


Figura 4. Representación esquemática de los principales mecanismos de transporte a través del cerebro. Modificada de referencia 4.

### 2.2.2.1. Difusión vía paracelular

La vía paracelular es un proceso de difusión pasiva que consiste en el movimiento de solutos lipofílicos o de bajo peso molecular a través de la BHE, el cual depende de los gradientes electroquímicos, hidrostáticos y osmóticos. Este mecanismo es estructuralmente mediado por TJs y depende de la concentración del soluto. En términos de función, la contractibilidad del citoesqueleto endotelial y las fuerzas adhesivas impulsan la permeabilidad del complejo juncional. Un equilibrio sutil y dinámico entre ambas fuerzas determina uno de los principales procesos de intercambio sangre-cerebro [52].

### 2.2.2.2. Difusión vía transcelular

El transporte transcelular puede ser o no dependiente de energía, en éste se incluye la difusión transcelular a través de la membrana luminal y abluminal del endotelio capilar, y se pueden dividir en los siguientes casos:

**i) Transcitosis mediada por receptores.** Es el principal mecanismo utilizado por las células endoteliales cerebrales para captar moléculas, tales como hormonas o proteínas de alto peso



molecular (insulina, leptina, lipoproteínas de baja densidad, transferrina e IGF). Esta vía es un transporte activo que depende de la temperatura y puede estar sujeto a fenómenos de saturación. El reconocimiento receptor-ligando promueve la formación de pozos recubiertos (coated pits) que eventualmente envuelven el ligando mediante la formación de vesículas endocíticas. El siguiente paso consiste de una fusión endosomal que disocia al receptor del ligando y libera el contenido por exocitosis. Sin embargo, no todas las vesículas atraviesan con éxito la BHE, ya que algunos se fusionan con lisosomas y su contenido se degrada debido al bajo pH y a la hidrólisis mediada por enzimas. Este proceso se ha propuesto como un blanco para la administración de fármacos dirigidos al SNC ya que no está limitado por el tamaño ni es dependiente de la lipofilicidad. Además, se considera seguro y efectivo debido a su alta especificidad y uso de un mecanismo totalmente fisiológico [44,52].

**ii) Endocitosis mediada por adsorción.** Las moléculas cargadas positivamente, tales como la albumina cationizada y las histonas, interactúan con componentes cargados negativamente presentes en las membranas de las células endoteliales, permitiendo que la endocitosis mediada por adsorción supere la BHE. Esta vía biológica puede utilizarse para mejorar la administración de fármacos conjugados a través de la BHE, tal y como sucede con la  $\beta$ -endorfina conjugada con albumina cationizada. Este enfoque también se está probando con anticuerpos [46,50].

**iii) Transporte mediado por portadores.** Este es un proceso de transporte sujeto a saturación y que puede ser o no dependiente de energía, lo que regula el intercambio de sustancias entre la circulación sistémica y el parénquima cerebral. Estos portadores están habitualmente polarizados y localizados tanto en la membrana luminal como en la membrana abluminal. Existen varios sistemas portadores expresados en las células endoteliales cerebrales con el fin de transportar selectivamente distintas moléculas, por ejemplo, la glucosa que se suministra a través del transportador GLUT-1 mediante gradiente de concentración. En el caso de aminoácidos, existen diferentes proteínas transportadoras selectivas y dependientes de energía que están sujetas a las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido. Los aminoácidos grandes, neutros y aromáticos son absorbidos por el sistema N o L, mientras que aminoácidos pequeños y neutros pasan por el sistema A, el sistema ASC es responsable del transporte de aminoácidos que contienen azufre siendo el principal transporte de cisteínas. Finalmente, aminoácidos cargados utilizan canales iónicos, bombas Na/K o co-transportadores Na/Cl [48-49].

**iv) Sistema de transporte de eflujo.** Es un proceso de transporte activo donde distintos sustratos se eliminan del SNC y se transfieren a la circulación sistémica para evitar la acumulación de compuestos que lograron atravesar la BHE. En ciertas situaciones, algunos fármacos son capaces de

superar la BHE, pero no alcanzan concentraciones terapéuticamente efectivas debido a las bombas de eflujo que los transportan desde el parénquima hacia la membrana luminal y de vuelta a la circulación sistémica [52]. El transportador de eflujo prototipo es la glicoproteína P (gp-P), un miembro glicosilado de los transportadores cinta de unión-ATP (ATP-binding cassette) (ABC), expresado en la membrana luminal de las células endoteliales. La gp-P se incluye en la clase de receptores de resistencia a múltiples fármacos (MDRs) caracterizados por ser removedores de fármacos anticancerígenos, antibióticos, supresores del sistema inmune o modulador de canales iónicos. En los capilares cerebrales hay una alta concentración de gp-P, donde juega un papel importante que consiste en evitar la acumulación de toxinas o fármacos en el cerebro, siendo esencial para proteger la viabilidad neuronal. Sin embargo, existen otras clases de transportadores que se expresan en el cerebro, tales como transportadores de monocarboxilato (MCTs) y transportadores de aniones orgánicos/polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OAT/OATPs) [46]. Estos últimos, en contraste con los transportadores ABC, son un ejemplo de intercambiadores independientes de energía. Dado que son incapaces de hidrolizar ATP, no pueden transportar un fármaco contra su gradiente de concentración. Los OAT/OATPs tienden a funcionar como intercambiadores en lugar de bombas usando gradientes de iones o sustratos. Por lo tanto, su transporte es bidireccional y depende de la concentración de fármaco en ambos lados de la BHE [52].

### **2.3. APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO DE NANOTRANSPORTADORES PARA AGENTES TERAPÉUTICOS HACIA EL CEREBRO**

La naturaleza altamente selectiva de la BHE limita la entrada al cerebro de la mayoría de los agentes terapéuticos, por lo cual se han realizado numerosos intentos para conseguir una entrega eficaz al SNC. Estas estrategias pueden ser clasificadas en invasivas y no invasivas [53]. La primera implica superar la BHE mediante apertura temporal osmótica, infusión intracerebral o implantación intracerebral (ej. obleas cargadas con fármaco *drug-loaded wafer*). Sin embargo, todos los procedimientos invasivos presentan alto riesgo. Los métodos no invasivos consisten en modificaciones químicas de los fármacos (ej. síntesis de profármacos) utilizando enfoques bioquímicos (ej. conjugación de péptidos que penetran las células), la inhibición de transportadores de eflujo y la penetración a través de transportadores endógenos, métodos que ofrecen mejoras en los tratamientos [54]. Sin embargo, éstos están asociados a graves efectos secundarios. Por lo tanto, encontrar nuevas formas de administración de fármacos de manera eficaz, segura y controlada es uno de los grandes retos de la tecnología farmacéutica. En este sentido, los sistemas de entrega de

fármacos basados en la nanotecnología han proporcionado una enorme esperanza para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [55].

La nanotecnología farmacéutica se centra principalmente en la formulación de nanotransportadores cargados con agentes terapéuticos, con tamaños que oscilan de 10–1000 nm [55]. Estos nanotransportadores pueden ser de diferentes tipos, principalmente NPs poliméricas, lipídicas y metálicas, nanoliposomas, nanomicelas, nanogeles, entre otras, Figura 5.

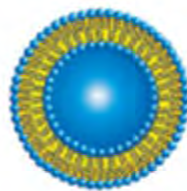
### Sistemas Nanoparticulados Lipídicos



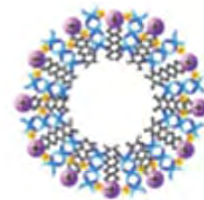
Nanopartícula lipídica sólida



Acarreador lipídico nanoestructurado



Nanoliposoma



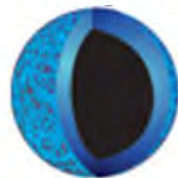
Lipoplex

### Sistemas Nanoparticulados Poliméricos

*Nanoesfera*



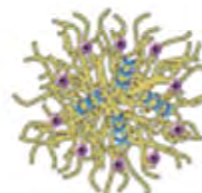
*Nanocápsula*



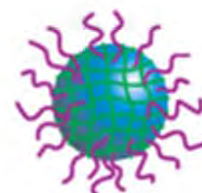
Nanopartículas



Nanomicela polimérica



Poliplex



Nanogel

### Sistemas Nanoparticulados Inorgánicos



Nanopartícula magnética



Nanopartícula de oro



Nanopartícula de sílica

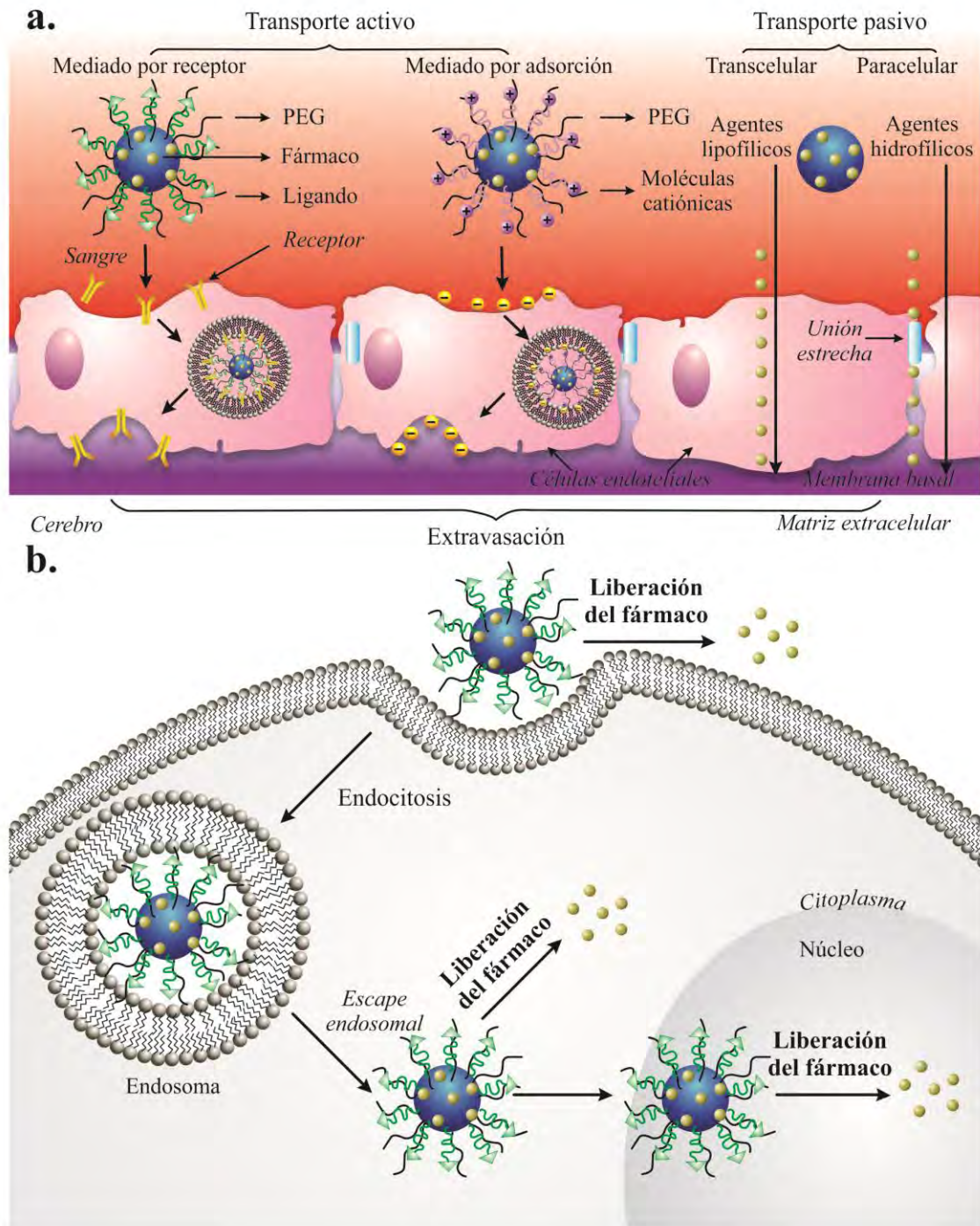
**Figura 5.** Representación esquemática de la morfología de las NPs más comúnmente utilizadas para una terapia eficaz en las enfermedades neurodegenerativas. Modificada de referencia 55.

Una aplicación particular de las NPs es la vectorización de diferentes agentes terapéuticos al SNC con una liberación sostenida, dentro de estos agentes se incluyen fármacos, péptidos, proteínas,

genes, oligonucleótidos anti-sentido, etc [56]. Debido a su pobre estabilidad en fluidos biológicos, la rápida degradación enzimática, propiedades farmacocinéticas desfavorables y la escasa difusión hacia el SNC, los agentes terapéuticos son formulados en nanoacarreadores para superar dichas limitantes, Figura 6. En particular, estos nanotransportadores se pueden funcionalizar para mejorar el ingreso de fármacos al cerebro. Además, presentan características positivas adicionales tales como alta estabilidad química y biológica, factibilidad de incorporar moléculas hidrófilas e hidrófobas, así como la posibilidad de ser administrados a través de diferentes vías, incluyendo la oral, inhalatoria y parenteral [57]. Actualmente, se han planteado diversos enfoques para superar la BHE y las estrategias más prometedoras son aquellas basadas en nanomateriales diseñados para interactuar con las células de la BHE a nivel molecular, explotando los mecanismos fisiológicos existentes de transporte sin interferir con la función normal de la propia barrera. La transcitosis mediada por receptores y procesos adsorptivos son los mecanismos más alentadores para facilitar el transporte transcelular desde la sangre hasta el cerebro [56]. Para lograr esta tarea, es necesario considerar como mínimo una funcionalización superficial para dirigir y atravesar la BHE<sup>5</sup>, conferirles una semivida prolongada en sangre evitando el sistema reticulo-endotelial, activación de neutrófilos, agregación plaquetaria e inflamación. Adicionalmente, deben ser no tóxicos, biodegradables y biocompatibles, no inflamatorios y no inmunogénicos [58].

En el desarrollo de este tipo de nanoformulaciones terapéuticas frente a enfermedades del SNC se considera que las partículas con tamaño de 20 nm son lo suficientemente grandes para escapar de la filtración glomerular renal. Además, las NPs con una superficie neutra (potencial zeta  $\pm 10$  mV) presentan un tiempo de circulación sanguínea mayor en comparación con aquellas altamente cargadas (potencial zeta  $\pm 40$  mV). Por otra parte, la modificación superficial con polietilenglicol (PEG) (PEGilación) reduce la tasa de captación RES y aumenta la vida media de circulación de las NPs. Esta modificación superficial permite superar la BHE mediante la interacción con proteínas de transporte microvascular (ej. apolipoproteína E) y la utilización de la vía mediada por el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) [59].

El recubrimiento superficial con tensoactivos hidrófilos tales como polisorbato 80 y poloxámero 188 inhibe los transportadores de eflujo de gpP y solubiliza las membranas lipídicas de las células endoteliales capilares cerebrales, mejorando así la penetración en el cerebro [60]. Otros ejemplos incluyen la incorporación de transferrina para que las NPs puedan ingresar en el cerebro a través de receptores de transferrina, abundantes en este órgano [60-61].



**Figura 6.** Representación esquemática del camino seguido por NPs hacia el cerebro para la entrega exitosa *in vivo* de agentes terapéuticos en enfermedades poliQ. (A) Una vez dentro de la circulación sistémica, las NPs protegen a los agentes terapéuticos de la degradación y prolongan su tiempo de circulación. Además, deben cruzar varias barreras fisiológicas como BHE. Los mecanismos de transporte BHE mediados por receptores y adsorbentes son los más utilizados por NPs. (B) Las NPs median la entrada celular y permiten el escape endosomal, la liberación del fármaco podría lograrse en el citoplasma, incluso hasta en el núcleo celular.

También hay sitios de unión específicos de glutatión, que hacen de éste un buen ligando para facilitar el tránsito a través del cerebro. Con respecto a la carga, los sistemas catiónicos atraviesan BHE por medio del transporte mediado por adsorción a través de interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de moléculas catiónicas y sitios aniónicos en la membrana plasmática de las células endoteliales capilares cerebrales [62]. Ejemplos de materiales que pueden usarse para producir sistemas de NPs catiónicas incluyen los siguientes: estearilamina; albúmina cationizada; polímeros catiónicos tales como poli-L-lisina (PLL), poli-L-ornitina, polietilenimina (PEI); quitosano (CS); polipéptidos ricos en arginina, etc. La mayoría de estas superficies de recubrimiento favorecen una endocitosis dependiente de clatrina, la principal vía de internalización en el SNC [63]. Es importante mencionar que incluso las NPs sin modificaciones superficiales pueden penetrar en la BHE por difusión pasiva o liberando agentes terapéuticos en los límites de ésta [55].

Los avances en el campo de la nanomedicina han generado varias plataformas que mejoran el transporte de agentes terapéuticos a través de la BHE. Aunque existen diferentes tipos de transportadores empleados en la administración de agentes terapéuticos para combatir NDs, en esta tesis sólo se abordarán NPs poliméricas. En este sentido, se han desarrollado NPs poliméricas cargadas con diferentes agentes terapéuticos. Por ejemplo, NPs PEG-PLA con tamaños alrededor de 120 nm, potencial zeta de -23 mV, modificadas con un sustituto de transferrina (péptido B6) y cargadas con un péptido neuroprotector (NAP) [64], mostraron una mayor acumulación en cerebro para un modelo de ratón AD, en comparación con NPs sin el péptido B6.

### 2.3.1. Nanopartículas

Hasta ahora se han descrito tres generaciones de NPs. La primera generación comprende (i) "nanoesferas", un sistema tipo matriz constituido por el polímero en el que el fármaco se encuentra homogéneamente dispersado y (ii) "nanocápsulas", que son sistemas vesiculares en los que el fármaco se solubiliza en un núcleo líquido (agua o aceite), es decir, confinado a una cavidad rodeada por una fina capa polimérica [65]. La segunda generación se compone de "ingeniería de superficie" y "NPs sigilosas". Con el fin de evitar una rápida acumulación de NPs en el hígado y en el bazo debido a la absorción de opsoninas a su superficie y resultando en la activación del sistema de fagocitos mononucleares (MPS), se han desarrollado NPs con superficie modificada. El principal avance fue el injerto de las cadenas de PEG (PEGilación) a su superficie dando como resultado sistemas de administración de fármacos de larga circulación, también denominados "NPs sigilosas" [66]. La tercera generación de NPs son "NPs objetivo". La síntesis de NPs funcionalizadas con

ligandos eficientes para conseguir la focalización celular específica se ha convertido en uno de los campos más interesantes en la administración de fármacos. El desarrollo de NPs objetivo está preparando el camino para establecer una estrategia activa de focalización para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y se han empleado diversas modificaciones superficiales, incluyendo anticuerpos, ciclodextrinas y PEGilación [67].

### **2.3.2. Preparación de nanopartículas poliméricas**

Las NPs pueden ser preparadas a partir de una gran variedad de polímeros ya sean naturales (almidón, polipéptidos, albumina, alginato de sodio, quitosano, gelatina, celulosa, etc) o sintéticos (poli(etilenglicol) (PEG), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(vinil alcohol) (PVA), policianoacrilatos, etc) [68]. La selección de la matriz polimérica depende de muchos factores, incluyendo: el tamaño requerido de las NPs; las propiedades inherentes del fármaco, ej. solubilidad y estabilidad; las características superficiales tales como carga y permeabilidad; el grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad, toxicidad, antigenicidad y el perfil de liberación del fármaco. Las NPs frecuentemente son preparadas mediante cuatro métodos: 1) dispersión de polímeros preformados; 2) polimerización de monómeros; y 3) gelación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos [69].

### **2.3.3. Principales características de las nanopartículas poliméricas**

Dentro de las aplicaciones en nanomedicina, el tamaño y forma de las NPs influyen directamente en la captación celular, la farmacocinética y farmacodinamia, reflejándose en el tiempo de circulación, depuración, distribución y destino intracelular. Con respecto al tamaño, se ha observado que NPs de 100-200 nm mejoran su absorción celular en células Caco-2. Por otra parte, NPs con tamaños inferiores a 100 nm son eliminadas por el RES, lo que reduce la eficiencia de captación debido al corto tiempo de circulación. Por lo tanto, el tipo de internalización es una función del tamaño de las NPs, el cual puede ser manipulado con base en la selección de los materiales (ej. polímero, surfactante y concentraciones) y los factores relacionados con el método de preparación (ej. el tipo de método, el diámetro de la boquilla, el índice de flujo, el agente de control, el monómero, el iniciador, la polimerización y los tipos de emulsión; lo que permite optimizar el tamaño [68].

En adición, las NPs han demostrado mejorar la eficacia de fármacos con una estrecha ventana terapéutica o baja biodisponibilidad. Los fármacos encapsulados en NPs son protegidos del metabolismo hepático antes de ser liberados, así como de la depuración renal debido a su tamaño,



mejorando así su biodisponibilidad [69]. La forma de las NPs también afecta la adhesión, el transporte, distribución y captación celular [70]. Ésta puede variar de esférica, cúbica, tipo bastón, entre otras formas. Las formas de partículas anisotrópicas permiten interacciones únicas con sistemas biológicos en procesos de adhesión, transporte, liberación del fármaco, tiempo de circulación y movimiento. Las NPs con forma de varilla pueden generar respuestas celulares muy diferentes, lo cual depende de la orientación de las NPs durante la interacción con las células. También se ha observado que NPs en forma de varilla experimentan mayores velocidades de internalización en comparación con NPs cilíndricas simétricas [68]

Estudios *in vitro* han demostrado que nanovarillas recubiertas con anticuerpos específicos son más propensas a la adhesión que sus homólogos esféricos, resultando en una mayor acumulación en cerebro [70]. La carga superficial de las NPs es otro parámetro importante que afecta su paso a través de BHE. Se ha demostrado que NPs con alto potencial zeta (alta carga positiva) causan toxicidad inmediata a la BHE [67]. Se sabe que las partículas cargadas positivamente forman agregados en presencia de las proteínas séricas cargadas negativamente. Los agregados son grandes y con frecuencia resultan en embolia transitoria en los capilares pulmonares. En adición, NPs neutras y zwitteriónicas tienen un tiempo de circulación más largo después de una administración intravenosa, en contraste con NPs con carga negativa y positiva [70].

La eficacia de las NPs para entrapar fármacos es una propiedad importante que depende básicamente de la solubilidad del fármaco en el polímero para sistemas PLA/PLGA (disolución o dispersión sólida), y está relacionada con la composición polimérica (relación láctico/glicólico), el peso molecular, las interacciones y la presencia de grupos funcionales finales (éster o carboxilo) [71]. Debido a que PLA y PLGA son polímeros hidrófobos, los fármacos lipófilos son más fáciles de formular (en estado disuelto) en nanopartículas PLA/mPEGPLA, que los hidrosolubles (segregación en dominios separados) [72]. Existen varios medios para optimizar la encapsulación del fármaco, dentro de estos se incluyen: la selección del procedimiento de preparación, el uso de aditivos, la optimización del pH de las fases acuosas, el uso de formas no ionizadas ya sea de fármacos ácidos o básicos, el peso molecular del polímero de bloques PLA/PLGA, entre otros [73].

En resumen, las investigaciones sugieren que existe un tamaño, geometría y carga superficial óptima de las NPs que permiten vectorizar de manera eficaz agentes terapéuticos cuyo destino es el SNC. Adicionalmente, la eficiencia de entrapamiento de este tipo de sistemas es un factor importante a considerar en la administración de agentes terapéuticos. Ahora se cuentan con distintas herramientas para optimizar estas propiedades y lograr los objetivos terapéuticos.



#### 2.3.4. Limitaciones de las nanopartículas poliméricas

A pesar de varias ventajas, las NPs tienen limitaciones. Por ejemplo, su pequeño tamaño y gran área superficial pueden conducir a la agregación partícula-partícula, haciendo su manejo físico difícil en formas líquidas o secas. Además, el pequeño tamaño de partícula y la gran área superficial resultan en una carga del fármaco reducida y liberación de tipo “abrupta”. Por lo tanto, estos problemas prácticos tienen que ser superados antes de que las NPs puedan utilizarse clínicamente. Puesto que ciertas NPs no son fácilmente eliminadas por los sistemas de eliminación fisiológica, podrían acumularse dentro de diferentes órganos vitales, incluyendo el cerebro y provocar citotoxicidad. Hasta la fecha, existen pocos estudios publicados sobre la neurotoxicidad inducida por NPs. El tamaño muy pequeño de las NPs a menudo resulta en mayor reactividad, lo que podría aumentar efectos tóxicos para las células. Además, algunos estudios *in vitro/in vivo* han demostrado que las NPs podrían causar neurodegeneración mediante la inducción de disfunciones mitocondriales, desequilibrio redox y apoptosis, alteraciones en la actividad lisosomal, alteraciones en el citoesqueleto, perturbaciones del tráfico vesicular, neuroinflamación y activación de microglía. Las propiedades que hacen que las NPs sean muy atractivas en la medicina, pueden contribuir a su perfil toxicológico en sistemas biológicos, ya que más superficie por unidad de masa los hace muy reactivos en el ambiente celular. Por lo tanto, cualquier toxicidad intrínseca de las NPs debe ser mejorada. Por estas razones, el equilibrio riesgo-beneficio del uso de NPs destinadas al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debe ser cuidadosamente evaluado. Al mantener las consideraciones de seguridad a la vanguardia, el uso de la nanotecnología para transportar agentes terapéuticos de manera eficaz y segura podría resultar ser una contribución significativa a la neurociencia [69,74].

### III. JUSTIFICACIÓN

La eficacia observada en estudios *in vitro* de nuevas moléculas propuestas para el tratamiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) no pueden ser trasladadas a ensayos clínicos, ya que, además de sus propiedades intrínsecas desfavorables como baja biodisponibilidad y pobre estabilidad en medios biológicos, existen diferentes barreras biológicas tales como la barrera hematoencefálica (BHE), las cuales impiden el paso de la mayoría de moléculas exógenas hacia el SNC. En particular, la Rapamicina, un fármaco capaz de activar la autofagia en células mamíferas, la cual es una de las más prometedoras estrategias terapéuticas utilizadas para combatir el cáncer y neurodegeneración, presenta varias desventajas como escasa solubilidad en agua, baja especificidad, efectos inmunosupresores e incapacidad para a travesar la BHE, desventajas que limitan su aplicación en sistemas biológicos.

En el campo de la nanotecnología farmacéutica, comúnmente se utilizan sistemas nanométricos de administración de fármacos para resolver problemas relacionados con la baja biodisponibilidad de los fármacos, efectos adversos, así como también, inestabilidad y problemas de dosificación. Estos nanotransportadores de fármacos presentan diversas ventajas tales como tamaño de partícula en el rango de 1 – 1000 nm, capacidad para incorporar fármacos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, controlar la liberación de los fármacos, estabilidad en fluidos biológicos y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos. Además, los nanotransportadores pueden ser funcionalizados superficialmente para vectorizar los fármacos hacia su sitio de acción superando las distintas barreras biológicas, incluso, pueden penetrar hasta el núcleo celular.

Con base en las ventajas que representa el uso de la nanotecnología en la vectorización de fármacos, en el presente trabajo se aprovechan todas estas propiedades para proponer un nanotransportador de Rapamicina basado en nanopartículas poliméricas que mediante recubrimientos superficiales con surfactantes, pueda tener importantes implicaciones en el diseño y desarrollo de novedosos sistemas de vectorización de fármacos hacia el SNC y, así, poder potenciar los tratamientos para los diferentes tipos de trastornos localizados en esta región.

**IV. HIPÓTESIS**

El desarrollo de nanopartículas poliméricas recubiertas con surfactantes de tamaños de partícula homogéneos, cargas superficiales neutras, alta estabilidad tanto física como química y capaces de contener fármacos liposolubles conservando su integridad; permitirá la obtención de un novedoso nanotransportador, el cual podría tener importantes implicaciones en el tratamiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central y, por consecuencia, aumentar la permeación de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, caracterizar y evaluar nuevos nanotransportadores de fármacos basados en nanopartículas poliméricas con superficie modificada que mediante sus propiedades fisicoquímicas sean capaces de mejorar el tratamiento de enfermedades localizadas en el Sistema Nervioso Central.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Preparar nanopartículas poliméricas cargadas con Rapamicina mediante el método de emulsificación-difusión.
- b) Investigar el efecto de los recubrimientos superficiales con surfactantes sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas: tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de entrapamiento de Rapamicina en las nanopartículas.
- c) Optimizar estadísticamente las variables de formulación de las nanopartículas poliméricas cargadas con Rapamicina y recubiertas con surfactantes.
- d) Caracterizar las nanopartículas optimizadas en términos de tamaño, distribución de tamaño, potencial zeta, eficiencia de entrapamiento, morfología y el estado físico de los componentes en la formulación.
- e) Evaluar la estabilidad de las nanopartículas optimizadas en almacenamiento mediante el seguimiento de sus propiedades fisicoquímicas.
- f) Investigar el impacto de la modificación superficial de las nanopartículas sobre la citotoxicidad mediante la determinación de la actividad mitocondrial e integridad del citoesqueleto de células glioma C6.

## VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

## 6.1. Diagrama de flujo de la metodología experimental.

La Figura 7 contiene el diagrama de flujo de las etapas involucradas en el desarrollo de esta investigación.

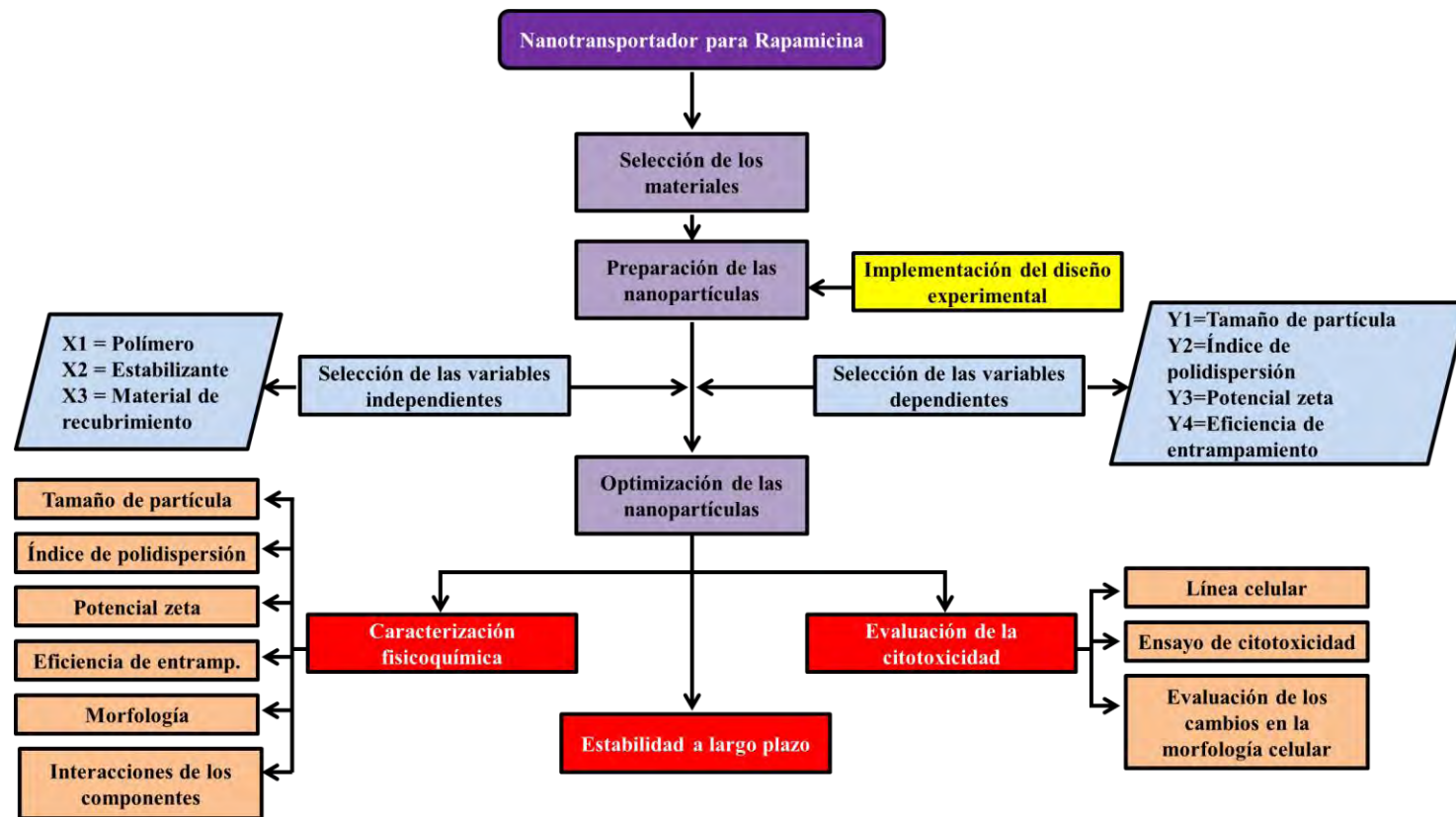


Figura 7. Diagrama de flujo experimental para el desarrollo de potenciales nanotransportadores de Rapamicina hacia el SNC.

## 6.2. Selección de los materiales

La selección de los materiales utilizados en el desarrollo de esta investigación se realizó con base en su funcionalidad y en sus perfiles de seguridad, cuyas estructuras moleculares se encuentran en la Figura 8. Todos los materiales utilizados han sido aprobados por la FDA para la administración de fármacos [75-76].

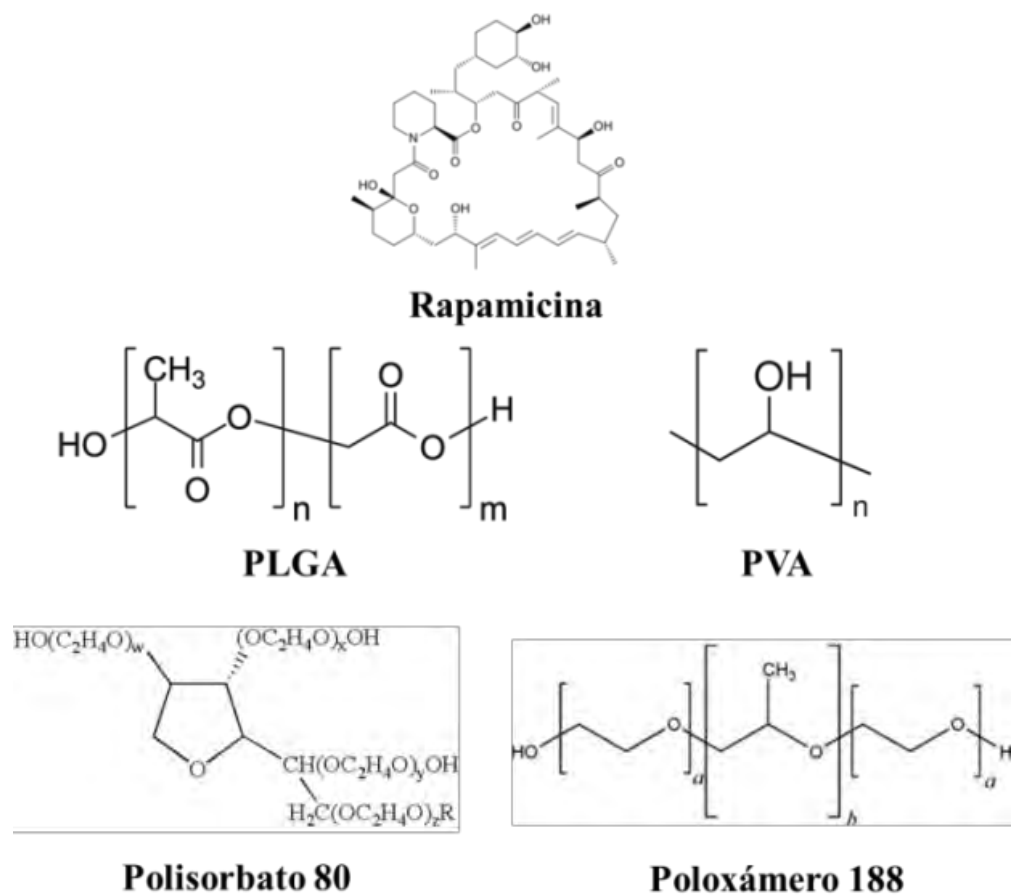


Figura 8. Estructuras químicas de los componentes utilizados.

### 6.2.1. Fármaco

Para este trabajo de investigación se seleccionó la Rapamicina como fármaco. La Rapamicina (RAP) es un macrólido obtenido de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que ha demostrado ser un compuesto versátil con varias propiedades farmacológicas, incluyendo antifúngica,

inmunosupresora y anticancerígena [36-37]. Aunque la Rapamicina promete alta potencia, su limitada solubilidad en agua (2.6  $\mu\text{g/mL}$ ), efectos inmunosupresores, baja especificidad, incapacidad de atravesar la BHE y baja biodisponibilidad oral limitan su uso clínico [75].

### 6.2.2. Materiales para las nanopartículas

Para la obtención de nanopartículas se seleccionaron los siguientes materiales: 1) el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), el cual es un polímero ampliamente utilizado en el desarrollo de sistemas de liberación inyectables, tales como micropartículas, nanopartículas, debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. 2) Alcohol polivinílico (PVA) ya que es el estabilizante más utilizado para preparar nanopartículas estables con distribuciones de tamaño estrechos. 3) Polisorbato 80 (P80) y poloxámero 188 (PLX188) como materiales de recubrimiento superficial de las nanopartículas, ya que se ha demostrado su alta eficacia para atravesar barreras biológicas tales como la barrera hematoencefálica y la membrana celular [60-61,76].

### 6.3. Preparación de las nanopartículas

Para la preparación de las nanopartículas se eligió el método emulsificación-difusión sobre otros métodos de preparación de nanopartículas tales como emulsificación- evaporación y nanoprecipitación. Con el método de emulsificación- evaporación se requiere trabajar con disolventes orgánicos potencialmente tóxicos y el método de nanoprecipitación produce pobres eficiencias de formación de nanopartículas y bajas eficiencias de entrapamiento de fármacos [77].

#### 6.3.1. Preparación de las nanopartículas de PLGA con rapamicina

Las nanopartículas de PLGA cargadas con Rapamicina se prepararon mediante el método de emulsificación-difusión conforme a lo reportado por Quintanar-Guerrero et al, Figura 9. Primero, el disolvente orgánico parcialmente soluble en agua (Acetato de etilo; AE, Fermont, Monterrey, México) y agua destilada se saturaron mutuamente durante 20 min antes de su uso para asegurar el equilibrio termodinámico de las fases. En seguida, el polímero (Poli (D,L-láctico-co-glicólico, 50:50); PLGA, DLG 4A, PM: 24,000–38,000, Lakeshore, Alemania) y el fármaco (Rapamicina 98%; RAP, Medipharma, México) se disolvieron en 20 mL del disolvente orgánico (previamente saturado con agua), la disolución acuosa anterior se emulsificó en 40 mL de una disolución acuosa (previamente saturada con disolvente) de estabilizante (Alcohol polivinílico; PVA, Mowiol<sup>®</sup>, PM: ~31,000; Sigma-Aldrich, México). La emulsificación se realizó empleando un agitador tipo rotor-estator (Ultraturrax<sup>®</sup> T18 Basic, IKA Labortechnik, EUA) a 11,000 rpm durante 10 min. Después,

a la emulsión orgánica aceite-en-agua formada se le adicionó 160 mL de agua destilada para conseguir la difusión del disolvente orgánico y provocar la agregación del polímero en nanopartículas. Posteriormente, las nanopartículas se colocaron en un rotaevaporador (Laborota<sup>®</sup> Heidolph 4000, Alemania) para inducir el desplazamiento directo del disolvente bajo presión reducida. Para eliminar el exceso de fármaco, disolvente y estabilizante, las nanopartículas se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 min en una ultracentrífuga (Optima<sup>®</sup> LE-80K, Beckman, EUA), el pellet resultante se lavó 3 veces con agua destilada y se resuspendió en una disolución acuosa de crioprotector (D-Manitol, JT Baker, EUA) al 5%. Finalmente, se liofilizaron durante 24 h a una presión < 100  $\mu$ bar y -50 °C en una liofilizadora (FreeZone<sup>®</sup>, Labconco, EUA). Para las nanopartículas de PLGA recubiertas con Polisorbato 80 (P80, Croda, México) o con poloxámero 188 (PLX188, Pluronic<sup>®</sup> F-68, Sigma-Aldrich, México), éstos se adicionaron a la fase acuosa antes de la emulsificación.



**Figura 9. Representación esquemática del método de preparación de las nanopartículas.**



### 6.3.2. Diseño experimental

Estudios preliminares y en literatura indican que las principales variables de formulación que influyen en la preparación de nanopartículas de PLGA mediante el método de emulsificación-difusión son la cantidad de polímero y la concentración de estabilizante. Además, en el presente trabajo pretendemos investigar el efecto del recubrimiento con P80 sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Es por ello que se implementó el diseño experimental Box-Behnken (DBB) para optimizar estadísticamente los parámetros de formulación y explicar los efectos principales y de interacción de las variables independientes sobre las características de las formulaciones liofilizadas. Se utilizó un DBB con tres variables independientes: cantidad de PLGA (mg); concentración de PVA (%); concentración de P80 (%), con tres niveles bajo, medio y alto. Las variables de respuesta seleccionadas fueron el tamaño de partícula (TP), índice de polidispersión (PDI), potencial zeta (PZ) y la eficiencia de entrapamiento (EE %) de la Rapamicina. La Tabla 3 resume los valores codificados de las diferentes variables.

**Tabla 3. Variables codificadas en el DBB para el desarrollo de las nanopartículas.**

Variables independientes (Factores)	Niveles codificados de las variables		
	Bajo	Medio	Alto
	- 1	0	1
$X_1$ = Cantidad de PLGA (mg)	100	200	300
$X_2$ = Concentración de PVA (%)	1	2	3
$X_3$ = Concentración de P80 (%)	0	0.5	1
<b>Variables dependientes (Respuestas)</b>	<b>Variables constantes</b>		
$Y_1$ = Tamaño de partícula (nm)	Cantidad de Rapamicina (10 mg)		
$Y_2$ = Índice de polidispersión	Velocidad de agitación (11,000 rpm)		
$Y_3$ = Potencial zeta (mV)	Tiempo de agitación (10 min)		
$Y_4$ = Eficiencia de entrapamiento (%)			

De acuerdo con el DBB, se prepararon 18 formulaciones de nanopartículas, que incluyen 12 puntos factoriales con 6 réplicas del punto central, éstas últimas para validar el método de preparación de nanopartículas elegido. Los experimentos se realizaron de forma aleatoria para erradicar posibles fuentes de sesgo (Tabla 4). Todas las respuestas observadas se ajustaron a los modelos lineal y cuadrático. Se determinaron ecuaciones polinomiales relacionando el efecto principal y los factores de interfase basándose en la evaluación de parámetros estadísticos tales como el coeficiente de

correlación múltiple ( $R^2$ ) y el coeficiente de correlación múltiple ajustado ( $R^2$ -adj). La correlación estadística de las ecuaciones polinomiales se estableció mediante ANOVA a través de la prueba de Fisher y se muestra por un valor-P por debajo de 0.05. Se utilizó el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II para la creación y evaluación del diseño experimental estadístico.

**Tabla 4. Composición del diseño experimental (DBB).**

For.	Orden	PLGA	PVA	P80	PLGA (mg)	PVA (%)	P80 (%)
1	10	-1	-1	0	100	1	0.5
2	4	1	-1	0	300	1	0.5
3	15	-1	1	0	100	3	0.5
4	9	1	1	0	300	3	0.5
5	8	-1	0	-1	100	2	0
6	18	1	0	-1	300	2	0
7	17	-1	0	1	100	2	1
8	11	1	0	1	300	2	1
9	7	0	-1	-1	200	1	0
10	2	0	1	-1	200	3	0
11	14	0	-1	1	200	1	1
12	16	0	1	1	200	3	1
<i>Puntos centrales</i>							
13	1	0	0	0	200	2	0.5
14	3	0	0	0	200	2	0.5
15	5	0	0	0	200	2	0.5
16	6	0	0	0	200	2	0.5
17	12	0	0	0	200	2	0.5
18	13	0	0	0	200	2	0.5

Una función polinomial de segundo orden puede modelar la relación matemática entre las variables dependientes ( $Y_i$ ) y las variables independientes ( $X_i$ ):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_2 X_2^2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_3 X_3^2$$

donde Y es la respuesta a predecir;  $\beta_0$  es el intercepto;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes lineales;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  son los coeficientes cuadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  y  $\beta_{23}$  son los coeficientes de las interacciones de la ecuación;  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son las variables independientes. Utilizando esta ecuación, es posible evaluar los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables independientes sobre la respuesta. Se dibujaron gráficas 3D de superficie de respuesta a partir de las ecuaciones polinomiales de

segundo orden mediante los cuales se realizó una búsqueda intensiva de los efectos en toda la región experimental. Con los gráficos 3D superficie de respuesta se puede estudiar el efecto de la interacción de los factores sobre las respuestas, así como también son útiles para estudiar el efecto simultáneo de cualquiera de los dos factores sobre la variable de respuesta manteniendo constante un tercer factor. Finalmente, con el uso de los gráficos 3D de superficie de respuesta comparamos el efecto de la purificación y liofilización de las nanopartículas sobre el TP, PDI y PZ de las mismas.

Para la optimización de la formulación de las nanopartículas liofilizadas, los valores óptimos de las variables se obtuvieron mediante los análisis matemático y gráfico utilizando el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II, basándose en el criterio de deseabilidad. Con el fin de mostrar gráficamente la relación y las interacciones entre las variables y la respuesta, se utilizó el gráfico de contorno. Los puntos óptimos se determinaron resolviendo la ecuación derivada del modelo cuadrático final. Las nanopartículas se prepararon utilizando las condiciones de la “formulación óptima”, y los valores experimentales resultantes de las respuestas se compararon cuantitativamente con los valores predichos para calcular el porcentaje del error predicho.

#### **6.4. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas**

##### **6.4.1. Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (PDI)**

El tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (PDI) de las nanopartículas se determinaron por la técnica dispersión dinámica de la luz mediante el uso de un contador submicrónico (Coulter® Nanosizer N4 Plus, EUA). La longitud de onda fue de 678 nm, empleando como fuente un láser de He/Ne de 10 mW. Se diluyeron 100 µL del sistema correspondiente en 25 mL de agua ultrapura (Simplicity UV®, Millipore, EUA) y las mediciones se efectuaron a un ángulo de 90°, durante 180 s, a una temperatura de 25°C. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en tres diferentes lotes.

##### **6.4.2. Potencial zeta (PZ)**

El potencial zeta (PZ) se determinó mediante micro-electroforesis láser Doppler y análisis de fase de dispersión de luz en un equipo Malvern Zetasizer® Nano HS (Malvern, RU), el cual emplea un láser de He/Ne de longitud de onda de 633 nm y 4mW. Se realizaron un promedio de 100 lecturas empleando como disolvente agua ultrapura a una temperatura de 25°C. Las determinaciones se realizaron por triplicado entre diferentes lotes.

### 6.4.3. Eficiencia de entrapamiento (EE) de Rapamicina en las nanopartículas

La EE se determinó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC). Se pesó una cantidad de nanopartículas equivalente a 1 mg de rapamicina y se agitaron durante 1 h a 650 rpm con metanol grado HPLC (Fermont, Monterrey, México). Al término de la agitación, el metanol resultante se filtró a través de filtros de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>, EUA) y se llevó a un volumen de 100 mL, se tomó una alícuota de 4 mL y se llevó a un volumen final de 25 mL. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de la disolución anterior a un cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución (Agilent 1290 Infinity LC System, EUA) columna fase inversa C<sub>18</sub> (50 mm, 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), la fase móvil fue una mezcla de metanol/agua (77:23), la longitud de onda fue 278 nm y la velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. La EE de la rapamicina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Peso de Rapamicina calculada}}{\text{Peso de Rapamicina adicionada}} \times 100$$

El método por UPLC fue validado en términos de adecuabilidad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y límite de cuantificación (Anexo 11.1). Los diversos parámetros de validación y los valores para la aceptación de la gama de parámetros de validación estaban de acuerdo con ambas directrices; ICH y FDA [78-79].

### 6.4.4. Morfología de las nanopartículas optimizadas

Se observó la morfología de la superficie de las nanopartículas optimizadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). La preparación de las muestras consistió en esparcir una gota de la suspensión de las nanopartículas sobre la superficie de un cubreobjetos dejándola secar a temperatura ambiente. También se analizaron las muestras secas (liofilizadas). Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una película de oro (~20 nm) utilizando un evaporador catódico *Sputter Coater* (JFC-1100, JEOL, Japón) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (LV-SEM JSM-5600, JEOL, Japón) con resolución de 5 nm, 7 kV y de 12 – 20 Pa de presión en la cámara de voltaje. Las micrografías se observaron a diferentes aumentos.

### 6.4.5. Evaluación de las interacciones de las nanopartículas optimizadas

Las interacciones de los componentes de las nanopartículas optimizadas se evaluaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un calorímetro (DSCQ10, de TA Instruments, EUA). Se pesaron de 2 a 3 mg de cada uno de los sistemas y componentes en celdas de aluminio no herméticas. Las celdas fueron selladas y colocadas en el equipo previamente calibrado y ajustado.

El barrido se llevó a cabo a temperaturas entre 0 y 280 °C, a una velocidad de 10 °C/min, bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL/min.

### 6.5. Estabilidad de las nanopartículas optimizadas

Los estudios de estabilidad de las nanopartículas optimizadas se realizaron manteniendo muestras de tales sistemas a  $25 \pm 2$  °C. El TP, PDI, PZ y EE se midieron a las 0, 2 y 4 semanas de su preparación. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en tres diferentes lotes.

### 6.6. Citotoxicidad de las nanopartículas optimizada

#### 6.6.1. Cultivo celular

Las células glioma C6 (*Rattus norvegicus*, ATTC CCL-107TM) se sembraron en placas de cultivo (24 pozos) a una densidad de 100,000 células/pozo. Las placas se incubaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (5000 UI/mL) y estreptomycin (5 µg/mL), manteniéndose los cultivos humidificados con una mezcla de 95:5 aire/CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h.

#### 6.6.2. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de la Rapamicina en disolución y cargada en las nanopartículas optimizadas contra células glioma C6 se evaluó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El ensayo de MTT determina la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar las sales de tetrazolio (color amarillo) a formazán (color azul). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, lo que permite la detección de muerte celular antes de que las células pierdan su integridad y forma. Para el ensayo de MTT, las células fueron expuestas a Rapamicina en disolución (RAP SLN) y cargada en PLGA-PVA NPs, PLGA-PVA-P80 NPs y PLGA-PVA-PLX188 NPs durante 72 h, 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de las exposiciones, el medio se reemplazó con una disolución de MTT (0.5 mg/mL) y se incubaron durante 4 h en un ambiente humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Posteriormente, el medio y MTT se removieron y los cristales de formazán insolubles formados se disolvieron con 400 µL de DMSO. Finalmente, la intensidad del producto se analizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas ELISA. Las concentraciones de rapamicina sola y en las nanopartículas fueron 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL concentración final/pozo. Los controles negativos y positivos fueron los pozos con medio DMEM y con 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM,

respectivamente. Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones de esterilidad. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la absorbancia presente en las muestras de células tratadas comparadas con un control (células no expuestas a tratamientos) con 100% de viabilidad celular. Los porcentajes de viabilidad celular y citotoxicidad se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia del test}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 - \text{Viabilidad celular (\%)}$$

### 6.6.3. Evaluación del citoesqueleto de actina

Para la detección de los cambios en la estructura celular, las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares de 12 mm previamente esterilizados, a una densidad de  $1 \times 10^5$ . Posterior a la exposición con los diferentes tratamientos, las células fueron fijadas con formalina acuosa al 10%, permeabilización con Tritón X100, y posteriormente las células se incubaron durante 20 min con faloidina rodaminada en PBS-1X para finalizar con su montaje en portaobjetos con medio DAPI. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Scope 40, Alemania) a 40X y para el análisis de imágenes se empleó el software ImageJ (National Institute of Health, EUA).

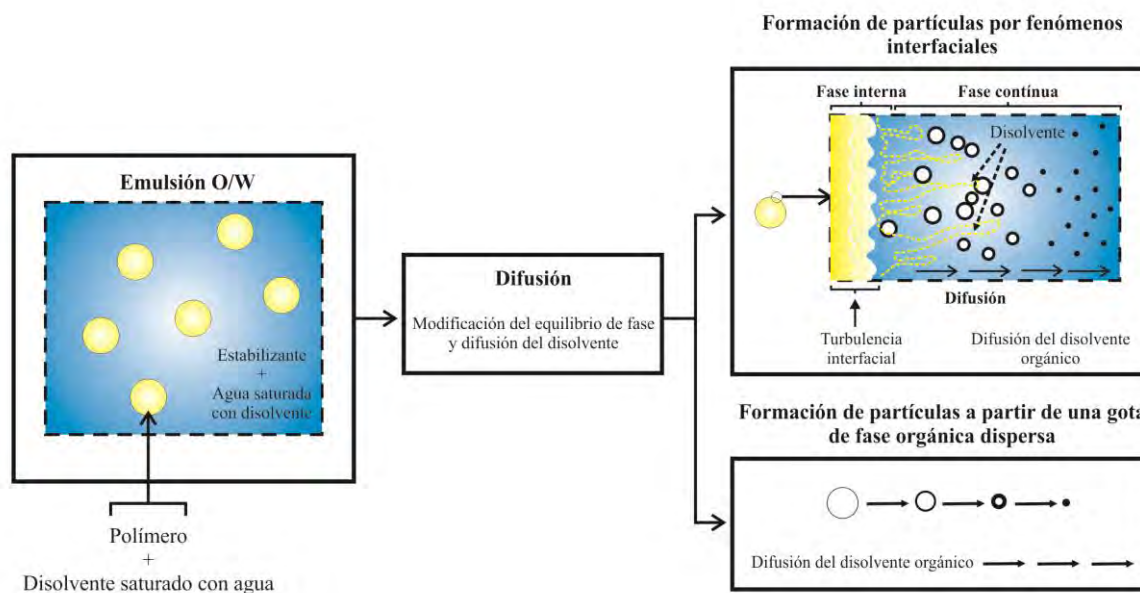
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Preparación y optimización de las nanopartículas

Se prepararon nanopartículas de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) recubiertas de Polisorbato 80 (P80) y cargadas con Rapamicina (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs) mediante el método de emulsificación-difusión propuesto por Quintanar-Guerrero et al. [80], un método que permite preparar nanopartículas de una manera simple, eficiente y reproducible. El método emulsificación-difusión para preparar nanopartículas requiere de tres fases: orgánica, acuosa y dilución. La fase orgánica es una disolución del polímero en un disolvente orgánico parcialmente miscible en agua, el cual previamente se satura con agua para lograr el equilibrio termodinámico de las fases. La fase acuosa es la disolución acuosa del agente estabilizante, preparada utilizando agua saturada con el disolvente orgánico. La fase de dilución es usualmente agua. Para preparar las nanopartículas, se adiciona la fase orgánica a la fase acuosa y con agitación mecánica se forma una emulsión en equilibrio termodinámico fase orgánica-en-fase acuosa. La emulsión resultante se diluye con la fase de dilución para permitir la difusión del disolvente orgánico hacia la fase acuosa, conduciendo a la formación de las nanopartículas. El disolvente orgánico y parte de la fase acuosa se remueven de las nanopartículas formadas por evaporación bajo presión reducida [81].

El mecanismo de formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión se ha explicado por una inestabilidad química producida por el transporte de disolvente [82], Figura 10. Por lo tanto, la difusión del disolvente desde los glóbulos hacia el agua transporta moléculas de polímero, formando regiones locales de sobresaturación a partir de las cuales se forman agregados poliméricos (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas “protonanopartículas” por la presencia de un agente estabilizante es de suma importancia para evitar la coalescencia y la formación de aglomerados. Por lo tanto, si el agente estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y si su efecto protector es adecuado, entonces se formarán las nanopartículas después de la completa difusión del disolvente orgánico [83]. No obstante, otro enfoque que explica la formación de nanopartículas mediante el método emulsificación-difusión sugiere que las partículas preparadas después de la difusión del disolvente se forman a partir de las gotas de la emulsión orgánica, Figura 10. Varios investigadores han demostrado que el tamaño de partícula es siempre menor que el tamaño de las gotas de la emulsión orgánica. Por lo tanto, el tamaño de las gotas de la emulsión orgánica rige el tamaño de partícula final y, en consecuencia, está directamente influenciado por todas las variables operativas relacionadas con la preparación de la emulsión y de los materiales de partida [84]. Además, etapas posteriores a la preparación de las

nanopartículas, tales como la purificación y la liofilización son procesos que impactan sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Por lo que se requiere la optimización de los parámetros de proceso y formulación para preparar nanopartículas con tamaños de partícula deseados, con estrechos índices de polidispersión, potenciales zeta adecuados y altas eficiencias de entrapamiento de fármacos [85].



**Figura 10. Representación esquemática de los aspectos mecanísticos relacionados con la formación de partículas mediante el método de emulsificación-difusión.**

La optimización de formulaciones mediante el uso de diseños estadísticos de experimentos es un enfoque poderoso, eficiente y logístico para el desarrollo de formas farmacéuticas. El diseño experimental representa la disparidad de las variables dependientes como una función de las variables independientes en un experimento bien diseñado con el menor número de experimentos de una manera sistemática y aleatoria. Por lo tanto, permite el establecimiento de parámetros óptimos mediante el modo adecuado de representación matemática y gráfica. El diseño experimental Box-Behnken (DBB) es una clase de diseños rotatables de segundo orden basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles que, efectivamente, puede prever modelos de respuesta no lineales, en comparación a los diseños de dos niveles los cuales limitan la predicción a modelos de respuesta lineales [87]. Por lo tanto, se utilizó un DBB con tres variables independientes;  $X_1$  = Cantidad de PLGA (g),  $X_2$  = Concentración de PVA (%),  $X_3$  = Concentración de P80 (%) con tres niveles y seis puntos centrales para un total de 18 tratamientos. La Tabla 5 muestra las variables de respuesta en



función de los factores investigados para la nanopartículas liofilizadas. Es evidente que las tres variables independientes tienen efecto sobre las 4 variables de respuesta;  $Y_1 = TP$  (nm),  $Y_2 = PDI$ ,  $Y_3 = PZ$  (mV) y  $Y_4 = EE$  (%).

**Tabla 5. Variables de respuesta observadas en el diseño experimental para las nanopartículas.**

Formulación	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
1	296.1±3.4	0.243±0.032	-18.27±0.52	3.48±0.16
2	395.9±5.9	0.19±0.005	-16.89±0.5	15.94±0.57
3	211±4.3	0.123±0.042	-11.73±0.25	3.24±0.34
4	335.6±4.5	0.342±0.004	-14.59±0.45	17.52±0.16
5	245.6±3.5	0.047±0.044	-17.01±0.29	35.69±1
6	276.4±1.2	0.081±0.01	-14.18±0.35	54.83±0.58
7	285.2±1.4	0.365±0.014	-11.22±0.29	1.17±0.12
8	451±7.2	0.571±0.017	-14.52±0.36	8.43±0.11
9	308.2±2.6	0.074±0.009	-17.47±0.32	45.68±0.41
10	249.8±4.6	0.078±0.02	-11.93±0.44	36.2±0.22
11	565.2±9.3	0.562±0.006	-15.21±0.48	4.72±0.03
12	311.9±2.4	0.424±0.034	-11.27±0.22	4.75±0.11
<i>Puntos centrales</i>				
13	275.1±5.5	0.248±0.03	-11.87±0.42	12.52±0.26
14	285.5±5.9	0.264±0.024	-11.73±0.41	12.77±0.68
15	278.3±9.8	0.23±0.026	-12.34±0.58	13.24±0.34
16	291.7±4.5	0.228±0.009	-12.19±0.56	12.44±0.16
17	276.4±2.6	0.228±0.025	-12.18±0.34	12.49±0.3
18	281.4±5.4	0.234±0.022	-12.33±0.24	12.57±0.22

Notas: TP = Tamaño de partícula. PDI = Índice de polidispersión. PZ = Potencial zeta. EE = Eficiencia de entrapamiento. Promedio ± desviación estándar (n = 3).

### 7.1.1. Ajuste y validación del modelo

Todas las respuestas observadas para las 18 formulaciones liofilizadas se ajustaron simultáneamente al modelo lineal y cuadrático. En la Tabla 6 se desglosa el análisis comparativo del ajuste del tipo modelo donde se observó que el modelo mejor ajustado para todas las variables dependientes fue el modelo cuadrático ( $R^2$  y  $R^2$ -adj > 0.90). Este modelo contempla los efectos de las variables independientes, sus interacciones y los efectos cuadráticos. De acuerdo a la literatura, los modelos cuadráticos tienen buen ajuste y describen adecuadamente el comportamiento de los datos cuando los valores teóricos obtenidos son similares a los experimentales indicando un buen arreglo cuando valores-P < 0.05 y  $R^2$  > 0.85 [89].

Tabla 6. Ajuste de los datos al modelo lineal y cuadrático.

Modelo	TP		PDI		PZ		EE	
	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> -Adj	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> -Adj	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> -Adj	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> -Adj
Lineal	0.7130	0.6514	0.8879	0.8640	0.5398	0.4412	0.8096	0.7688
Cuadrático	0.9564	0.9074	0.9870	0.9723	0.9864	0.9710	0.9944	0.9881

Notas: R<sup>2</sup> = Coeficiente de correlación. R<sup>2</sup>-adj = Coeficiente de correlación ajustado.

La Tabla 7 muestra el análisis de coeficientes del modelo cuadrático y los valores-P indicativos del nivel de significancia de las variables independientes. Los coeficientes con un factor en las ecuaciones polinomiales cuadráticas se atribuyen al efecto principal de ese factor en particular, mientras que los coeficientes con más de un factor se atribuyen a la interacción entre esas variantes. Un coeficiente positivo del factor indica la existencia de una relación directa entre el factor y la respuesta, mientras que, un coeficiente negativo del factor indica un efecto opuesto [88].

Tabla 7. Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta en función de los factores estudiados.

Ter	TP (nm)		PDI		PZ (mV)		EE (%)	
	Coef	Valor-P	Coef	Valor-P	Coef	Valor-P	Coef	Valor-P
$\beta_0$	372.75		0.2314		-38.7667		24.4717	
$\beta_1$	0.3842	0.0004	-0.0006	0.0005	0.1046	0.1248	0.0901	0.0000
$\beta_2$	-165.763	0.0002	-0.1219	0.1975	10.8117	0.0000	4.7746	0.1087
$\beta_3$	28.675	0.0001	0.2058	0.0000	11.2742	0.0001	-86.0142	0.0000
$\beta_{11}$	-0.0008	0.5283	-0.0000	0.2203	-0.0002	0.0000	-0.0000	0.8529
$\beta_{12}$	0.062	0.6374	0.0006	0.0007	-0.0106	0.0008	0.0058	0.5109
$\beta_{13}$	0.675	0.0285	0.0009	0.0101	-0.0306	0.0001	-0.0594	0.0078
$\beta_{22}$	36.2375	0.0173	0.0022	0.8644	-1.5004	0.0001	-2.3471	0.0197
$\beta_{23}$	-97.45	0.0049	-0.0710	0.0244	-0.8	0.0818	4.755	0.0225
$\beta_{33}$	164.55	0.0094	0.1747	0.0075	-1.4516	0.0961	50.0517	0.0000

Notas:  $\beta_0$  = Coeficiente de regresión,  $\beta_i$  = Coeficiente lineal,  $\beta_{ii}$  = Coeficientes cuadráticos y  $\beta_{ij}$  = Coeficientes de interacción. Terminos no significativos (Valor-P > 0.05), Terminos significativos (Valor-P < 0.05).

La validación del método de preparación se demostró mediante la medición de la variación de las cuatro respuestas de los seis puntos centrales, Figura 11. En el Anexo 11.1. se encuentra el análisis estadístico correspondiente. Los porcentajes de los coeficientes de variación (% CV) para las cuatro respuestas fueron inferiores al 5% [89].

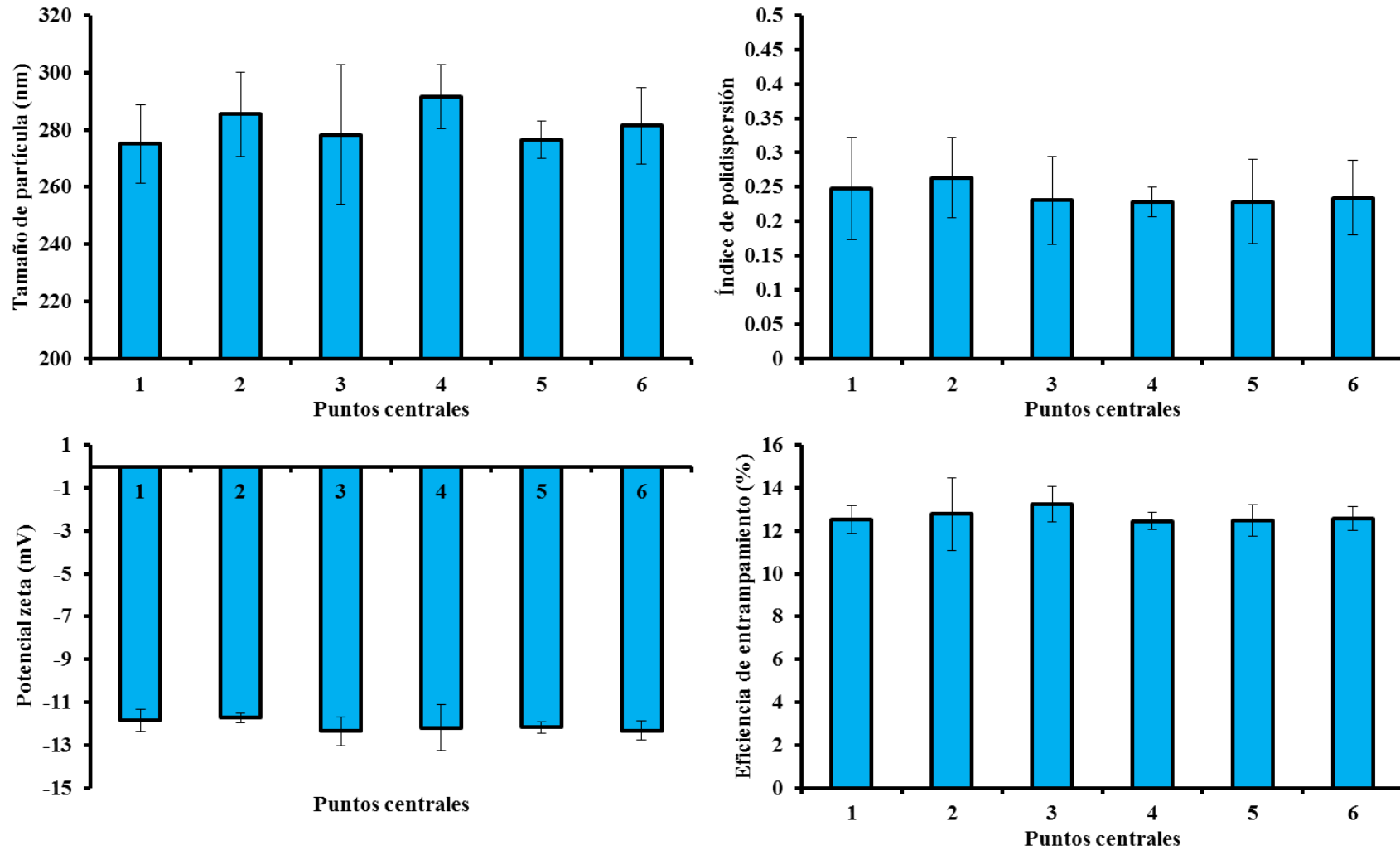


Figura 11. Precisión del método de preparación de las nanopartículas. Promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 3$ ).

### 7.1.2. Tamaño de partícula (TP)

El tamaño de partícula (TP) es una característica crítica para los sistemas de administración de fármacos en nanoescala, ya que, influye en el tiempo de vida media, la captación celular y la biodistribución [90]. Como la captación celular es dependiente del tamaño, las partículas más pequeñas podrían ser tomadas en mayor medida que las partículas más grandes [91]. La cinética de liberación del fármaco también depende del TP. Normalmente, cuanto menor sea el TP, más rápida será la velocidad de liberación [92].

El diseño experimental Box-Behnken realizado sugiere que la relación entre los diferentes factores y el TP puede ser explicada mediante el modelo matemático cuadrático. Los coeficientes  $R^2$  y  $R^2$ -adj fueron 0.9564 y 0.9073, respectivamente, los cuales pueden explicar más del 90% de la variabilidad de la respuesta (TP). De acuerdo con el diseño experimental, las tres variables independientes estudiadas tuvieron efectos significativos sobre el TP (Valores-P < 0.05). Estos efectos pueden ser explicados en términos significativos mediante la siguiente ecuación de regresión polinomial:

$$TP (Y_1) = 372.75 + 0.38425X_1 - 165.763X_2 + 28.675X_3 + 0.675X_1X_3 + 36.2375X_2^2 - 97.45X_2X_3 + 164.55X_3^2$$

Considerando todas las formulaciones de la Tabla 5, el rango del TP fue entre  $211 \pm 4.3$  (F-3) y  $565.2 \pm 9.3$  (F-11). Las gráficas 3D de superficie de respuesta (Figura 12), muestran que la concentración de PLGA y la concentración de P80 tuvieron un efecto positivo sobre el tamaño de partícula. Es decir, si se aumentan cualquiera de estas variables independientes, el tamaño de partícula también aumentará. Las Formulaciones F-2, F-4, F-6 y F-8, las cuales contienen una mayor cantidad de PLGA, comparativamente muestran un tamaño de partícula mayor que las formulaciones F-1, F-3, F-5 y F-7, respectivamente, las cuales contienen menor cantidad de PLGA. El efecto de la concentración de PLGA sobre el TP puede ser explicado tomando en consideración la viscosidad de la fase orgánica. Incrementando la concentración de PLGA, la viscosidad de la fase orgánica incrementa. Una mayor viscosidad implica un esfuerzo cortante neto más bajo, conduciendo a la formación de gotas de la emulsión orgánica de mayor tamaño. Además, como resultado del aumento de la viscosidad, la difusión del disolvente orgánico en la fase acuosa se ralentiza, provocando la formación de gotas más grandes, que a su vez producen nanopartículas más grandes [93]. Por otro lado, una mayor concentración de PLGA favorece las interacciones

polímero-polímero, por lo tanto, más cadenas permanecen asociadas durante la difusión del disolvente en el medio acuoso [94].

La comparación del TP entre las formulaciones que solo varían en la concentración de P80, F-9 (0% P80) y F-11 (1% P80), mostró que al aumentar la concentración de P80 incrementa el TP de  $308.2 \pm 2.6$  nm a  $565.2 \pm 9.3$  nm, respectivamente. Este fenómeno puede ser debido al aumento de la viscosidad ocasionada por el P80, conduciendo a una excesiva adsorción de P80 en la superficie de las nanopartículas [95]. En contraste de estos hallazgos, la concentración de PVA tuvo un efecto negativo sobre el TP, efecto observado en las formulaciones F11 (1% PVA) y F12 (3% PVA) donde el aumento de la concentración de PVA condujo a la reducción del TP de  $565.2 \pm 9.3$  nm a  $311.9 \pm 2.4$  nm, respectivamente. Esto puede explicarse, ya que, el PVA puede orientarse en la interfase entre la disolución orgánica y el medio acuoso, reduciendo de este modo la tensión interfacial y, aumentando así, el esfuerzo cortante neto. Esto promueve la formación de partículas de tamaño pequeño [96]. Un amplio estudio reológico demostró que el PVA interactúa fuertemente con el ácido poli(láctico) (PLA) en la región interfacial durante la preparación de micropartículas mediante un proceso basado en emulsión aceite-en-agua [97]. Estos autores concluyeron que la región interfacial es la localización de la adsorción irreversible de PVA y que hace muy difícil su eliminación de la superficie de las micropartículas. Además, se ha observado una fuerte adsorción de PVA en la superficie de nanopartículas de PLGA mediante la fijación de grupos hidroxilo de moléculas de PVA a los grupos acetilo de PLGA mediante unión hidrófoba [98]. El mecanismo de unión de PVA a la superficie de nanopartículas de PLGA puede ser debido a la interpenetración de moléculas de PVA sobre PLGA durante la preparación de las nanopartículas. El segmento hidrofóbico de acetato de vinilo del PVA parcialmente hidrolizado se interpenetra con la molécula PLGA cuando el disolvente orgánico se difunde hacia la fase acuosa durante la etapa de dilución. Se encontró que la cantidad de PVA adsorbido en la superficie de las nanopartículas aumenta conforme aumenta la concentración de PVA en la fase acuosa [99]. Algunos autores han propuesto que el PVA puede adsorberse en la superficie de las nanopartículas en multicapas [81].

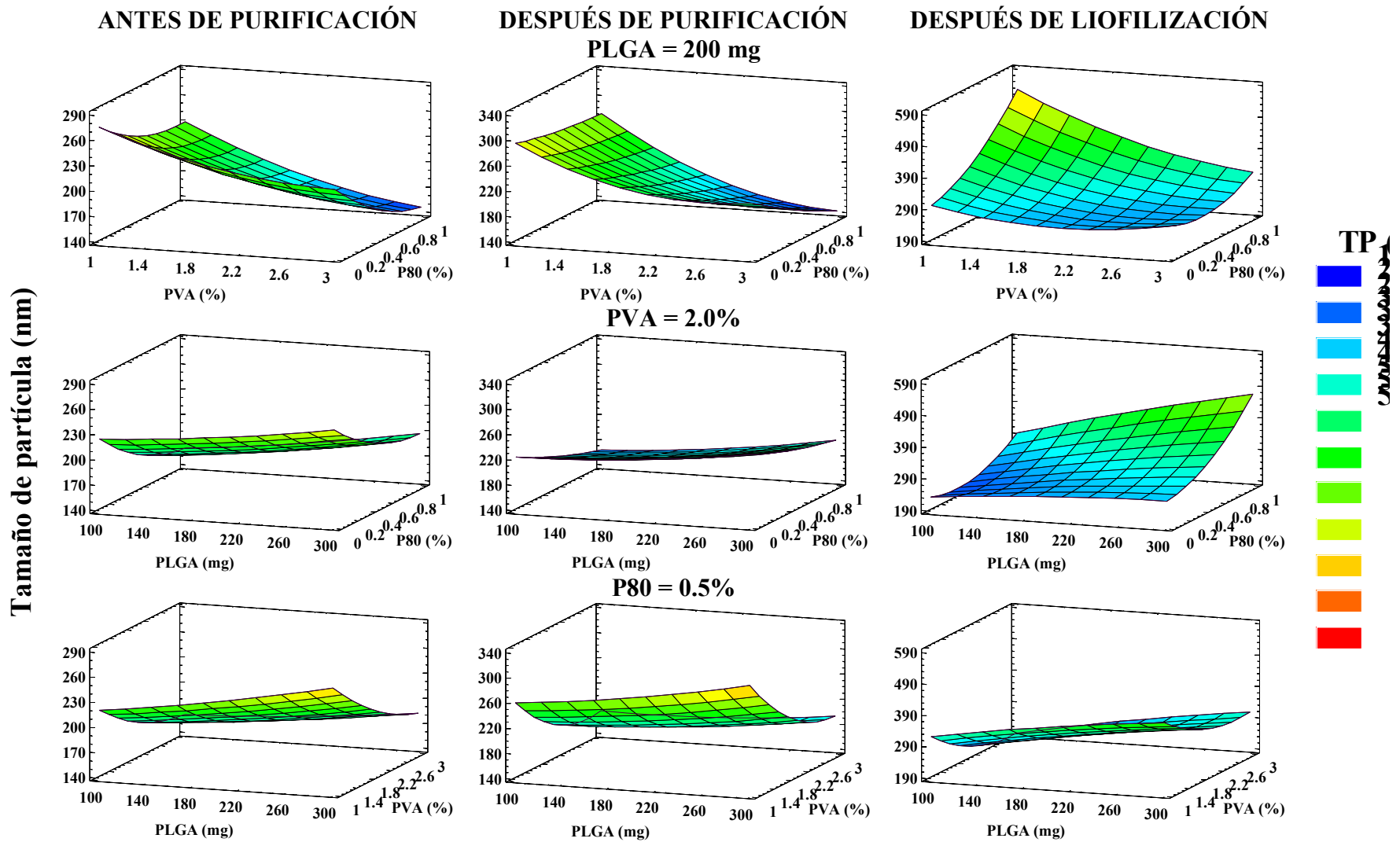


Figura 12. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el tamaño de partícula.

### 7.1.3. Índice de polidispersión (PDI)

El índice de polidispersión (PDI) es una propiedad importante que se utiliza para describir la variación del TP en una población de partículas. Con mayor frecuencia, el tamaño de una población de partículas sigue una distribución multimodal. Cuando el valor de PDI es cercano a 1, el rango de tamaño tiene una mayor dispersión, mientras que un valor cercano a 0 es lo óptimo [92].

Los coeficientes  $R^2$  y  $R^2$ -adj fueron de 0.9870 y 0.9723, respectivamente, donde se observa que el modelo cuadrático es el mejor modelo que explica la variabilidad del PDI. La ecuación de regresión polinomial en términos significativos para el PDI es la siguiente:

$$\text{PDI } (Y_2) = 0.231417 - 0.000629167X_1 + 0.205833X_3 + 0.00068X_1X_2 + 0.00086X_1X_3 - 0.071X_2X_3 + 0.174667X_3^2$$

El PDI varió de  $0.047 \pm 0.044$  (F-5) a  $0.571 \pm 0.017$  (F-8). La ecuación anterior y las gráficas 3D superficie de respuesta (Figura 13) muestran que la concentración de P80 tiene un coeficiente positivo y, por lo tanto, se puede considerar como el factor más importante que influye en el PDI. Cuando P80 se adiciona a las nanopartículas, se observa un aumento en el TP e PDI. Al parecer, el P80 no es capaz de formar estables emulsiones acetato de etilo-en-agua o prevenir la coalescencia de las gotas de estas emulsiones durante la difusión del disolvente orgánico [96]. No obstante, el PDI también fue influenciado en menor medida, por la concentración de PLGA. Se podría decir que una mayor cantidad de PLGA promueve la formación de poblaciones de nanopartículas mucho más homogéneas. La concentración de PVA no tuvo efectos significativos en el PDI. Sin embargo, su presencia es fundamental para obtener nanopartículas estables y con tamaños de partícula uniformes [96].

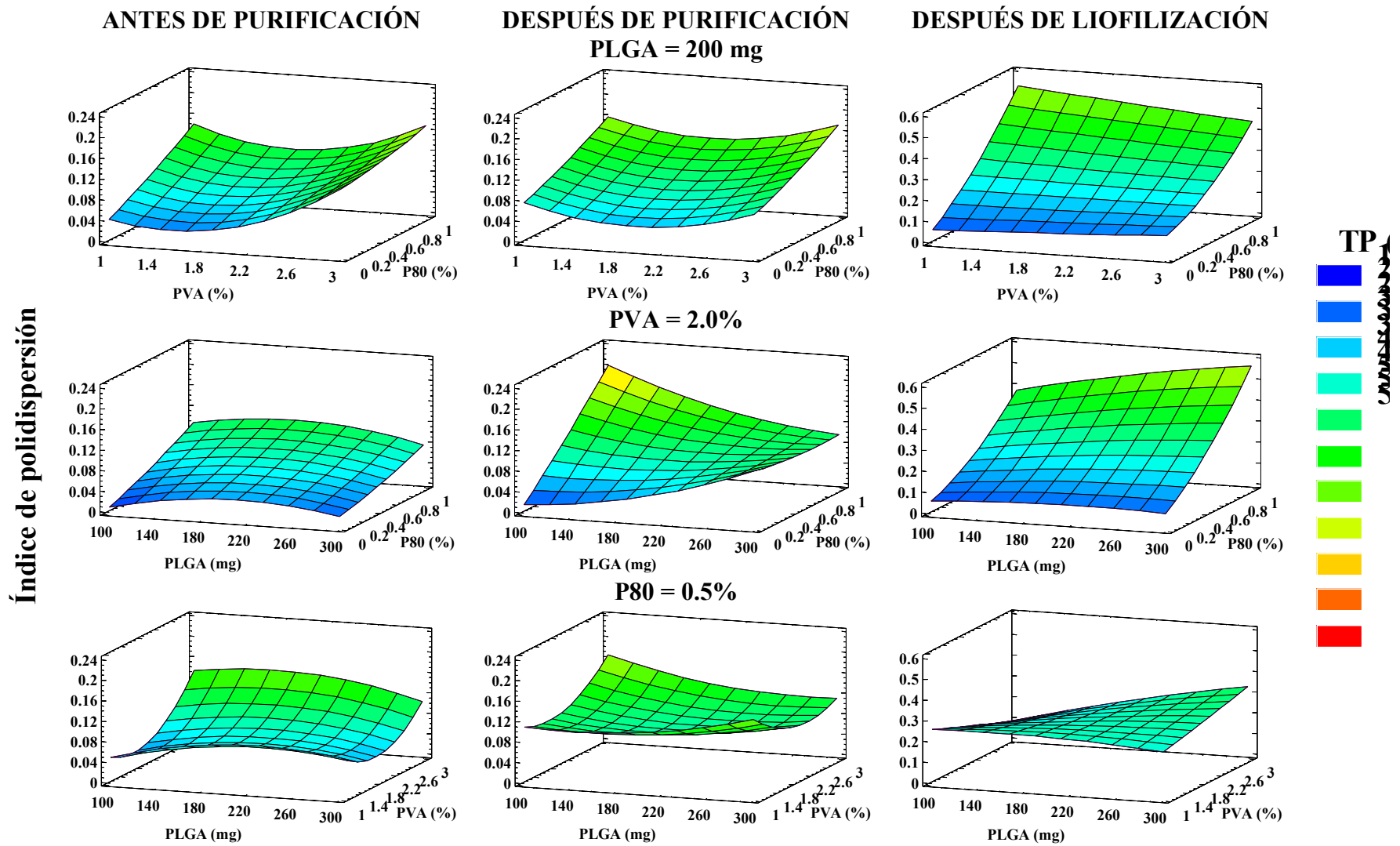


Figura 13. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el índice de polidispersión.



#### 7.1.4. Potencial zeta (PZ)

El potencial electrostático también conocido como potencial zeta (PZ) es una característica clave que ofrece información importante sobre la estabilidad de las dispersiones coloidales y puede ayudar a predecir la falla de las nanopartículas en estudios *in vivo* [100]. Se crea por la carga eléctrica presente en la superficie de las nanopartículas. Las nanopartículas con PZ de -10 mV a +10 mV se consideran neutras [93]. Por otro lado, un PZ inferior a -30 mV o superior a +30 mV es un indicador de una dispersión muy estable [101]. A mayores valores de PZ, las fuerzas repulsivas entre partículas de carga similar impiden su agregación lo que aumenta su estabilidad [91]. Sin embargo, para el pasaje a través de barreras biológicas, tales como la BHE, se prefieren nanopartículas con PZ neutro.

Los coeficientes  $R^2$  y  $R^2$ -adj del modelo cuadrático fueron 0.9864 y 0.9710, respectivamente. La ecuación de regresión polinomial en términos significativos para el PZ se describe a continuación:

$$PZ (Y_3) = -38.7667 + 10.8117X_2 + 11.2742X_3 - 0.000176292X_1^2 - 0.0106X_1X_2 - 0.03065X_1X_3 - 1.50042X_2^2$$

El rango del PZ en las 18 formulaciones preparadas varió de  $-18.27 \pm 0.52$  mV (F-1) a  $-11.22 \pm 0.29$  mV (F-7). La Figura 14 la cual contiene las gráficas 3D superficie de respuesta muestra el efecto de los factores estudiados sobre el PZ. De acuerdo con lo observado, las concentraciones de PVA y P80 son los principales factores que influyen en el PZ. En menor medida la concentración de PLGA. Diferentes estudios sugieren que la carga superficial de las nanopartículas de PLGA sin estabilizantes es de aproximadamente -45 mV. Como se ha mencionado anteriormente, esto se atribuye a los grupos terminales carboxílicos del polímero. La adición de PVA disminuye el PZ de las formulaciones. El PVA se considera un estabilizante no iónico, el cual forma una capa protectora alrededor de las nanopartículas y, como se mencionó anteriormente, a pesar de lavados repetidos, no puede ser completamente eliminado de la superficie de las partículas [102-103]. Este efecto puede ser visto en la formulación F-10 (3% PVA), la cual presentó un PZ menos negativo ( $-11.93 \pm 0.44$  mV) en comparación con la formulación F-9 (1% PVA) donde su PZ fue de  $-17.47 \pm 0.44$  mV. Esto puede ser debido a que el recubrimiento con PVA oculta la carga superficial de las nanopartículas de PLGA [96]. El recubrimiento de las nanopartículas con P80 también redujo el PZ, lo que también sugiere un posible efecto de enmascaramiento de la carga superficial.

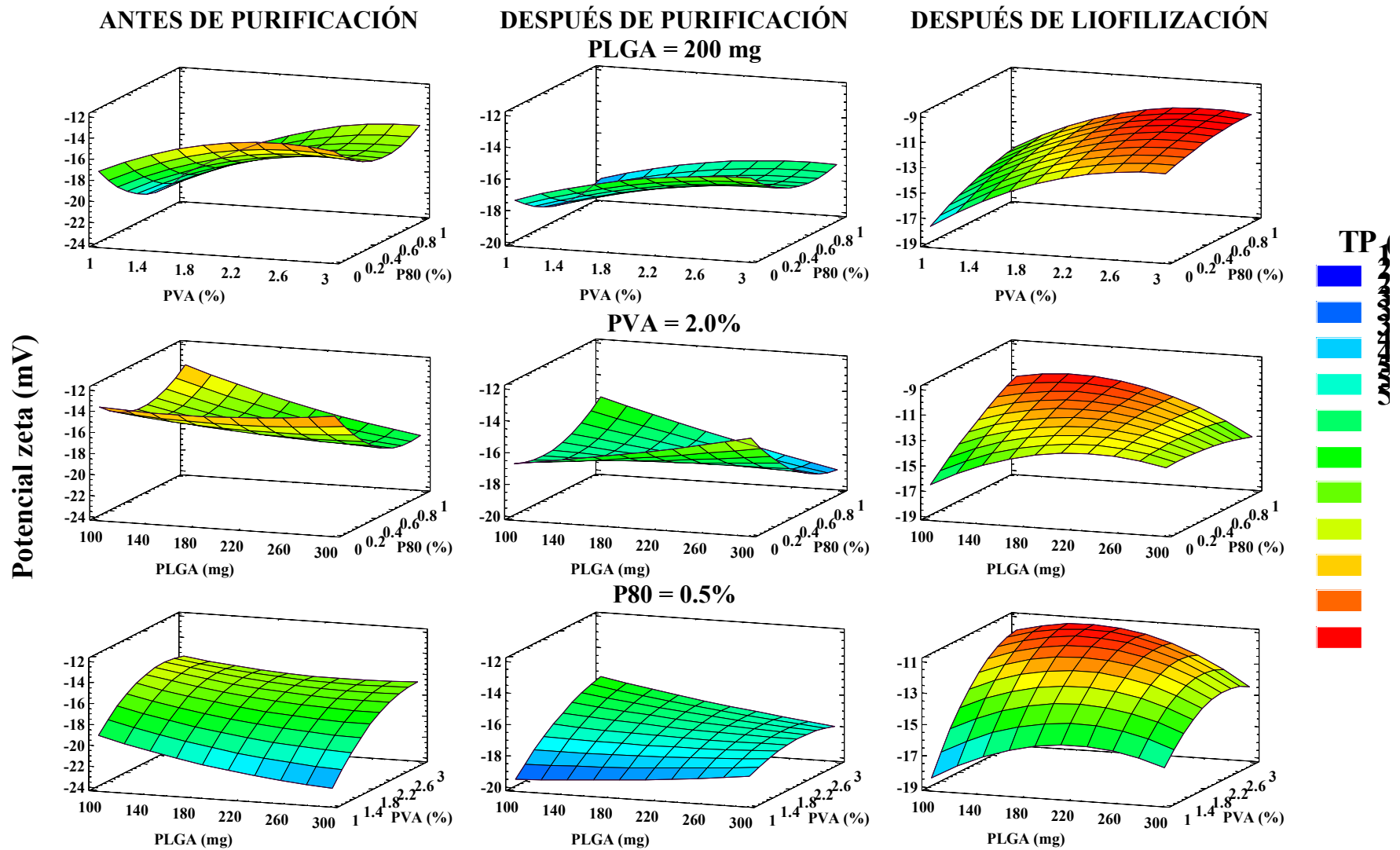


Figura 14. Gráficos 3D de superficie de respuesta para el potencial zeta.

### 7.1.5. Eficiencia de atrapamiento (EE)

La eficiencia de atrapamiento (EE) de Rapamicina en las formulaciones de nanopartículas también se ajustó mejor al modelo cuadrático. Los coeficientes  $R^2$  y  $R^2$ -adj fueron 0.9944 y 0.9881, respectivamente. La ecuación de regresión polinomial en términos significativos para la EE es la siguiente:

$$EE (Y_4) = 24.4717 + 0.0900833X_1 - 86.0142X_3 - 0.0594X_1X_3 - 2.34708X_2^2 + 4.755X_2X_3 + 50.0517X_3^2$$

El rango encontrado para la EE en las 18 formulaciones fue de  $1.17 \pm 0.52$  (%) (F-7) a  $54.83 \pm 0.29$  (%) (F-6). Las gráficas 3D superficie de respuesta en la Figura 15 muestran los efectos de las variables independientes sobre la EE. Una mayor EE podría alcanzarse aumentando la concentración de PLGA. Como evidencia; las formulaciones F-2, F-4, F-6 y F-8 las cuales contienen la mayor cantidad de PLGA (300 mg), comparativamente mostraron la mayor EE que las formulaciones F-1, F-3, F-5 y F-7, respectivamente, las cuales contienen la menor cantidad de PLGA (100 mg). Esto podría deberse al hecho de que mayores cantidades de polímero condujeron a disoluciones orgánicas más viscosas. Por un lado, como se mencionó anteriormente, cuanto mayor es la viscosidad, menor es la tensión de cizallamiento neto, lo que daría como resultado partículas de mayor tamaño. Las nanopartículas más grandes proporcionan suficiente superficie para que las moléculas de Rapamicina sean atrapadas. Por otro lado, un aumento de la viscosidad podría obstaculizar la difusión del fármaco desde la fase orgánica hacia la fase acuosa, y por lo tanto promover el atrapamiento de Rapamicina [104]. La naturaleza del fármaco juega un papel importante en la eficiencia de atrapamiento del fármaco debido a que éste es atrapado en la fase orgánica. La Rapamicina es un fármaco lipofílico, y su solubilidad es mayor en disolventes orgánicos. Se ha observado que un incremento en la cantidad de PLGA el cual reduce la partición del fármaco dentro y fuera de la fase orgánica conduce al aumento de la EE del fármaco en las nanopartículas. Por otro lado, las altas concentraciones de PVA y P80 mejoran la solubilidad de rapamicina en agua [104]. Por lo tanto, más moléculas de fármaco pasarían a la fase acuosa, dejando menos moléculas de Rapamicina para ser atrapadas en las nanopartículas. En nuestro estudio, la ausencia de P80 en las formulaciones F-5, F-6, F-9 y F-10, condujeron a la mayor EE de Rapamicina en las nanopartículas.

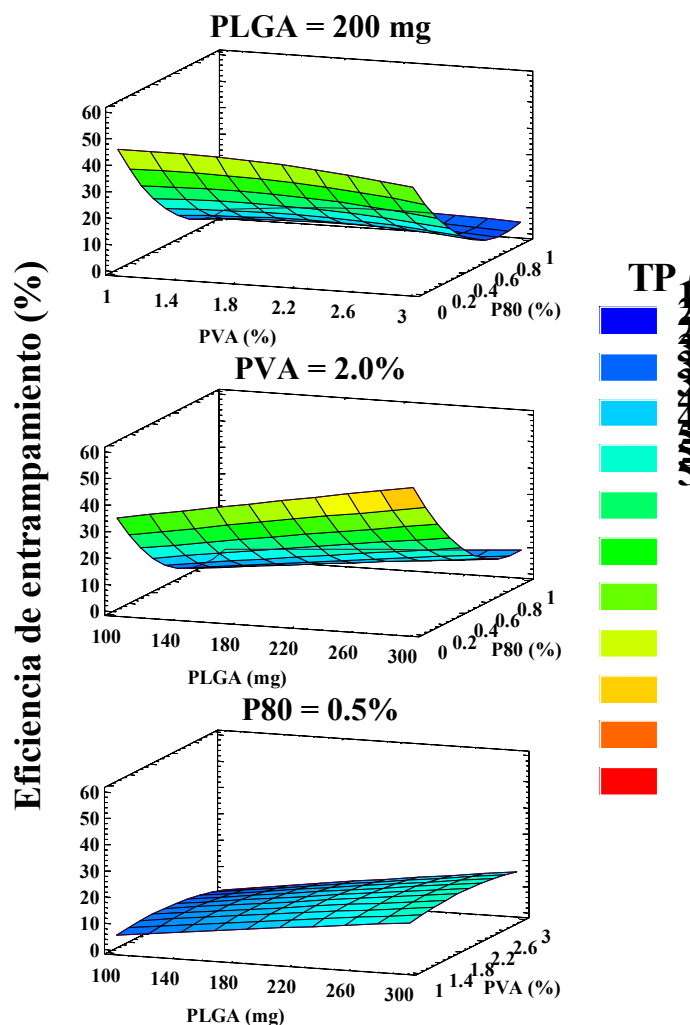


Figura 15. Gráficos 3D de superficie de respuesta para la eficiencia de entrapamiento.

#### 7.1.6. Efecto de la purificación y liofilización sobre el TP, PDI y PZ de las nanopartículas

Considerando la estabilidad de las nanopartículas de PLGA, se estudió el efecto de los procesos de purificación y liofilización sobre el TP, PDI y PZ. Estos procesos juegan un papel importante en la determinación del TP, PDI y PZ finales de las nanopartículas. Las respuestas observadas en las gráficas 3D superficie de respuesta antes de purificación, después de purificación y después de liofilización se encuentran en la Figura 12 (*tamaño de partícula*), Figura 13 (*índice de polidispersión*) y Figura 14 (*potencial zeta*).

La purificación es un proceso por el cual se elimina ya sea por diálisis o ultracentrifugación el exceso de fármaco, estabilizante y disolvente orgánico de las nanopartículas. En este estudio utilizamos ultracentrifugación ya que este método de purificación no modificó de manera sustancial

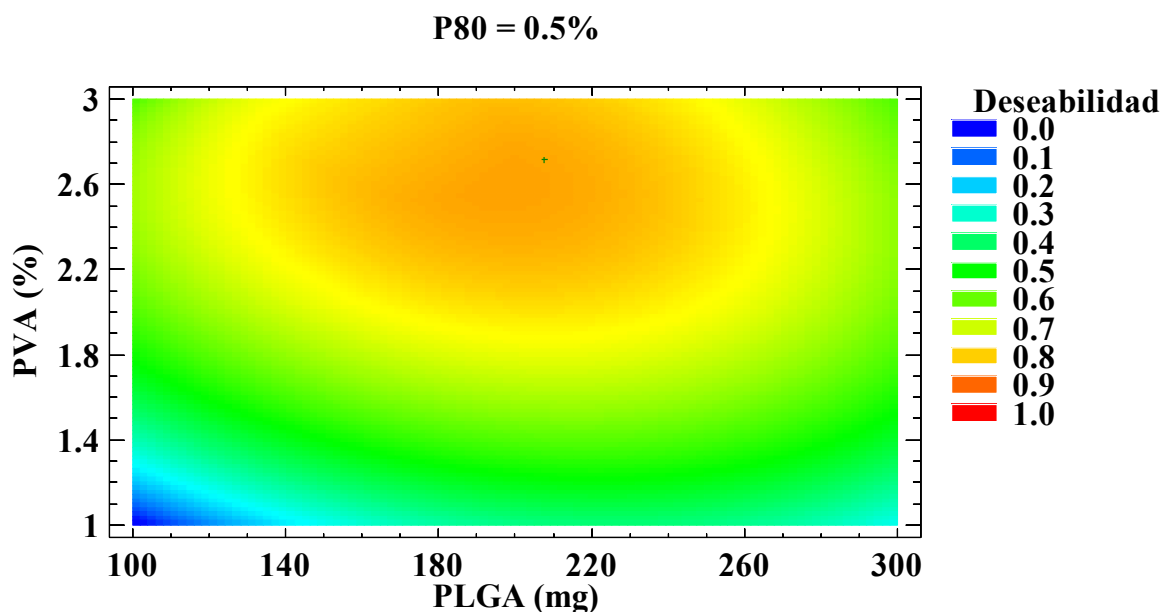
el TP, PDI y PZ de las nanopartículas y pudo eliminar el PVA no asociado a las nanopartículas sin la formación de agregados. En estudios previos, se encontró que el disolvente orgánico residual que se mantuvo después de la evaporación del mismo bajo presión reducida es menor de 450 ppm [99]. Sin embargo, después de la eliminación de PVA no asociado a las nanopartículas, las nanopartículas purificadas a menudo no pueden resistir al estrés ocasionado por la liofilización y forman grandes agregados. Para mejorar la estabilidad física y química de las nanopartículas se requiere la remoción del agua. La liofilización es el proceso más comúnmente utilizado en campo farmacéutico para convertir disoluciones o suspensiones en sólidos con estabilidad suficiente para su distribución y almacenamiento. Este proceso consiste en la remoción del agua a partir de una muestra congelada por sublimación y desorción bajo vacío [84]. Sin embargo, este proceso genera estrés durante los pasos de congelamiento y secado. La multicapa formada por PVA en la superficie de las nanopartículas puede mejorar su estabilidad frente a la liofilización [79].

Durante la etapa de congelamiento las suspensiones de nanopartículas pueden sufrir cambios drásticos. La cristalización del hielo conduce a una fase de separación y crioconcentración de las nanopartículas [99]. Tal modificación probablemente puede inducir agregación o fusión de las nanopartículas. En adición al PVA adsorbido en la superficie de las nanopartículas, el uso de crioprotectores adecuados puede prevenir estos cambios. Se ha sugerido que la estabilización de nanopartículas poliméricas requiere solamente que sean mantenidas en estado vitrificado. Los carbohidratos tales como manitol o trehalosa, son ampliamente utilizados para la protección de nanopartículas durante la liofilización. Tales excipientes pueden fácilmente ser vitrificados durante el congelamiento y formar una matriz amorfa protectora alrededor de las nanopartículas [84-85].

#### **7.1.7. Optimización de las nanopartículas**

La técnica de optimización numérica basada en el enfoque de deseabilidad se utilizó para la optimización de las nanopartículas de PLGA recubiertas de P80 y cargadas con rapamicina (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs), con el objetivo de alcanzar un TP mínimo y maximizar el PZ y la EE y poder determinar los niveles de las variables independientes que dan la respuesta óptima [105]. Los gráficos 3D de superficie de respuesta estimada (Figuras 12-15) muestran que la adición de P80 a las nanopartículas es el factor más importante que impacta en el TP, PZ y EE. También se observó que el aumento de la cantidad de PLGA refleja una mayor EE. Por otro lado, la presencia de PVA en las nanopartículas les confiere mayor estabilidad, observándose PDIs más bajos conforme la concentración de PVA aumenta. Con base en estas observaciones y a la necesidad de la presencia de P80 en las formulaciones para estudios posteriores, los niveles de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  para la

formulación optimizada de RAP-PLGA-PVA-P80 NPs se encontraron en 207.65 mg, 2.72% y 0.15%, respectivamente, prediciendo el TP de 259.71 nm, -11.96 mV de PZ y 30% de EE con una deseabilidad general de 0.91, Figura 16. Las RAP-PLGA-PVA-P80 NPs optimizadas preparadas utilizando el respectivo nivel de las variables independientes, mostraron un TP de  $247.04 \pm 1.04$  nm,  $-11.76 \pm 0.11$  mV de PZ y  $28.51 \pm 1.29\%$  de EE, los cuales se encuentran muy cercanos de los valores previstos con un bajo porcentaje de sesgo ( $< 5\%$ ) [106].



**Figura 16. Contornos de la superficie de respuesta estimada.**

## 7.2. Caracterización de las nanopartículas optimizadas

Con base en los valores de los parámetros de formulación optimizados en el presente trabajo, se prepararon tres sistemas: nanopartículas de PLGA cargadas con Rapamicina (RAP-PLGA-PVA NPs), nanopartículas cargadas con Rapamicina recubiertas con Polisorbato 80 (RAP-PLGA.PVA-P80 NPs) y recubiertas con Poloxámero 188 (RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs) (Tabla 8). Estos tres sistemas se caracterizaron en términos de TP, PDI, PZ, EE, morfología por microscopía electrónica de barrido (MEB) y sus interacciones mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Tabla 8. Características fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas.

Sistema	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
RAP-PLGA-PVA	231.9 ± 1.2	0.059 ± 0.006	-16.69 ± 0.2	43.7 ± 1.28
RAP-PLGA-PVA-P80	247 ± 1.04	0.098 ± 0.006	-11.76 ± 0.11	28.51 ± 1.29
RAP-PLGA-PVA-PLX188	221.8 ± 1.3	0.053 ± 0.011	-16.33 ± 0.41	38.56 ± 1.35

Notas: TP = Tamaño de partícula. PDI = Índice de polidispersión. PZ = Potencial zeta. EE = Eficiencia de entrapamiento. Promedio ± desviación estándar (n = 3).

Se determinó que el TP se encontraba en el rango de 220 – 250 nm, con PDIs < 0.2 (monodispersas Figura 17), PZ de -16 – -11 mV y EE de 28 – 45 %. La morfología externa de las nanopartículas liofilizadas preparadas en condiciones óptimas se muestra en la Figura 18 donde se observa que las nanopartículas son sólidas, compactas, de forma esférica y sin mostrar grandes agregados.

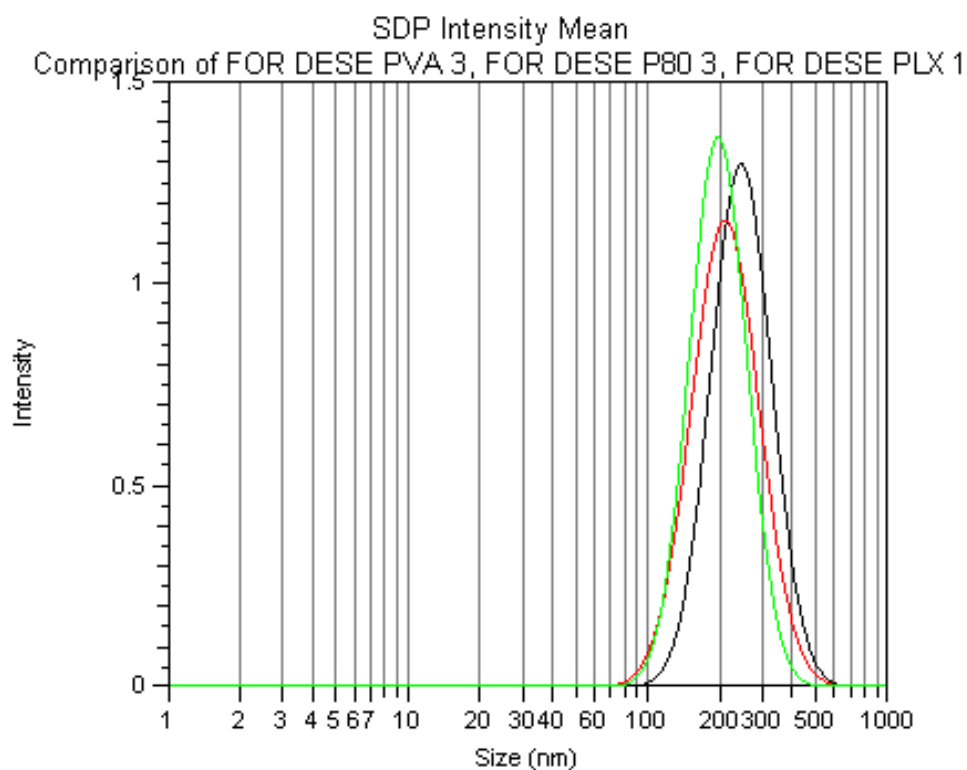
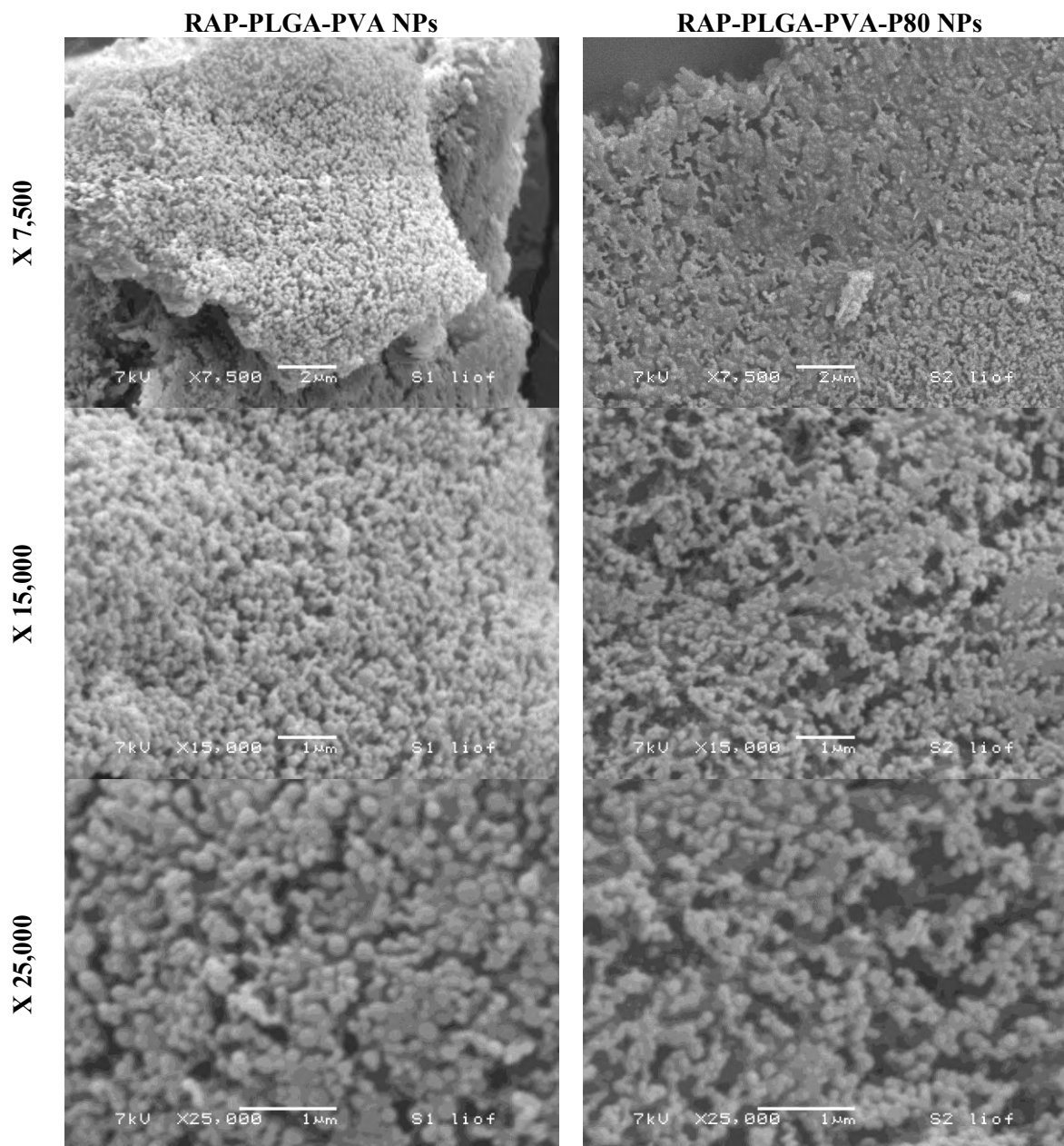


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula para: (RAP-PLGA-PVA NPs, negro), (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs, rojo) y (RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs, verde).

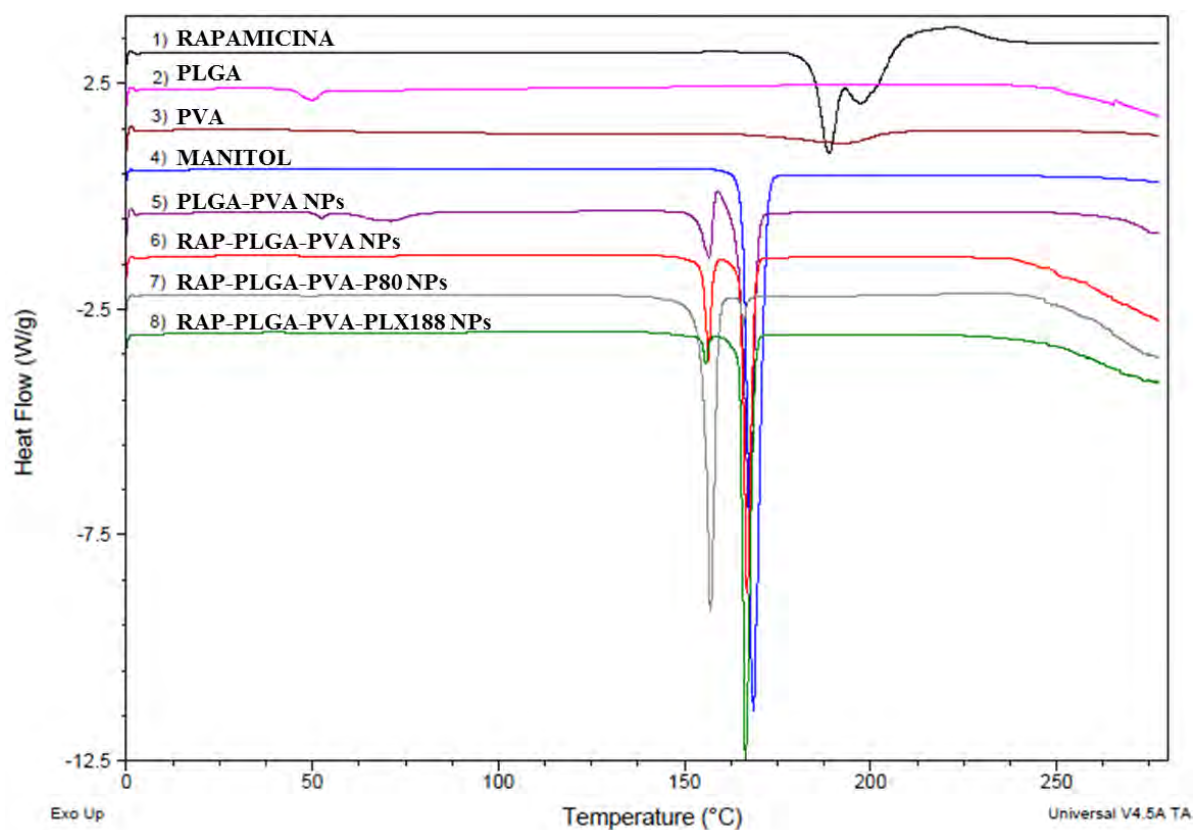


**Figura 18. Micrografías MEB de las nanopartículas optimizadas.**

Se obtuvieron termogramas mediante DSC para definir el estado físico del fármaco y el polímero en las nanopartículas y para detectar cualquier interacción fármaco-polímero dentro de la red polimérica de las nanopartículas [107]. En la Figura 19 se representan los termogramas obtenidos por DSC de la Rapamicina, PLGA, PVA, Manitol, PLGA-PVA NPs (sin Rapamicina), RAP-PLGA-PVA NPs, RAP-PLGA-PVA-P80 NPs y RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs. La Rapamicina



mostró dos picos endotérmicos alrededor de 187 y 193 °C lo que indica la naturaleza cristalina del fármaco [107]. Sin embargo, el pico de la Rapamicina desapareció en los tres sistemas investigados lo que indica ausencia de cristalinidad mientras que los picos a ~50 °C y ~164 °C en las formulaciones corresponde a la transición vítrea (Tg) del PLGA y el punto de fusión del manitol, respectivamente. La desaparición del pico endotérmico de la Rapamicina confirmó el entrapamiento del fármaco en las formulaciones y la existencia de Rapamicina en una fase amorfa o cristalina desordenada lo que implica que podría encontrarse como una dispersión molecular dentro de la matriz polimérica de las nanopartículas [108]. Los ligeros movimientos en el pico endotérmico de la Tg del PLGA puro en comparación con el mismo evento en los termogramas de las nanopartículas optimizadas, pueden explicarse por cambios en la cristalización, agregación, reacondo e interacción de las moléculas del PLGA al generarse las nanopartículas [109].



**Figura 19.** Termogramas obtenidos por DSC de los componentes puros y formulados en las nanopartículas optimizadas.

### 7.3. Estabilidad de las nanopartículas

Muchos factores pueden afectar la estabilidad de las nanopartículas. Las formulaciones de nanopartículas aumentan su superficie en varios órdenes de magnitud y esto puede conducir a una agregación después de largos períodos de almacenamiento. Esta mala estabilidad a largo plazo puede deberse a diferentes factores físicos y químicos que pueden desestabilizar el sistema [110]. Se realizó un estudio de estabilidad física con el objetivo de determinar la variabilidad de las nanopartículas optimizadas. La Figura 20 muestra el efecto del almacenamiento a largo plazo sobre el TP, PDI, PZ y EE. En el Anexo 11.3. se encuentra el análisis estadístico pertinente.

El TP, PDI y PZ de las partículas son propiedades importantes de las dispersiones coloidales, ya que la tendencia al sedimento está determinada por los cambios en estos parámetros [111]. Además, estas propiedades de las partículas influyen en sus comportamientos *in vitro/in vivo* [112]. Después de cuatro semanas de almacenamiento a 25 °C, no hubo cambios significativos (valores-P > 0.05) en el TP y PZ para RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs. Sin embargo, RAP-PLGA-PVA-P80 NPs y RAP-PLGA-PVA NPs presentaron una ligera variación en el TP y PZ, respectivamente (valores-P < 0.05). No obstante, ninguno de los sistemas reflejaron cambios significativos en el PDI (valores-P > 0.05).

La integridad química de los fármacos incorporados en nanopartículas es otro aspecto fundamental de la evaluación global de la estabilidad de las formulaciones. Oppenheim et al. [113] han indicado que, si el fármaco se degrada en un medio acuoso o se degrada por la luz, esto influirá en la cantidad de fármaco incorporado en las nanopartículas. El procedimiento de fabricación debe minimizar el tiempo durante el cual puede ocurrir la degradación. Por otra parte, al estudiar la estabilidad de los nanotransportadores de fármacos, es importante analizar no sólo el tamaño de partícula, sino también, la fuga eventual del fármaco durante el almacenamiento. Por ejemplo, durante la encapsulación de fármacos hidrófobos, como en el caso de la rapamicina, la precipitación en la fase acuosa externa provoca la formación de nanocristales que pueden ser mal interpretados como nanopartículas. Los nanocristales, sin embargo, se harán evidentes si la preparación se almacena durante varios días o semanas para permitir que los núcleos de cristalización crezcan [114]. De los sistemas preparados, RAP-PLGA-PVA NPs y RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs no presentaron cambios significativos en la EE (valores-P > 0.05). En contraste, RAP-PLGA-PVA-P80 NPs presentaron una disminución en la EE a las dos y cuatro semanas de preparación. Como se mencionó anteriormente, P80 puede aumentar la solubilidad acuosa de la rapamicina, lo que podría estar provocando la fuga del fármaco de las nanopartículas.

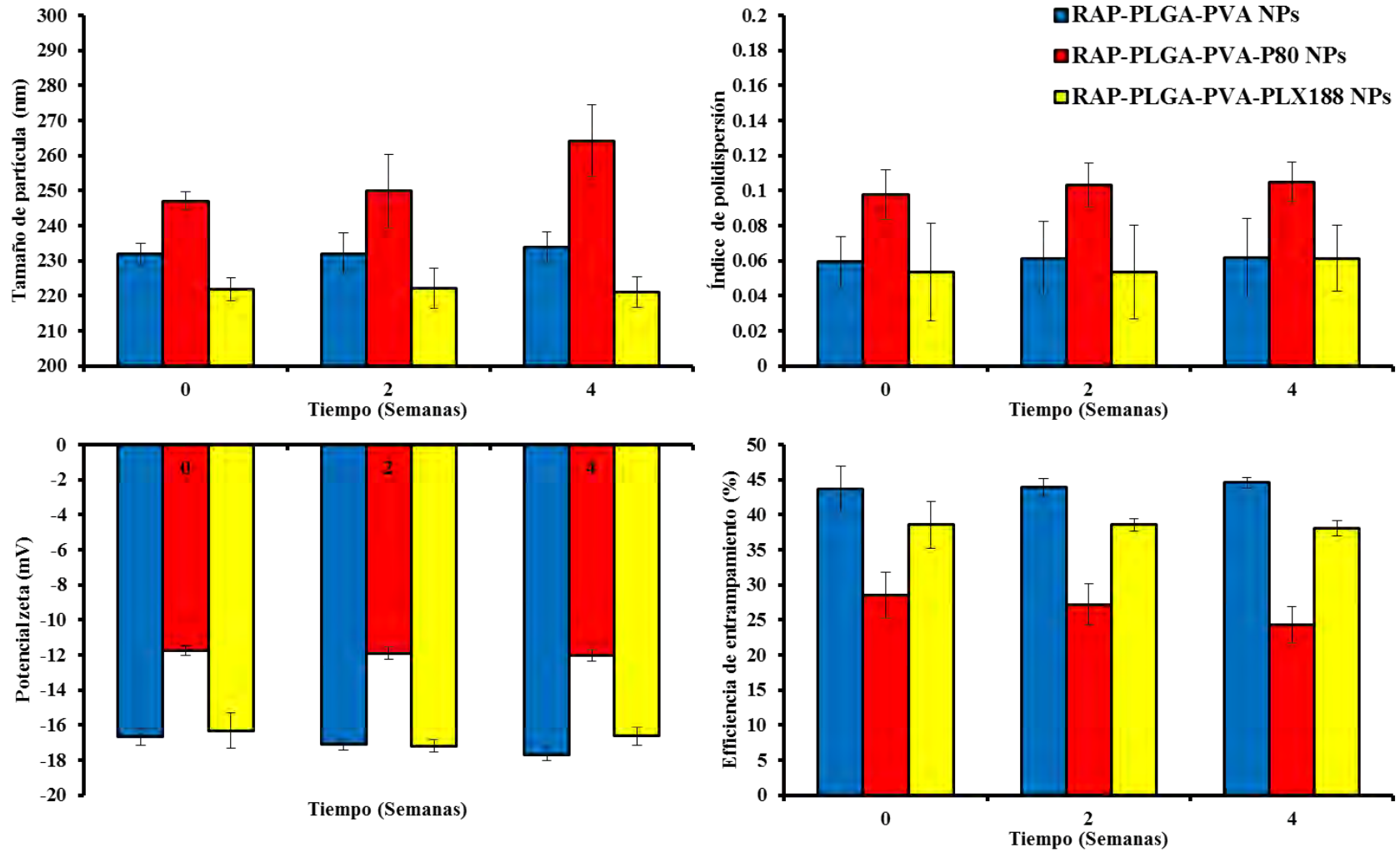


Figura 20. Variación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad. Promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 3$ ).

#### 7.4. Citotoxicidad

La Rapamicina es un potente fármaco contra enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC), tales como cáncer y neurodegeneración. Sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua, la escasa especificidad y la incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, es difícil alcanzar concentraciones terapéuticas de este fármaco en el sitio de acción. Los tumores que atacan al SNC se consideran los más devastadores, debido a que afectan predominantemente células del cerebro o de la médula espinal [115]. Los gliomas son tumores de las células gliales y son considerados como los tumores cerebrales primarios más frecuentes [8]. Estos se caracterizan por presentar un alto potencial proliferativo, heterogeneidad intratumoral, recurrencia tumoral y naturaleza infiltrativa, siendo ésta última, implicada en la gravedad de los tumores cerebrales [115]. Debido a la frecuencia y gravedad que los gliomas representan, en este trabajo se evaluó la citotoxicidad de una disolución de Rapamicina (RAP SLN), y cargada en nanopartículas de PLGA (RAP-PLGA-PVA NPs), y recubiertas con Polisorbato 80 (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs) o Poloxámero 188 (RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs) después de su exposición en las células glioma C6 a concentraciones equivalentes de 0.01 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del fármaco, Figura 21. La toxicidad se midió mediante la evaluación de la función mitocondrial y la detección de cambios en la estructura celular [116].

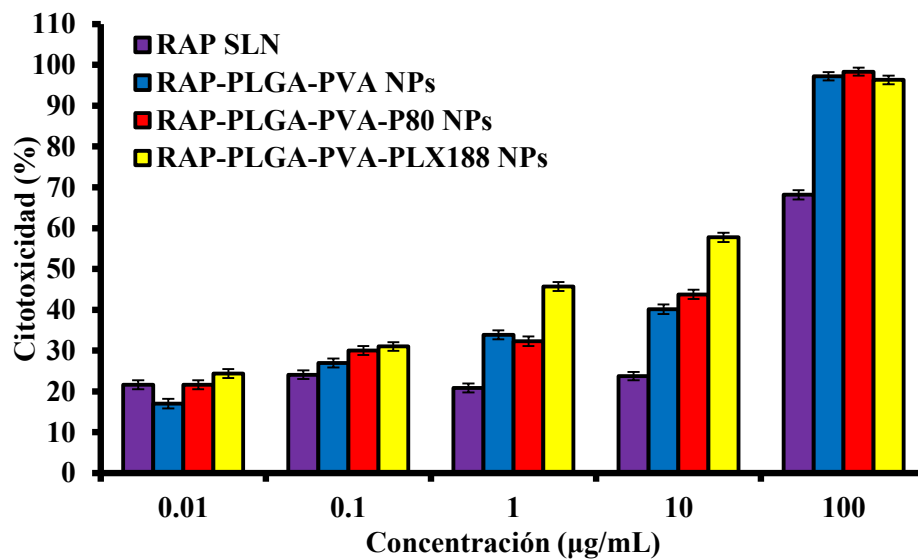
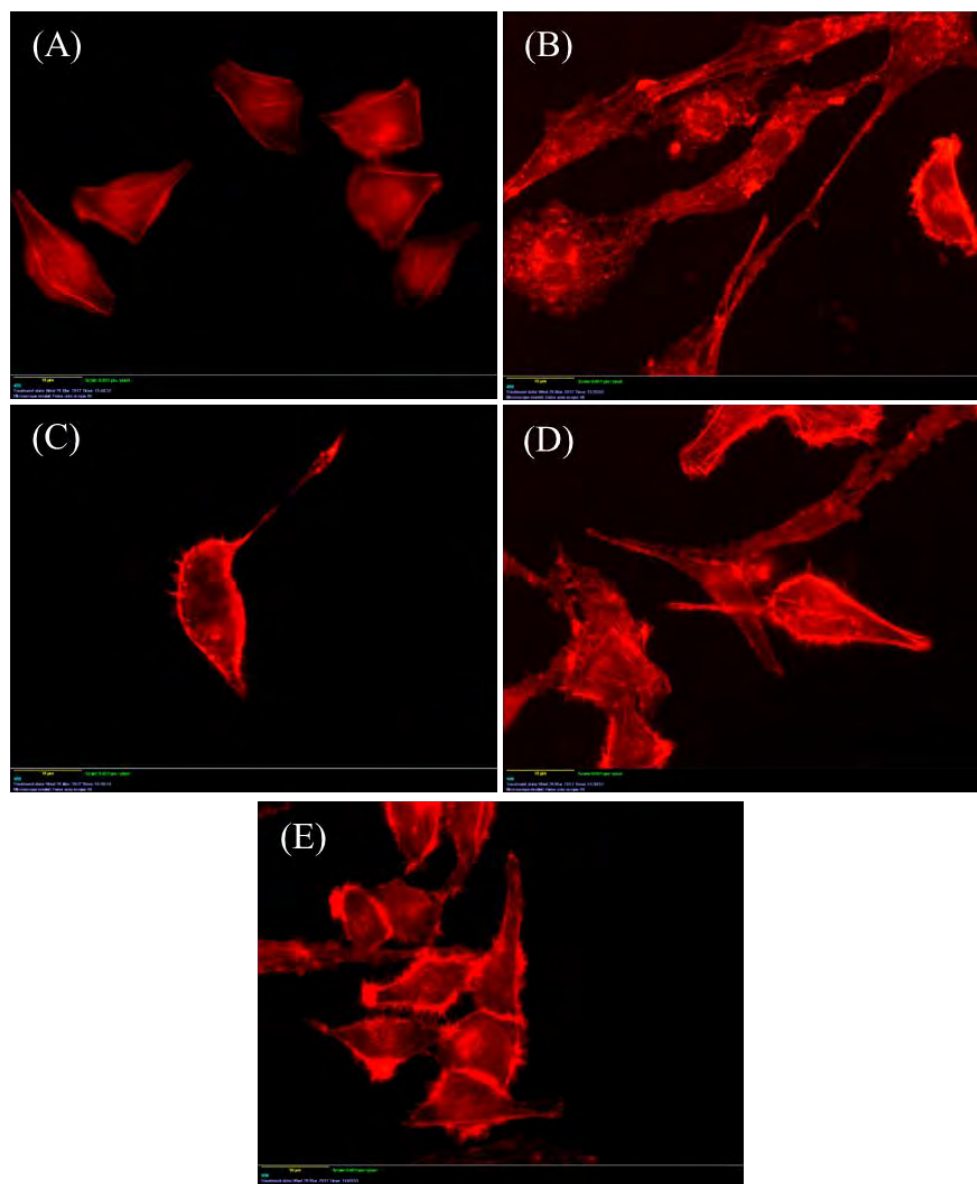


Figura 21. Citotoxicidad de Rapamicina en disolución y cargada en las nanopartículas optimizadas. Promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 6$ ).

Los resultados mostrados en la Figura 21 revelaron que la RAP SLN fue citotóxica para las células evaluadas con un efecto dosis-dependiente, causando hasta un 68% de muerte celular a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La RAP es capaz de activar el sistema autofagia/lisosoma a través de la inhibición de mTOR. La activación de la autofagia puede funcionar como un supresor de tumores. Por lo tanto, la inducción de la autofagia podría considerarse como un mecanismo que podría desencadenar la muerte celular [117].

Por otro lado, se observó que las nanopartículas cargadas con Rapamicina son más citotóxicas que la RAP SLN a concentraciones de 0.1 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos resultados demuestran la capacidad de las nanopartículas de PLGA para entrapar y transportar Rapamicina a través de la membrana celular. Las nanopartículas pueden ser captadas por las células mediante endocitosis seguida por la liberación del fármaco en el citoplasma [118]. Como también se observa en la Figura 21, los porcentajes de citotoxicidad de las nanopartículas de PLGA cargadas con Rapamicina recubiertas con P80 (44%) o PLX188 (58%) fueron significativamente mayores comparados con los de las nanopartículas de PLGA (40%) sin recubrir a una concentración de Rapamicina de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos resultados confirmaron el hecho de que las nanopartículas recubiertas con P80 o PLX188, tienen una mayor eficacia contra células glioma C6 comparadas con las nanopartículas no recubiertas. El recubrimiento superficial las nanopartículas con P80 puede estar inhibiendo el sistema de eflujo, especialmente la P-glicoproteína. El efecto surfactante del P80 y del PLX188 puede dar como resultado la solubilización de los lípidos de la membrana celular, lo que conduciría a la fluidización de la membrana y, por lo tanto, una permeabilidad mejorada del fármaco a través de la misma [95]. Las nanopartículas recubiertas con PLX188 demostraron mayor toxicidad en las células glioma C6 que las nanopartículas recubiertas con P80 a concentraciones de Rapamicina de 0.01 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El PLX188 puede tener un mejor recubrimiento sobre la superficie de las nanopartículas de PLGA en comparación con P80. La orientación de la cadena de polioxipropileno es más rígida en el PLX188 después del recubrimiento debido a que las dos cadenas terminales de polioxietilenglicol se encuentran interactuando con la nanopartícula. Este efecto puede ser útil para la penetración de la membrana celular y de la BHE. Recientemente, se ha investigado los efectos del PLX188 sobre los mecanismos de captación celular. Los resultados demostraron que PLX188 podría (1) ser incorporado en membranas cambiando que su microviscosidad; (2) inducir una reducción dramática en los niveles de ATP en las células de barrera; (3) inhibir los transportadores de eflujo de fármacos, tales como P-glicoproteína. Como resultado, el Poloxamer 188 mejora el transporte de fármaco a través de la membrana celular y de la BHE [119-120].

En la Figura 22 se encuentran las micrografías de las células glioma C6 después de ser expuestas a RAP SLN, RAP-PLGA-PVA NPs, RAP-PLGA-PVA-P80 NPs, RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs y un grupo control (sin Rapamicina y sin nanopartículas).



**Figura 22. Micrografías de fluorescencia del citoesqueleto después de la exposición A) Control, B) SLN de Rapamicina, C) RAP-PLGA-PVA NPs, D) RAP-PLGA-PVA-P80 NPs y E) RAP-PLGA-PVA-PLX188 NPs.**

Al final de las 72 h de incubación, las morfologías de las células expuestas a todas las nanopartículas cambiaron en comparación con las células de control. Se observaron cambios significativos en los filamentos de las células incubadas con Rapamicina y cargada en nanopartículas recubiertas con P80 y con PLX188, sugiriendo apoptosis celular, ya que los cambios en la organización del citoesqueleto de actina indican la señalización apoptótica [121]. Como se observa en la Figura 22, especialmente el citoesqueleto de actina de células incubadas con nanopartículas recubiertas con P80 o con PLX188, desapareció por completo, lo que concuerda con los resultados obtenidos a partir del ensayo de citotoxicidad. Estos cambios significativos en las morfologías de las células incubadas con Rapamicina y cargada en nanopartículas, que condujeron a la disminución severa de las viabilidades celulares, indican en gran medida que la Rapamicina es un agente anticancerígeno para las células glioma. Además, los resultados concluyeron que la concentración de fármaco dentro de las nanopartículas y el recubrimiento con surfactantes deben estar relacionados con la exitosa internalización celular de las nanopartículas [122-123].

## VIII. CONCLUSIONES

La presente investigación nos permitió concluir que el método emulsificación-difusión representa una excelente alternativa para la preparación de nanopartículas poliméricas capaces de incorporar fármacos con escasa solubilidad en agua como lo es la Rapamicina. Como era de esperarse, las características fisicoquímicas de las nanopartículas se ven afectadas cuando se emplean recubrimientos superficiales con diferentes surfactantes.

Así mismo, logramos desarrollar y optimizar estadísticamente nanotransportadores recubiertos con surfactantes capaces de incorporar Rapamicina, con propiedades fisicoquímicas y morfológicas adecuadas. Por otro lado, se demostró que las nanopartículas optimizadas presentaron una buena estabilidad física y química cuando éstas se sometieron al estudio de estabilidad.

Finalmente, comprobamos la toxicidad causada por la Rapamicina sola y cargada en las nanopartículas en una línea de células glioma C6. Como era de esperarse, el recubrimiento superficial de las nanopartículas con surfactantes evidentemente incrementó la citotoxicidad.

Los resultados obtenidos nos conduce a la conclusión de que, los nanotransportadores diseñados en el presente trabajo tendrán importantes alcances en la vectorización de fármacos hacia el Sistema Nervioso Central con el fin de mejorar los tratamientos ya existentes.



**IX. PERSPECTIVAS**

- a) Evidenciar el recubrimiento efectivo de los surfactantes sobre la superficie de las nanopartículas.
- b) Demostrar la captación de las nanopartículas optimizadas y el efecto de sus propiedades fisicoquímicas sobre la vía y mecanismo de internalización empleando modelos celulares *in vitro*.
- c) Evaluar el efecto de las propiedades fisicoquímicas y material de recubrimiento superficial sobre la capacidad de las nanopartículas para atravesar modelos *in vitro* de la Barrera Hematoencefálica.
- d) Demostrar el efecto de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sobre la biodistribución empleando modelos *in vivo*.
- e) Someter a ensayos clínicos las formulaciones obtenidas con el objetivo de demostrar la correlación *in vitro-in vivo*.
- f) Evaluar las propiedades de las nanopartículas utilizando otros fármacos indicados para el tratamiento de diferentes enfermedades del Sistema Nervioso Central.

**X. REFERENCIAS**

1. Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:278–94.
2. Fornai F, Soldani P, Lazzeri G, et al. Neuronal inclusions in degenerative disorders. Do they represent static features or a key to understand the dynamics of the disease? *Brain Res Bull* 2005;65:275–90.
3. Md S, Mustafa G, Baboota S, Ali J. Nanoneurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(12):1922–34.
4. Dilnawaz F, Sahoo SK. Therapeutic approaches of magnetic nanoparticles for the central nervous system. *Drug Discov Today* 2015;20(10):1256–64.
5. Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2005;2(1):108–19.
6. Chen L, Zou X, Wang Y, Mao Y, et al. Central nervous system tumors: A single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. *BMC Clin Pathol* 2013;13:1–14.
7. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009;100:2235–41.
8. Rajesh Y, Pal I, Banik P, et al. Insights into molecular therapy of glioma: Current challenges and next generation blueprint. *Acta Pharmacol Sin* 2017;38(5):591–613.
9. Reni M, Mazza E, Zanon S, et al. Central nervous system gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;113:213–32
10. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* 2005;23:2411–22.
11. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96.
12. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003;3(7):489–501.
13. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004;10:S10–S17.
14. Messer A, Joshi SN. Intrabodies as Neuroprotective Therapeutics. *Neurotherapeutics* 2013;10(3):447–58.
15. Lee VM. Amyloid binding ligands as Alzheimer's disease therapies. *Neurobiol Aging* 2002;23(6):1039–42.
16. Messer A, Lynch SM, Butler DC. Developing intrabodies for the therapeutic suppression of neurodegenerative pathology. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(9):1189–97.

17. Jankovic J, Aguilar LG. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4(4):743–57.
18. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *JAMA* 2014;311(16):1670–83.
19. Katzenschlager R, Lees AJ. Treatment of Parkinson's disease: Levodopa as the first choice. *J Neurol* 2002;Suppl2:19–24.
20. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, et al. The prevalence of Huntington's disease. *Neuroepidemiology* 2016;46:144–53
21. Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, et al. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 1998;18:150–4.
22. Panchanan M, Jayeeta M, Shobi V, Sally F. Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin. *BioMed Res Int* 2014;2014:ID495091.
23. Williams AJ, Paulson HL. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci* 2008;31: 521–8.
24. Bartolini M, Andrisano V. Strategies for the inhibition of protein aggregation in human diseases. *Chembiochem* 2010;11:1018–35.
25. Katsuno M, Sang C, Adachi H, et al. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16801–6.
26. Sarkar S. Chemical screening platforms for autophagy drug discovery to identify therapeutic candidates for Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today Technol* 2013;10(1):137–44.
27. Carew JS, Kelly KR, Nawrocki ST. Autophagy as a target for cancer therapy: New developments. *Cancer Manag Res* 2012;4:357–65.
28. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(5):985–1001.
29. Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA. Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014;16(6):10034–51.
30. Anjum K, Shaqufla BI, Abbas SQ, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother* 2017;92:681–9.
31. Cortes CJ, La Spada AR. Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Mol Cell Neurosci* 2015;66:53–61.
32. Chort A, Alves S, Marinello M, et al. Interferon b induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain* 2013;136:1732–45.

33. Wong HK, Bauer PO, Kurosawa M, et al. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* 2008;17:3223–35.
34. Bauer PO, Wong HK, Oyama F, et al. Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2009;284:13153–64.
35. Wang HL, Hu SH, Chou AH, et al. H1152 promotes the degradation of polyglutamine-expanded ataxin-3 or ataxin-7 independently of its ROCK-inhibiting effect and ameliorates mutant ataxin-3-induced neurodegeneration in the SCA3 transgenic mouse. *Neuropharmacology* 2013;70:1–11.
36. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004;36:585–95.
37. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 2006;15:433–42.
38. Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, et al. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 2008;17:170–8.
39. Fernandez-Estevez MA, Casarejos MJ, Sendon JL, et al. Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PLoS One* 2014;9:e90202.
40. Reddy LH, Murphy RS. Pharmacokinetics and biodistribution studies of Doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2004;148(2):161–6.
41. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5(4):496–504.
42. Joseph E, Saha RN. Investigations on pharmacokinetics and biodistribution of polymeric and solid lipid nanoparticulate systems of atypical antipsychotic drug: effect of material used and surface modification. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(4):678–686.
43. Gomes MJ, Mendes B, Martins S, Sarmiento B, Chapter 36 –nanoparticle functionalization for brain targeting drug delivery and diagnostic. In: Aliofkhazraei M, ed. *Hand book of nanoparticles*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016:941–59.
44. S. Nag, Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels, in: Nag S (Ed.), *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*, 1st ed., Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003, pp. 3-36.

45. R. Cecchelli, V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M.P. Dehouck, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development, *Nat.Rev.Drug Discov* 2007;6:650-661.
46. Bhaskar S, Tian F, Stoeger, et al. Multifunctional nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol* 2010;3(7):3.
47. J. Bernacki, A. Dobrowolska, K. Nierwinska, A. Malecki. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier, *Pharmacol Rep* 2008;60:600–22.
48. J.A. Kim, N.D. Tran, Z. Li, F. Yang, W. Zhou, M.J. Fisher. Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes, *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:209–17.
49. S. Nakagawa, M.A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Neurochem Int* 2009;54:253–63.
50. K. Matter, M.S. Balda. Signalling to and from tight junctions, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4: 225–36.
51. Bondi ML, Di Gesù R, Craparo EF, Lipid nanoparticles for drug targeting to the brain. *Methods Enzymol* 2012;508:229–51.
52. Tajes M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol* 2014;31(5):152–67.
53. Modi G, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1184:154–72.
54. Fernandes C, Soni U, Patravale V. Nano-interventions for neurodegenerative disorders. *Pharmacol Res* 2010;62(2):166–78.
55. Escalona-Rayo O, Fuentes-Vázquez P, Leyva-Gómez G, et al. Nanoparticulate strategies for the treatment of polyglutamine diseases by halting the protein aggregation process. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(6):871–88.
56. Gendelman HE, Anantharam V, Bronich T, et al. Nanoneuromedicines for degenerative, inflammatory, and infectious nervous system diseases. *Nanomedicine* 2015;11(3):751–67.
57. Hague S, Md S, Alam MI, et al. Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm* 2012;38(4):387–411.
58. Re F, Gregori M, Masserini M. Nanotechnology for neurodegenerative disorders. *Maturitas* 2012;73(1):45–51.
59. Kanwar JR, Sriramoju B, Kanwar RK. Neurological disorders and therapeutics targeted to surmount the blood–brain barrier. *Int J Nanomedicine* 2012;7(3):3259–78.

60. Stockwell J, Abdi N, Lu X, et al. Novel central nervous system drug delivery systems. *Chem Biol Drug Des* 2014;83(5):507–20.
61. Lalatsa A, Schatzlein AG, Ucheqbu IF. Strategies to deliver peptide drugs to the brain. *Mol Pharm* 2014;11(4):1081–93.
62. Gao H, Pang Z, Jiang X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. *Pharm Res* 2013;30(10):2485–98.
63. Nunes A, Al-Jamal KT, Kostarelos K. Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system. *J Control Release* 2012;161(2):290–306.
64. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 2010;37(1):48–57.
65. Roney C, kulkarni P, Arora V, et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer’s disease. *J Control Release* 2005;108(2-3):193–214.
66. Gomes MJ, Martins S, Sarmento B. siRNA as a tool to improve the treatment of brain diseases: Mechanism, targets and delivery. *Ageing Res Rev* 2015;21:43–54.
67. Oesterling BM, Gulati A, Joshi MD. Nanocarrier-Based Approaches for Treatment and Detection of Alzheimer’s Disease. *J Nanosci Nanotechnol* 2014;14(1):137–56.
68. Banik BL, Fattahi P, Brown JL. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Adv Rev* 2015;8(2):271–99.
69. Sandhir R, Yadav A, Sunkaria A, Singhal N. Nano-antioxidants: An emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. *Nerochem Int* 2015;89:209–26.
70. Saraiva C, Praca C, Ferreira R, et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release* 2016;10(235):34–47.
71. Ulbrich K, Hol\_a K, \_Subr V, et al. Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chem Rev* 2016;116:5338–41.
72. Zhao Y, Tavares AC, Gauthier MA. Nano-engineered electroresponsive drug delivery systems. *J Mater Chem B* 2016;4:3019–30.
73. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006;307:93–102.
74. Modi G, Pillay V, Choonara YE, et al. Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 2009;88(4):272–85.
75. Katiyar SS, Muntimaduqu E, Rafeeqi TA, et al. Co-delivery of rapamycin- and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. *Drug Dev* 2016;23(7):2608–16.

76. Simamora P, Alvarez JM, Yalkowsky SH. Solubilization of rapamycin. *Int J Pharm* 2001;2(13):25–9.
77. Mora-Huertas CE, Couenne F, Fessi H, Elaissari A. Electrokinetic properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone-based nanoparticles prepared by nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: a comparative study. *J Nanopart Res* 2012;14:876–91.
78. ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
79. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.
80. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 1996;143:133–41.
81. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res* 1998;15(7):1056–62.
82. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24(12):1113–28.
83. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods Critical comparison. *Adv Colloid Interface Sci* 2011;163:90–122.
84. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(15):1688–713.
85. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* 2009;26(5),1025–58.
86. Balam G, Ravi RP, Chintan D. Formulation, optimization and characterization of cationic polymeric nanoparticles of mast cell stabilizing agent using the Box–Behnken experimental design. *Drug Dev Ind Pharm* 2016;45(5):747–57.
87. Gajra B, Dalwadi C, Patel RR. Formulation and optimization of itraconazole polymeric lipid hybrid nanoparticles (lipomer) using Box–Behnken design. *Daru* 2015;23:3.
88. Vijayan V, Jayaraja Kumar K, Muralidharan S, et al. Optimization and in-vivo evaluation of isradipine nanoparticles using Box-Behnken design surface response methodology. *Open Nano* 2016;1:1–15.

89. Candioti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 2014;124:123–38.
90. Shah U, Joshi G, Sawant K. Improvement in antihypertensive antianginal effects of felodipine by enhanced absorption from PLGA nanoparticles optimized by factorial design. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014;35:153–63.
91. Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceut Res* 2004;21(8):1428–39.
92. Zhang C, Gu C, Peng F, et al. Preparation and optimization of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery with reduced gastric irritation. *Molecules* 2013;18:13340–56.
93. dos Santos KC, da Silva MFGF, Pereira-Filho ER, et al. Polymeric nanoparticles loaded with the 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (Triac), a thyroid hormone: factorial design, characterization, and release kinetics. *Nanotechnol Sci Appl* 2012;5:37–48.
94. Song X, Zhao Y, Hou S, et al. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:445–53.
95. Ren T, Xu N, Cao C, et al. Preparation and therapeutic efficacy of Polysorbate-80-coated Amphotericin B/PLA-b-PEG nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2009;20(10):1369–80.
96. Tefas LR, Tomuta I, Achim M, Viase L. Development and optimization of quercetin-loaded PLGA nanoparticles by experimental design. *Clujul Med* 2015;88(2):214–23.
97. Boury F, Ivanova Tz, Panaiotov I, et al. Dynamic properties of poly (dl-lactide) and polyvinyl alcohol monolayers at the air/water and dichloromethane/water interfaces. *J Colloid Interface Sci* 1995;169:380–92.
98. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima. Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int J Pharm* 1999;187:143–52.
99. Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *Int J Pharm* 2006;309(1-2):178–88.
100. Lasoń E, Sikora E, Ogonowski J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. *Acta Biochim Pol* 2013;60(4):773–7.
101. Sapre AS, Parikh RK. Design of a buccal mucoadhesive, nanoparticles based delivery system of fluoxetine. *JPSBR* 2012;2(3):148–61.



102. Sengel-Türk CT, Sezgin-Bayindir Z, Badilli U. Preparation of polymeric nanoparticles using different stabilizing agents. *J Fac Pharm Ankara* 2009;38(4):257–68.
103. Zhao H, Gagnon J, Häfeli UO. Process and formulation variables in the preparation of injectable and biodegradable magnetic microspheres. *Biomagn Res Technol* 2007;5:2.
104. Kumar MNVR, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* 2004;25:1771–7.
105. Noori Koopaei M, Khoshayand MR, Mostafavi SH, et al. Docetaxel loaded PEG-PLGA nanoparticles: Optimized drug loading, *In-vitro* cytotoxicity and *In-vivo* antitumor effect. *Iran J Pharm Res* 2014;13(3):819–33.
106. Sharma D, Maheshiwari D, Philip G, et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken Design: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *BioMed Res Int* 2014;2014:ID156010.
107. Piñon-Segundo E, Ganem-Quintanar A, Alonso-Pérez V, Quintanar-Guerrero D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int J Pharm* 2005;294(1-2):217–32.
108. Kim MS, Kim JS, Park HJ, et al. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2997–3009.
109. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water absorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res* 2006;23(6):1295–305.
110. Kumar N, Chaurasia S, Patel RR, et al. Development and optimization of atorvastatin calcium loaded oral biodegradable polymeric nanoparticles using central composite design. *Adv Sci Lett* 2014;20:984–93.
111. Santander-Ortega MJ, Jódar-Reyes AB, Csaba N, et al. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *J Colloid Interface Sci* 2006;302(2):522–9.
112. Holzer M, Vogel V, Mäntele W, et al. Physicochemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72(2):428–37.
113. Oppenheim R. Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles. *Int J Pharm* 1981;8:217–34.
114. Ranjan AP, Mukerjee A, Helson L, Vishwantha JK. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2012;10:38.

115. Grzmil M, Hemmings BA. Overcoming resistance to rapalogs in gliomas by combinatory therapies. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834(7):1371–80.
116. Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr CM. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *Int J Pharm* 2009;381(2):130–9.
117. Wang B, Li H, Yao Q, et al. Local in vitro delivery of rapamycin from electrospun PEO/PDLLA nanofibers for glioblastoma treatment. *Biomed Pharmacother* 2016;83:1345–52.
118. Md S, Ali M, Baboota S, et al. Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm* 2014;40(2):278–87.
119. Batrakova EV, Miller DW, Li S, Alakhov VY, et al. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: In vitro and in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296(2):551–7.
120. Batrakova E, Li S, Vinogradov S, et al. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood–brain barrier: Contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(2):483–93.
121. Tigli Aydin RS, Kaynak G, Gumusderelioglu M. Salinomycin encapsulated nanoparticles as a targeting vehicle for glioblastoma cells. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(2):455–64.
122. Grabowski N, Hillaireau H, Verqnaud J, et al. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm* 2015;482(1-2):75–83.
123. Grabowski N, Hillaireau H, Verqnaud J. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int J Pharm* 2013;454(2):686–94.

## XI. ANEXOS

**Anexo 11.1. Validación del método analítico para cuantificar Rapamicina en las nanopartículas mediante UPLC**

La validación del método analítico se realizó con base en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB y la guía ICH.

La adecuabilidad del sistema de medición de la respuesta analítica se evaluó al inyectar por sextuplicado una solución de Rapamicina a una concentración de 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , obteniendo la respuesta del analito y el coeficiente de variación, Tabla 9.

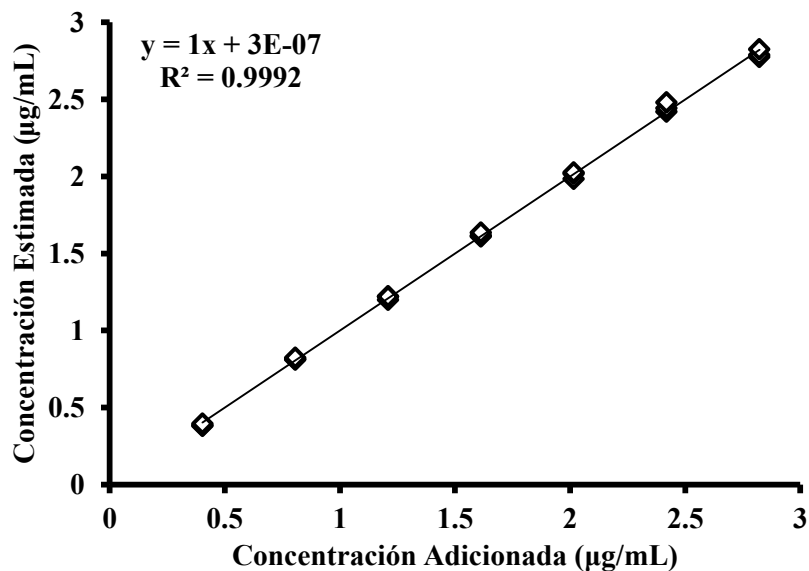
**Tabla 9. Respuestas analíticas correspondientes a la adecuabilidad del sistema.**

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Área</b>
	5.182	195.65971
	5.182	196.64876
	5.199	194.53961
	5.13	194.18883
	5.17	194.99871
	5.176	195.66937
<b>Promedio</b>	5.17316667	195.284165
<b>Desvest</b>	0.02325869	0.89298846
<b>%CV</b>	0.44960257	0.45727643

La linealidad del sistema se determinó con el coeficiente de correlación en un rango de concentraciones de soluciones estándar de 0.4 a 2.8  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando una curva de calibración por triplicado, conformada por siete puntos. Las áreas obtenidas fueron transformadas matemáticamente para estimar su concentración y se graficaron en función de la concentración de analito adicionada (Figura 23). Adicionalmente, para evaluar si el intercepto contiene el cero y si la pendiente es cercana a uno, se obtuvieron los coeficientes de ambos, así como sus límites inferiores y superiores (Tabla 10).

**Tabla 10. Coeficientes y límites del intercepto (b) y pendiente (m).**

	<b>Coeficientes</b>	<b>Límite inferior 95%</b>	<b>Límite superior 95%</b>
<b>Intercepto (b)</b>	3.45526E-07	-0.0245864	0.0245871
<b>Pendiente (m)</b>	0.999985971	0.9863	1.0136



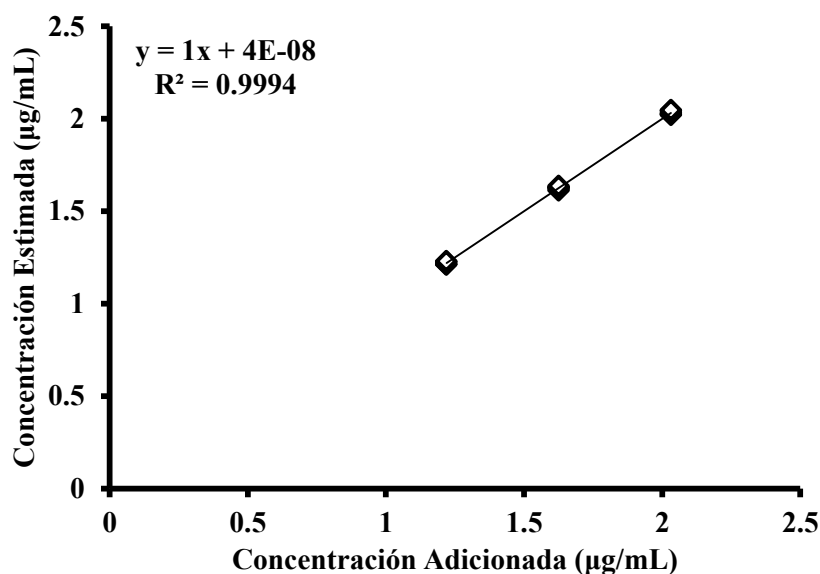
**Figura 23.** Gráfico que representa la linealidad del sistema en metanol.

La precisión y exactitud del sistema fue evaluada con el coeficiente de variación de la respuesta analítica para tres niveles de concentración correspondientes al 80, 100 y 120 % Se obtuvieron las respuestas del analito y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración (Tabla 11). Adicionalmente se reporta el coeficiente de variación global para la curva de calibración.

**Tabla 11.** Coeficientes de variación y prueba t de student calculadas para evaluar la precisión y exactitud del sistema.

Concentración (%)	Concentración Real (µg/mL)	Concentración Estimada (µg/mL)	CV (%)	t tab	t cal
80	1.2	1.21	0.62	2.57	-6.34
	1.2	1.21			
	1.2	1.21			
	1.2	1.22			
	1.2	1.23			
	1.2	1.23			
100	1.6	1.61	0.51	2.57	-7.35
	1.6	1.62			
	1.6	1.63			
	1.6	1.63			
	1.6	1.63			
	1.6	1.64			
120	2	2.02	0.53	2.57	-7.30
	2	2.02			
	2	2.02			
	2	2.03			
	2	2.04			
	2	2.05			

El respectivo gráfico correspondiente a los tres niveles evaluados para la evaluación de la precisión y exactitud se muestran en la Figura 24.



**Figura 24.** Gráfico que representa la precisión del sistema en metanol.

Los límites de detección y cuantificación se determinaron a partir de la desviación estándar de la curva de regresión, empleando las ecuaciones descritas en las directrices ICH [26]. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados obtenidos para los parámetros de desempeño de la validación.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado	Observaciones
Adecuabilidad del sistema	% CV ≤ 2.0	0.45%	Cumple
Linealidad del sistema	R <sup>2</sup> ≥ 0.98	R <sup>2</sup> = 0.9992	Cumple
	IC (b) no debe incluir el cero	LIC = - 0.0245	
		LSC = 0.0245	
Precisión del sistema	% CV ≤ 2.0	1.57 %	Cumple
Exactitud	t calculada < t tablas	-7.35 < 2.57	Cumple
LD	R <sup>2</sup> ≥ 0.98	LIC = 0.9863	Cumple
	IC (m) no debe incluir el cero	LSC = 1.0136	
LC	R <sup>2</sup> ≥ 0.98	LIC = 0.9863	Cumple
	IC (m) no debe incluir el cero	LSC = 1.0136	

## Anexo 11.2. Precisión del método de preparación.

Tabla 13. Precisión del método de preparación de nanopartículas.

Puntos Centrales	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
1	281.3	0.222	-11.80	12.27
1	273.5	0.281	-11.70	12.50
1	270.6	0.241	-12.10	12.79
2	291.2	0.286	-11.77	12.13
2	285.9	0.239	-11.80	12.69
2	279.4	0.266	-11.63	13.48
3	277.8	0.207	-12.03	13.13
3	268.8	0.258	-12.50	13.62
3	288.4	0.226	-12.50	12.96
4	294.3	0.218	-12.07	12.44
4	286.5	0.234	-12.67	12.28
4	294.3	0.232	-11.83	12.60
5	274.4	0.245	-12.30	12.61
5	275.4	0.240	-12.10	12.15
5	279.4	0.200	-12.13	12.71
6	284.5	0.246	-12.20	12.63
6	284.5	0.248	-12.27	12.32
6	275.2	0.209	-12.53	12.75
<b>PROMEDIO</b>	281.4	0.239	-12.11	12.67
<b>DESVEST</b>	7.7670	0.0238	0.3118	0.4171
<b>% CV</b>	2.7600	9.9786	2.5750	3.2914

Anexo 11.3. Estabilidad de las nanopartículas optimizadas

Tabla 14. Análisis de varianza para las nanopartículas optimizadas durante el estudio de estabilidad.

Respuesta	RAP-PLGA-PVA NPs		RAP-PLGA-PVA-P80		RAP-PLGA-PVA-PLX188	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
TP (nm)	1.08	0.3987	21.17	0.0019	0.27	0.7732
PDI	0.08	0.9271	1.61	0.2750	0.63	0.5648
PZ (mV)	15.67	0.0041	1.13	0.3832	2.54	0.1590
EE (%)	0.95	0.4374	10.30	0.0115	0.40	0.6872

Valores-P menores o igual que 0.05 indican que existe una diferencia estadísticamente significativa en el TP, PDI, PZ y EE durante el tiempo de almacenamiento con un nivel del 95.0% de confianza.

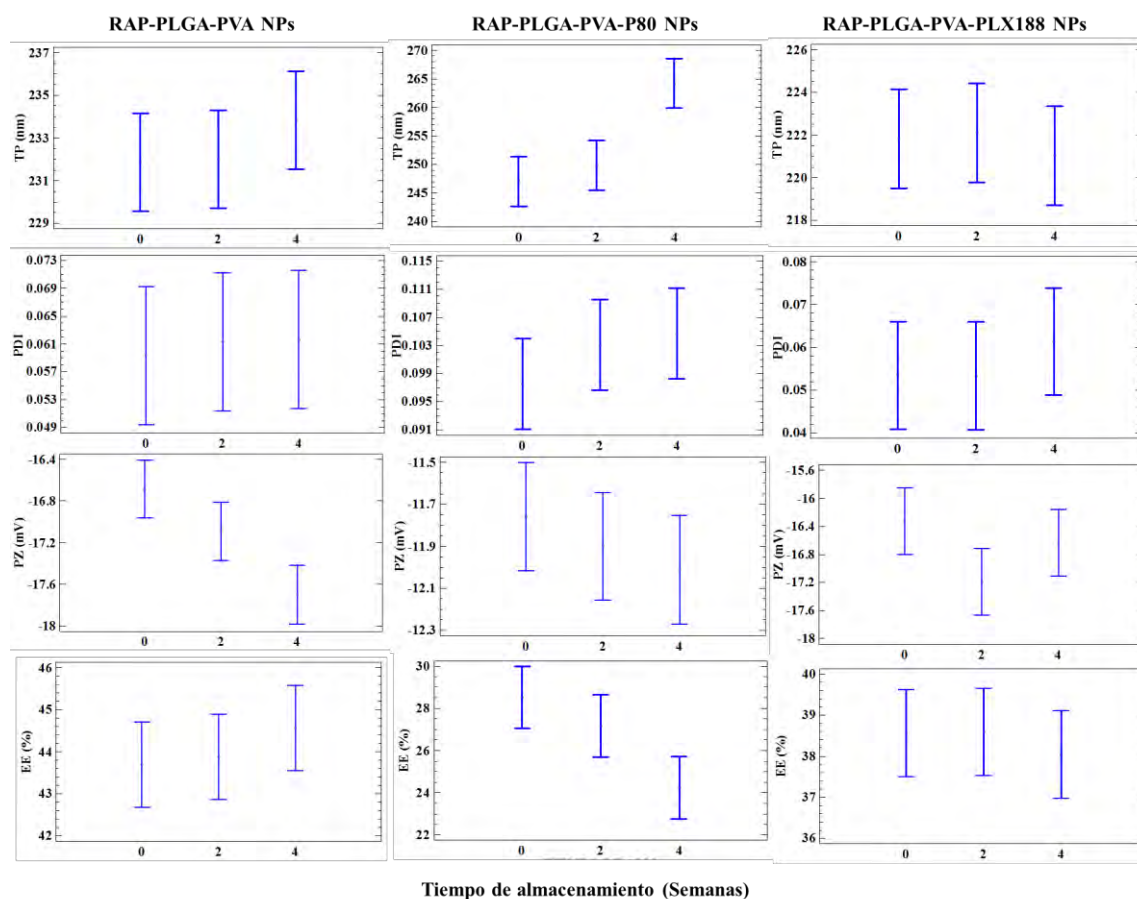


Figura 25. Gráfico de medias y 95.0% de Tukey HSD del efecto del tiempo de almacenamiento sobre el TP, PDI, PZ y EE de las nanopartículas optimizadas.

**Tabla 15. Pruebas de múltiple rangos para el PZ (RAP-PLGA-PVA NPs), TP y EE (RAP-PLGA-PVA-P80 NPs) por el tiempo de almacenamiento. Método: 95% Tukey HSD.**

Cont.	RAP-PLGA-PVA (PZ)			RAP-PLGA-PVA-P80 (TP)			RAP-PLGA-PVA-P80 (EE)		
	Sig.	Dif.	± Lim	Sig.	Dif.	± Lim	Sig.	Dif.	± Lim
0 – 2		0.4037	0.5600		-2.7556	8.6884		1.34131	2.95599
0 – 4	*	1.0148	0.5600	*	-17.1556	8.6884	*	4.27532	2.95599
2 – 4	*	0.6111	0.5600	*	-14.4000	8.6884		2.93401	2.95599

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.



