



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y EVALUACIÓN IN VIVO DE UNA  
MICROEMULSIÓN DE MEBENDAZOL PARA ADMINISTRACIÓN NASAL

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. JULIO ARMANDO MENA HERNÁNDEZ

TUTOR: Dra. HELGI HELENE GISELA JUNG COOK  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2020



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y EVALUACIÓN IN VIVO  
DE UNA MICROEMULSIÓN DE MEBENDAZOL PARA ADMINISTRACIÓN NASAL**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. JULIO ARMANDO MENA HERNÁNDEZ**

**TUTOR: Dra. HELGI HELENE GISELA FRANZISKA JUNG COOK  
FACULTAD DE QUÍMICA**



Ciudad de México, noviembre de 2020



## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la institución que me ha formado espiritual, humanística y académicamente desde su bachillerato.

Al Pueblo de México que por medio del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** me otorgó la beca de doctorado con número de CVU/becario: 405733/257882. Del mismo modo, al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM)** por su apoyo bajo el número IN223817.

A mi tutora la **Dra. Helgi Jung Cook** por su dirección, por su apoyo y por sus enseñanzas.

A los integrantes de mi Comité Tutor la **Dra. Patricia García López** y a la **Dra. Adriana Ganem Rondero** que durante todo el doctorado me apoyaron y guiaron.

Al **Posgrado en Ciencias Químicas-UNAM** por los estudios recibidos y el apoyo para la difusión del presente trabajo en un congreso internacional.

A los integrantes del jurado: **Dra. Adriana Ganem, Dr. Emilio Bucio, Dra. Josefa Bernard, Dr. Sergio Alcalá** y a la **Dra. Yareli Rojas** por su aportación para mejorar el presente manuscrito.

A la **Q.F.B. Liliana Montesinos** por su apoyo y por la gestión para la donación del mebendazol ante los laboratorios Liomont, además del hialuronato de sodio, Tween®, Cremophor®, propilenglicol y polietilenglicol de los laboratorios Grin.

A la **Q.F.B. Carolina** de **Lyontec México** por sus amables donaciones de Labrafil® M 2125, Transcutol®, Peceol®, Labrasol® y Labrafac® fabricados por Gattefosse.

A **Christian Escandón** de **Croda México** por sus gentiles donaciones de Super Refined® Oleic Acid y del Incromega® fabricados por Croda inc.

A la **Dra. Patricia García López** y a la **Dra Monserrat Laguno** del **Instituto Nacional de Cancerología México** por su apoyo y por la colaboración de los estudios de eficacia *in vivo*. Gracias Dra. Paty, que desde la licenciatura me ha guiado y apoyado.

Al **Dr. Simón López**, al **I.Q. Luis Antonio Cervantes** y al **I.Q. Fernando Silverio** de la **Unidad de Servicios para la Industria Petrolera** de la **Facultad de Química-UNAM** por su apoyo y en la colaboración de los estudios de reología.

A la **M. en C. Marisol Rivera** y al **M.V.Z. Raúl Resendiz** de la **Unidad de Experimentación Animal** de la **Facultad de Química-UNAM** por su apoyo y por la colaboración en el estudio de toxicidad nasal.

A la **Dra. Adriana Ganem** de la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM** y a la **Dra. Josefa Bernard** de la **Facultad de Química-UNAM** por su apoyo en el uso del equipo nanosizer.

Al **Q. Iván Puente**, a la **Q. Cecilia Salcedo**, a la **Q. Maricela Gutiérrez** y a la **Q. Elvia del Socorro**, de la **Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria** de la **Facultad de Química-UNAM** por el desarrollo de los análisis de TEM, IR, DRXP y DSC respectivamente.

Al **Q.F.B. Ricardo Arana Hidalgo** y a la **I.Q. Maribel** de **IS Analítica** por su apoyo en los consumibles del HPLC.

A la **comunidad del laboratorio de Neuropsicofarmacología del INNNN “Manuel Velasco Suarez”** por su apoyo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 112 “Biofarmacia” del Departamento de Farmacia del Conjunto E, en la UNEXA, en la USIIP y en la USAII, todos ellos de la Facultad de Química-UNAM.



El estudio de eficacia *in vivo* se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología de México.



Instituto Nacional de  
Cancerología

La determinación de la concentración inhibitoria cincuenta del mebendazol se realizó en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Instituto Nacional de  
Neurología y Neurocirugía  
Manuel Velasco Suárez



La caracterización de tamaño de glóbulo, potencial zeta y polidispersión se realizaron en la FES Cuautitlan-UNAM.



Que ocurría al momento de desarrollar este proyecto:

- El 25 de noviembre de 2016, transmuta Fidel; porque el liderazgo, la dignidad y convicción, requieren actitud.
- A partir del 2017, las becas CONACYT dejaron de estar ligadas al *Salario Mínimo* (SM) y se ajustaron a la *Unidad de Medida y Actualización* (UMA) y con ello la beca perdió aproximadamente el 17% de su valor. Pese a las protestas, movimientos y amparos que algunos compañeros realizamos, no se respetaron los contratos. El valor en el 2020 de la UMA era de \$86.88/día, mientras que el del SM fue de \$123.22/día.
- El 20 de enero de 2017 asume a la presidencia de Estado Unidos de América Donal Trump.
- El 19 de septiembre de 2017, justo 32 años después del terremoto del 19 de septiembre de 1985, se registró un sismo de 7.1 grados Richter, causando perdidas de familiares, económicas y emocionales que padecemos los habitantes de la Ciudad de México.
- El 5 de agosto de 2017 transmuta mi mentor de vida: Marcelino Perelló Vals, *a veces es la manera de llegar más rápido, a veces es la única manera de llegar, a menudo es la manera de no llegar y pese a todo casi siempre, es lo único que tiene sentido...Sentido Contrario.*
- En octubre de 2018 nacieron las gemelas Nana y Lulu, se asume que fueron los primeros humanos genéticamente modificadas mediante la técnica CRISPR por el investigador chino He Jiankui, debido a su falta de ética, él terminó en la cárcel y vetado de por vida del quehacer científico.
- El 1° de diciembre de 2018 asume la presidencia de México Andrés Manuel López Obrador.
- El 19 de septiembre de 2019 transmuta el pintor Francisco Toledo, la humildad y el talento pueden convivir.
- El 3 de febrero de 2020, transmuta mí abuela, pilar en mi formación y cuidado, por siempre.
- El 11 de marzo del 2020, la Organización Mundial para la Salud declara emergencia sanitaria la pandemia de la enfermedad COVID 19, causada por el virus SARS-CoV-2; México también entró en resguardo domiciliario de 7 meses. Hasta el 15 de octubre se reportaban más de 96,000 decesos.
- El 7 de octubre dos científicas ganaron el Premio Nobel de Química por su aportación en el campo de modificación molecular de genes humanos.
- El de octubre transmuta el científico mexicano Dr. Mario Molina, Premio Nobel de Química 1995 que contribuyó al conocimiento de la desintegración de la capa de ozono y la química atmosférica, su trabajo generó cambio en las políticas públicas globales.
- El 12 de octubre de 2020 transmutó el Dr. Guillermo Soberón, entre las múltiples acciones que realizó como Rector de la UNAM, fundó las ENEPs,. En una de ellas realice mi licenciatura, hoy FES Zaragoza.



A la memoria y legado de Margarita Hernández Molina...nos volveremos a encontrar.

## **DEDICATORIA**

## I ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Glioblastoma (GBM), el tumor cerebral más letal.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Generalidades.....	2
2.1.2 Características patológicas.....	3
2.1.3 Localización y sintomatología.....	5
2.1.4 Incidencia y mortalidad.....	6
2.1.5 Tratamientos.....	7
<b>2.2 Retos en el acceso de fármacos al cerebro.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 La administración nasal de fármacos como método para la evasión de la barrera hematoencefálica.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Anatomía de la cavidad nasal.....	9
2.3.2 Vías y mecanismos para la liberación de fármacos desde la cavidad nasal hacia cerebro.....	11
2.3.3 Consideraciones en la administración de fármacos por vía intranasal.....	15
2.3.4 Factores que influyen en la administración nasal.....	16
2.3.5 Empleo de hialuronato de sodio en la administración nasal.....	16
<b>2.4 Reposicionamiento del mebendazol para el tratamiento del GBM.....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Mebendazol (MBZ).....	20
2.4.2 Importancia de la cristalinidad del MBZ.....	22
<b>2.5 Desarrollo de microemulsiones para incrementar la solubilidad del MBZ.....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Tipos y clasificación de las microemulsiones.....	24
2.5.2 Los tensoactivos en las microemulsiones.....	26
2.5.3 Fase lipídica en microemulsiones.....	28
2.5.4 Estabilidad termodinámica de las microemulsiones.....	29
2.5.5 Métodos de preparación.....	30
2.5.6 Microemulsiones para la administración nasal de fármacos.....	32
<b>III JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>IV HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>V OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Objetivo general.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Objetivos particulares.....</b>	<b>35</b>
<b>VI PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 Materiales, reactivos y equipos.....</b>	<b>36</b>

<b>6.2 Metodología</b> .....	37
6.2.1 Diagrama de trabajo.....	37
6.2.2 Caracterización fisicoquímica del MBZ.....	37
6.2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	37
6.2.2.2 Difracción de rayos X de polvos (DRXP).....	37
6.2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
6.2.3 Método analítico para la cuantificación de MBZ por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	38
6.2.4 Estudios de solubilidad de mebendazol en diferentes excipientes.....	38
6.2.5 Desarrollo de los diagramas de fases pseudo-ternarios.....	39
6.2.6 Elaboración de microemulsiones conteniendo MBZ (MBZ ME).....	40
6.2.7 Cuantificación de MBZ en la microemulsión.....	41
6.2.8 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones.....	41
6.2.8.1 Inspección visual.....	41
6.2.8.2 Determinación de Tamaño de glóbulo (DTP), polidispersión (IP) y potencial zeta (PZ).....	41
6.2.8.3 Determinación de pH de las formulaciones.....	41
6.2.8.4 Determinación de conductividad eléctrica (S/m).....	42
6.2.8.5 Determinación de la morfología mediante el análisis de microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	42
6.2.8.6 Estudio de reología.....	42
6.2.8.6.1 Estudio de la viscosidad de las microemulsiones.....	42
6.2.8.6.2 Estudio viscoelástico de la formulación B.....	42
6.2.8.6.3 Evaluación de la viscosidad de la formulación B con respecto a la temperatura.....	42
6.2.8.7 Estudio de estabilidad de la formulación B.....	43
6.2.9 Determinación de la concentración inhibitoria cincuenta del MBZ.....	43
6.2.9.1 Condiciones del cultivo celular.....	43
6.2.9.2 Condiciones de evaluación.....	43
6.2.9.3 Determinación de la CI <sub>50</sub> del MBZ en la línea celular C6.....	44
6.2.10 Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad nasal.....	44
6.2.10.1 Animales.....	44
6.2.10.2 Administración nasal.....	44
6.2.10.3 Procesamiento de muestras.....	45
6.2.11 Estudio <i>in vivo</i> de la eficacia de la microemulsión de MBZ en un modelo murino ortotópico de glioblastoma.....	45
6.2.11.1 Animales.....	45
6.2.11.2 Generación del modelo murino ortotópico de glioblastoma.....	46
6.2.11.3 Evaluación de la eficacia de microemulsiones conteniendo MBZ.....	46
6.2.11.4 Estudio <i>ex vivo</i> de intensidad de fluorescencia.....	47
6.2.11.5 Análisis histológico.....	47
<b>VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>7.1 Caracterización fisicoquímica del MBZ</b> .....	48
7.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	48
7.1.2 Difracción de rayos X de polvos (PXRD).....	49
7.1.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	50
<b>7.2 Estudios de solubilidad de MBZ en diferentes excipientes</b> .....	51

<b>7.3</b>	<b>Desarrollo de los diagramas de fases pseudo-ternarios.....</b>	<b>52</b>
<b>7.4</b>	<b>Preparación de microemulsiones conteniendo MBZ (MBZ ME).....</b>	<b>56</b>
<b>7.5</b>	<b>Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones.....</b>	<b>57</b>
<b>7.6</b>	<b>Estudio de reología.....</b>	<b>59</b>
7.6.1	Estudio de la viscosidad de las microemulsiones.....	59
7.6.2	Estudio viscoelástico de las microemulsiones de la formulación B.....	60
7.6.3	Evaluación de la viscosidad de la formulación B con respecto a la temperatura B.....	62
<b>7.7</b>	<b>Estabilidad de la formulación B a temperatura ambiente.....</b>	<b>63</b>
<b>7.8</b>	<b>Determinación de la CI<sub>50</sub> del MBZ.....</b>	<b>64</b>
7.8.1	Condiciones de evaluación.....	64
7.8.2	Determinación de la CI <sub>50</sub> del mebendazol sobre la línea C6.....	64
<b>7.9</b>	<b>Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad nasal.....</b>	<b>65</b>
<b>7.10</b>	<b>Estudio <i>in vivo</i> de la eficacia de las microemulsiones de MBZ en un modelo murino ortotópico de glioblastoma.....</b>	<b>67</b>
7.10.1	Estudio <i>ex vivo</i> de intensidad de fluorescencia.....	69
7.10.2	Evaluación histopatológica del tejido cerebral.....	71
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>IX</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>X</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>XI</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
	Anexo I. Método analítico para la cuantificación de MBZ.....	86
	Anexo II. Difusión del trabajo.....	89
	Anexo III Artículo publicado generado de la investigación.....	90

## II ÍNDICE DE FIGURAS

No de Figura	Título	Página
1	Anatomía de la glía.	2
2	Microambiente tumoral del GBM.	4
3	Características histológicas del GBM.	5
4	Zonas afectadas en el cerebro por el GBM.	6
5	Descripción de la cavidad nasal.	10
6	Principales epitelios donde se presenta la absorción de fármacos en la cavidad nasal	11
7	Relación anatómica entre la cavidad nasal y el SNC	12
8	Vías de acceso de fármacos hacia el cerebro de administrados por vía intranasal	12
9	Esquema de los dos procesos para el transporte de fármacos hacia el cerebro	13
10	Transporte de fármacos hacia el cerebro	14
11	Estructura química del hialuronato de sodio	17
12	Estudio de supervivencia de MBZ en el modelo murino ortotópico de glioma reportado por Bai <i>et al.</i> , 2011	20
13	Estructura química del MBZ	21
14	Principales metabolitos de MBZ	22
15	Factores que determinan la cristalinidad del MBZ	23
16	Estructuras más comunes que adoptan las microemulsiones	24
17	Curvatura de la microemulsión	25

18	Efecto de la temperatura, la salinidad y la concentración de tensoactivo en los diferentes equilibrios de las microemulsiones	26
19	Diversas estructuras de autoasociación de los tensoactivos	27
20	Estructura química de los ácidos grasos	28
21	Estructura de los triglicéridos empleados en la formulación de microemulsiones	29
22	Esquema que propone las etapas que ocurren durante la elaboración de las microemulsiones mediante el método SE	31
23	Diagrama que muestra la formación de una microemulsión mediante el método PIT	32
24	Esquema que muestra la elaboración de microemulsiones mediante el método PIC	31
25	Diagrama de trabajo	37
26	Administración intranasal en el estudio de toxicidad de la formulación B (MBZ-ME-NaH).	45
27	Espectro de IR-FT de las diferentes materias primas de MBZ.	49
28	Difractograma de rayos X de polvos de las materias primas de MBZ	50
29	Termograma de las tres materias primas de MBZ	51
30	Solubilidad del MBZ en diferentes componentes	52
31	Diagramas de fases pseudo-ternarios empleando como fase lipídica AO/DHA (3:1) con Tween 80 / etanol a proporciones de a) 1:1, b) 2:1 y c) 3:1	53
32	Diagramas de fases pseudo-ternarios para la fase lipídica AO/DHA (3:1) empleando la combinación de Smix de a) Labrasol / Transcutol / etanol y b) Tween 80 / Transcutol / etanol, ambas a proporciones de 1:1:1	54
33	Diagramas de fases pseudo-ternarios para la fase lipídica AO/Labrafil M 2125 empleando como Smix: Tween 80 / / Transcutol / etanol a proporciones de a) 2:1:1, b) 1:0.5:1 y c) 1:2:1	55
34	Diagramas de fases pseudo-ternarios finales.	55

35	Apariencia de las microemulsiones de la formulación A y formulación B	57
36	Morfología de la formulación A y formulación B	59
37	Graficas de flujo de las microemulsiones	60
38	Estudio viscoelástico de las microemulsiones	62
39	Efecto de la viscosidad vs temperatura para la microemulsión MBZ-ME-NaH de la formulación B	63
40	Estabilidad de la microemulsión de la formulación B	63
41	Condiciones para determinar la IC <sub>50</sub> del MBZ	64
42	Curva de inhibición de la viabilidad celular vs concentración del MBZ empleando la línea C6	65
43	Evaluación macro del estudio de toxicidad nasal	66
44	Evaluación de la toxicidad nasal	67
45	Peso relativo de las ratas después de la implantación del tumor cuando se administró intranasalmente la microemulsión conteniendo MBZ	68
46	Estudio de supervivencia en el modelo ortotópico murino de glioma después de la administración intranasal del MBZ en la microemulsión	69
47	Estudio ex vivo de imagen NIRF	71
48	Evaluación histológica mediante el método H&E, del tejido cerebral de los diferentes grupos después de la administración	72



## ÍNDICE DE TABLAS

No de Tabla	Título	Página
I	Características tumorales del GBM.	6
II	Ventajas y desventajas de la vía intranasal para la administración de fármacos	15
III	Potencial de las microemulsiones para favorecer el acceso de fármacos al cerebro por AIN	32
IV	Compuestos evaluados en el estudio de solubilidad.	39
V	Proporciones empleadas para la elaboración de las microemulsiones correspondientes a la formulación A y B	56
VI	Abreviatura y descripción de las microemulsiones evaluadas.	56
VII	Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones correspondientes a la formulación A y la formulación B	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

No de Tabla	Descripción
A549	Células de adenocarcinoma pulmonar humano
AIN	Administración intranasal
AMC	Aclaramiento mucociliar nasal
AO	Ácido oleico
BCRP	Proteína de resistencia del cáncer de mama
BHE	Barrera hematoencefálica
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria cincuenta
DHA	Ácido docosaenoico
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América
GBM	Glioblastoma
H460	Células no pequeñas de cáncer de pulmón humano
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HUVEC	Células endoteliales
LCR	Líquido ceforraquídeo
MBZ	Mebendazol
MDA-MB-231	línea celular de cáncer de mama
MDR	Multi-resistencia a fármacos
ME / MEs	Microemulsión / microemulsiones
MT / MTs	Microtúbulo / microtúbulos
NaH	Hialuronato de sodio
O/W	Sistema aceite en agua
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-gp	Glicoproteína-P

SH-SY5Y	Línea celular de neuroblastoma
SNC	Sistema nervioso central
TNBC	Cáncer de mama triple negativo (ausencia de expresión de los receptores de estrógeno, receptores de progesterona y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2).
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
W/O	Sistema agua en aceite
WI38	Células de fibroblastos

## RESUMEN

El mebendazol (MBZ), es un fármaco antihelmíntico que ha demostrado su actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de glioblastoma (GBM), sin embargo, su baja solubilidad limita su absorción y por ende su efecto terapéutico, por lo tanto, son necesarias otras estrategias para mejorar su biodisponibilidad. El objetivo del presente trabajo fue formular, caracterizar y evaluar microemulsiones de MBZ con hialuronato de sodio (NaH) como agente mucoadhesivo para la administración intranasal.

El proyecto inició determinando la presencia de polimorfos mediante la caracterización fisicoquímica de tres lotes de materia prima de MBZ eligiendo aquella que presentó la mayor proporción del polimorfo C, farmacéuticamente el más favorecido. Se evaluó la solubilidad del MBZ en diferentes compuestos lipídicos, tensoactivos, co-tensoactivos y cosolventes y se seleccionaron aquellos que mostraron una mayor capacidad para solubilizar al fármaco. A partir de los diagramas de fases pseudo-ternarios, se eligieron dos formulaciones, con base a la mayor área de microemulsión, para la preparación de las microemulsiones con MBZ; formulación A con los siguientes componentes: 9% de la fase oleosa (OA/DHA), 51% de la combinación de Tween® 80 / Transcutol® / Etanol (Smix), 1:1:1 y 40% de agua. Mientras que los componentes de la formulación B fueron: 10% de fase oleosa (OA/Labrafil M 2125), 51% de Smix (Tween® 80 / Transcutol® / Etanol, 1:2:1) y 39% de agua. El tamaño de glóbulo de las formulaciones fue de 209 nm y 145 nm respectivamente. Ambos sistemas mostraron una morfología esférica y una buena estabilidad al ser sometidas tanto a estrés mecánico como térmico. El pH de los sistemas fue adecuado para la administración intranasal (5.08 y 5.36 respectivamente). La prueba de polidispersidad mostró que el proceso fue óptimo (<0.5) mientras que la conductividad demostró la formación de una microemulsión tipo O / W. El comportamiento reológico reveló un comportamiento de fluido newtoniano en las dos formulaciones. Al añadir el NaH al agua en la microemulsión, se encontró un incremento de cinco veces en la viscosidad de ambos sistemas y el comportamiento reológico fue de carácter pseudoplástico. El estudio de reología mostró a través de los cambios en la viscosidad, que no existen interacciones moleculares en la formulación B. La evaluación de la toxicidad nasal confirmó la ausencia de daño en el epitelio nasal de roedores, asegurando la seguridad de la administración nasal de la formulación B. Al llevar a cabo el estudio *in vivo* de la formulación B en el modelo murino ortotópico de GBM, se encontró un incremento de la supervivencia media de 30 días en comparación con los 15 días del control, mientras que el estudio *ex vivo* de intensidad de fluorescencia demostró una reducción del tumor, además, la evaluación de la histología reveló una reducción de las características de malignidad en el tejido cerebral. Los resultados sugieren que la administración intranasal del MBZ en presentación microemulsión, podría ser apropiada para el tratamiento del GBM.

**ABSTRACT**

Mebendazole (MBZ) is an anthelmintic drug that has demonstrated its activity both *in vitro* and *in vivo* in glioblastoma models, however, its low solubility limits its absorption, therefore, other strategies are necessary to improve its bioavailability. The objective of the present work was to formulate, characterize and evaluate microemulsions with sodium hyaluronate (NaH) as a mucoadhesive agent for the intranasal administration of MBZ.

The development began by determining the presence of polymorphs through the physicochemical characterization of three batches of MBZ raw material, choosing the one that presented the highest proportion of polymorph C. The solubility of MBZ in different lipid, surfactant, co-surfactant and cosolvent compounds was evaluated. Those that showed a greater capacity to solubilize the drug were selected. From the pseudoternary phase diagrams, two formulations were chosen for the preparation of the microemulsions with Mebendazole: Formulation A with the following components 9% of the oil phase (OA / DHA), 51% of the combination of Tween® 80 / Transcutol® / Ethanol (Smix), 1:1:1 and 40% water. While the components of formulation B were: 10% oil phase (OA / Labrafil M 2125), 51% Smix (Tween® 80 / Transcutol® / Ethanol, 1: 2: 1) and 39% water. The particle size of the formulations was 209 nm and 145 nm respectively. Both systems showed a spherical morphology and good stability when subjected to both mechanical and thermal stress. The pH of the systems was adequate for intranasal administration (5.08 and 5.36). The polydispersity test showed that the process was optimal ( $<0.5$ ) while the conductivity showed the formation of an O / W type microemulsion. The rheological behavior revealed a Newtonian fluid behavior in the two formulations obtained (A and B). When adding sodium hyaluronate, a five-fold increase in the viscosity of both systems was found and the rheological behavior was pseudoplastic. The rheology study allowed to rule out molecular interactions in formulation B. The evaluation of nasal toxicity confirmed the absence of damage in the nasal epithelium of rodents, ensuring the safety of nasal administration of formulation B. In addition, the *in vivo* study of Formulation B, demonstrated the increase in the mean survival of 30 days compared to the 15 days of the control in the orthotopic murine glioblastoma model, while the *ex vivo* study of fluorescence intensity demonstrated a reduction of the tumor, furthermore, the evaluation of the histology revealed a reduction of the characteristics of malignancy in the brain tissue. The results suggest that the intranasal administration of mebendazole in microemulsion presentation could be appropriate for the treatment of glioblastoma.

## I INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GBM) está considerado como el tumor cerebral más letal, agresivo y de mayor incidencia en humanos (Wilson *et al.* 2014). Los tratamientos disponibles para esta enfermedad resultan insuficientes, ya que permiten una supervivencia media de aproximadamente 14.6 meses (Stupp *et al.* 2009), y menos del 5% de los pacientes logra vivir más de cinco años (Gould, 2018).

Existen diferentes reportes en la literatura (Pantziarka *et al.*, 2014 Guerini *et al.*, 2019) que han demostrado el efecto anticanceroso del mebendazol (MBZ), fármaco utilizado en la clínica por más de 30 años como agente antiparasitario. Particularmente es de interés, la actividad observada sobre GBM por la potencia y baja toxicidad encontrada en los estudios preclínicos. Sin embargo, la baja solubilidad acuosa que presenta este fármaco compromete su absorción y por lo tanto su biodisponibilidad.

La barrera hematoencefálica (BHE) es la estructura que controla el paso de todas las sustancias al cerebro y también es el principal factor que limita el acceso de fármacos, y es por ello por lo que, pocos fármacos alcanzan concentraciones terapéuticas en los tumores cerebrales (Abbot, 2010). Por lo anterior, se han explorado y desarrollado nuevos enfoques que permitan el ingreso de fármacos hacia el sistema nervioso central (SNC), entre ellas, la administración nasal (Wolsen 2013). Esta vía de administración es un método no invasivo de evasión de la BHE ya que los fármacos liberados intranasalmente pueden ser transportados desde la región olfatoria por las terminaciones neuronales del bulbo olfatorio, directamente al cerebro o al líquido cefalorraquídeo (Crowe *et al.*, 2018).

Las microemulsiones han surgido como una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de diversos fármacos hidrofóbicos debido a que incrementan su solubilidad, además de la sencillez en su elaboración, su estabilidad termodinámica, su biocompatibilidad y la posibilidad de su administración por vías no convencionales, como la vía oftálmica y la vía nasal (Lawrence y Rees, 2012).

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de microemulsiones de MBZ para administración nasal empleando el hialuronato de sodio como agente mucoadhesivo y su evaluación preclínica en el modelo *in vivo* de GBM.

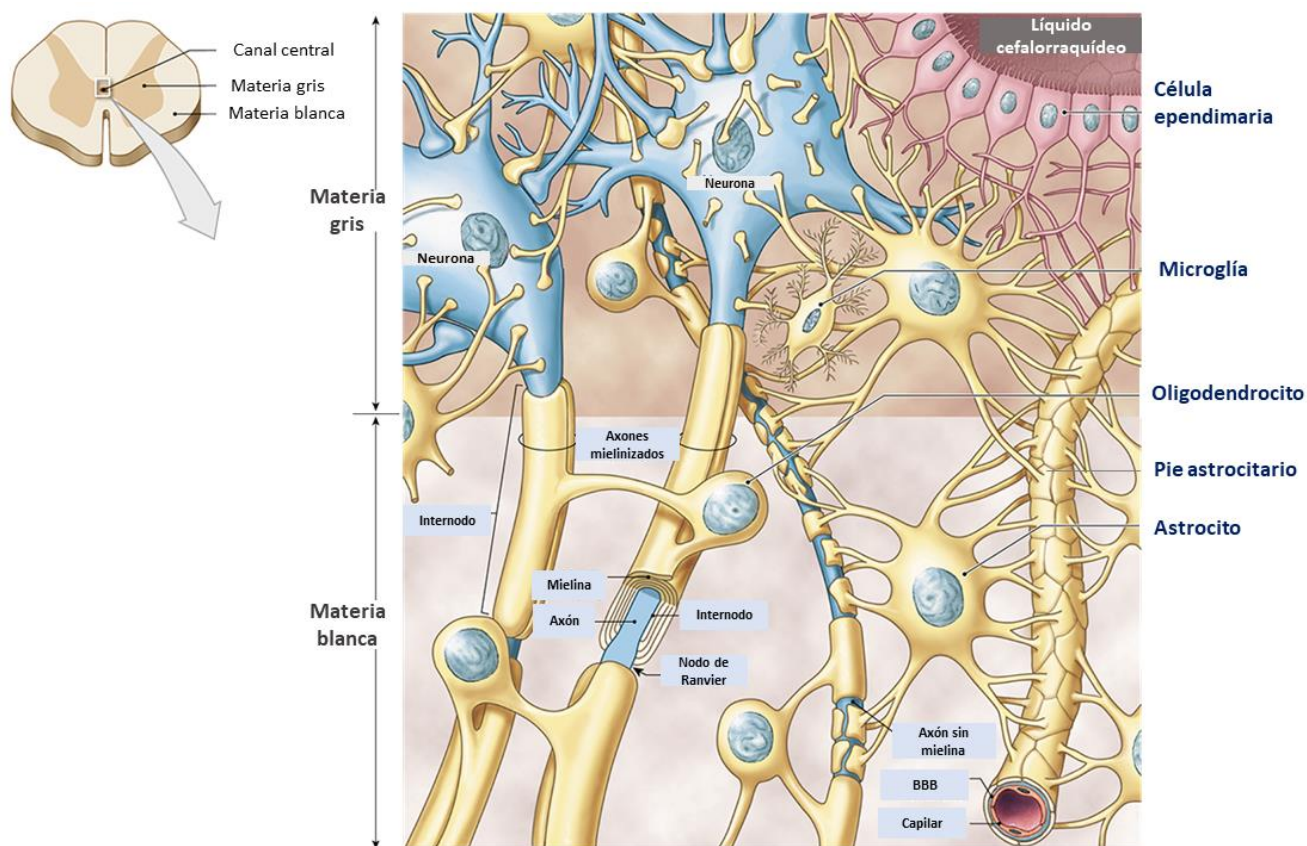
## II ANTECEDENTES

### 2.1 Glioblastoma (GBM), el tumor cerebral más letal.

#### 2.1.1 Generalidades.

El término glioma es empleado para describir una gran variedad de tumores cerebrales que son generados en la glía, la cual está constituida por un conjunto de células funcionalmente diferentes a las neuronas (**Figura 1**). A la fecha, la OMS reconoce que existen aproximadamente 100 tipos de tumores cerebrales (Louis *et al.*, 2016).

Las células gliales generalmente más pequeñas que las neuronas, tienen la capacidad de proliferar y están en una mayor proporción que las neuronas, ocupando más de la mitad del volumen tanto del cerebro como de la médula espinal. Las células gliales abarcan: la macroglía, la cual está conformada por: 1) astrocitos, 2) oligodendrocitos, y 3) endoteliales y la microglía, la cual está constituida por células microgliales, que conforman el sistema inmune del SNC (Ohtaki y Shioda, 2015).



**Figura 1. Anatomía de la glía.** El glioma tiene su origen en la glía, la cual, está constituida por diferentes tipos de células que comparten una estrecha relación con las neuronas y cumplen funciones específicas el mantenimiento y funcionamiento del SNC (Modificado de Mescher, 2018).



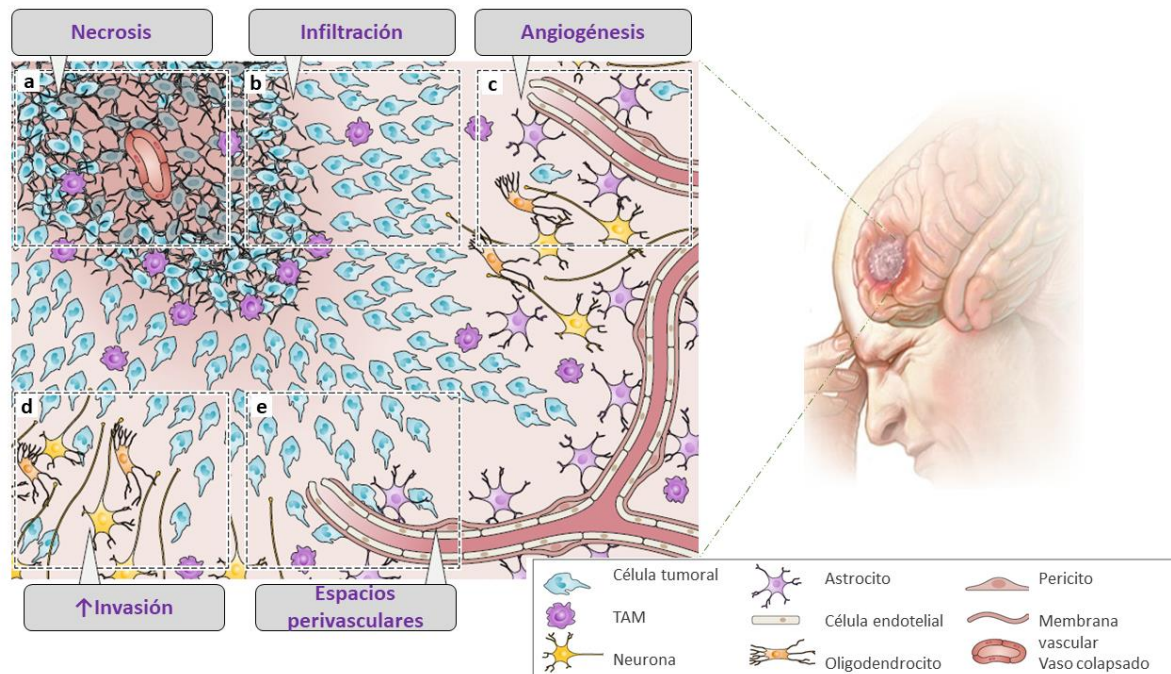
El GBM, es un tipo de cáncer del cerebro y es considerado universalmente como una enfermedad letal. Fue identificado por primera vez en 1863 por el Dr Rudolf Virchow quién lo clasificó como un tumor de origen atribuido a las células gliales (Agnihotri *et al.*, 2013). En la actualidad, se sabe que la génesis de la enfermedad está asociada a los cambios moleculares y genéticos ocurridos en los astrocitos, dependiendo de los múltiples cambios moleculares y la velocidad de progresión en ellos. La enfermedad se puede clasificar como glioblastoma primario o secundario, siendo el primero el más agresivo y letal.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC y ocupan un lugar primordial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Pueden estar presentes tanto en la materia gris (protoplásmicos) como en la materia blanca (fibrosos). Los astrocitos están altamente ramificados y conectados con la red vascular neuronal mediante terminaciones celulares conocidas como pie astrocitario (Zuchero y Barres, 2015). Hoy se sabe que estas células están asociadas a una gran variedad de procesos y funciones neuronales, tales como, el aporte nutricional, la regulación metabólico neuronal y la regulación de la presión neurovascular mediante el control del flujo de líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, se ha asociado su participación en el proceso de comunicación sináptica, ya que se ha demostrado su actividad en la captación y reciclaje de los neurotransmisores emitidos en el espacio sináptico con regulación extracelular de  $K^+$ . Recientemente, también, se ha propuesto una importante participación de los astrocitos en los procesos de regulación y reorganización de la sinapsis inducida por la liberación de proteínas promotoras (Zuchero y Barres, 2015).

### 2.1.2 Características patológicas.

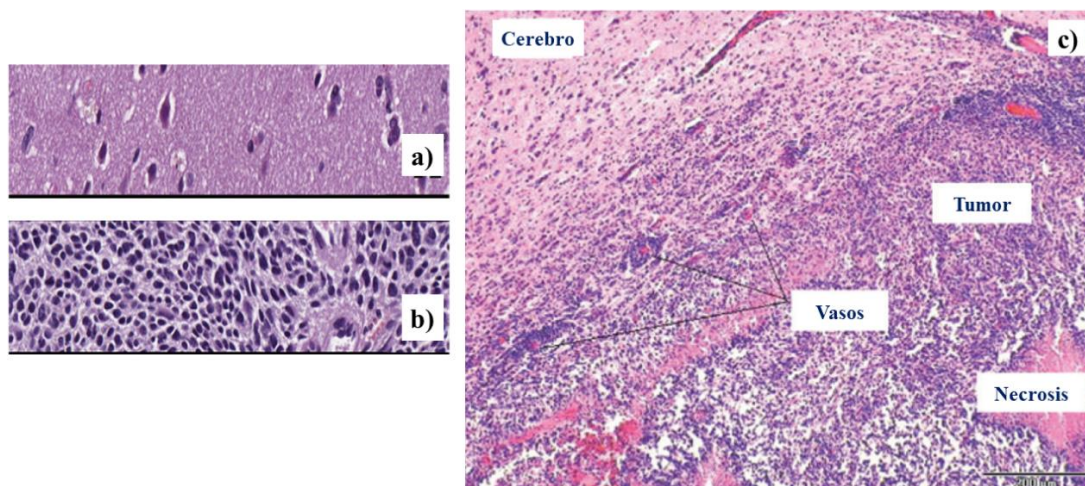
Entre las características patológicas del GBM se puede mencionar que presenta una alta capacidad de migración e invasión tanto del tejido neuronal (parénquima) como de la red cerebrovascular. Su gran capacidad de infiltración se atribuye a las células madre de glioblastoma (glioblastoma stem cells, GSC), que son las responsables de la vasta heterogeneidad intratumoral. Presentan una gran capacidad de auto renovación y diferenciación, aportándole un carácter refractario al tumor. El núcleo tumoral constituido en su mayoría por GSC's son las responsables de la elevada quimio-resistencia y recurrencia del GBM (Wolf *et al.*, 2019, Prager *et al.*, 2020). Existe también una abundante densidad celular, hipoxia, y una robusta angiogénesis (**Figura 2**), la cual puede desencadenar cuadros de trombosis.





**Figura 2. Microambiente tumoral del GBM.** **a)** Los cuadros de necrosis generan una reducción de la elasticidad del tejido neuronal, una oclusión de los vasos y un aumento de la hipoxia, **b)** las células tumorales se desplazan de esta zona hacia el interior del tejido; se observa un incremento en la producción de la matriz extracelular con respecto al tejido sano. **c)** El tumor presenta una hiper-vascularidad con una elevada angiogénesis, sin embargo, la vasculatura tumoral es pobremente definida y homogénea, lo cual genera zonas de variación de la presión intersticial. **d)** La invasión del parénquima puede modificar algunos fragmentos mielinizados. **e)** También, se presenta una invasión de la vasculatura de las células tumorales, este proceso genera espacios perivasculares y promueve la permanencia de las GSC. **TAM:** macrófagos relacionados a los tumores (imagen modificada de Wolf *et al.*, 2019).

Histológicamente, el GBM, se caracteriza por la presencia de necrosis y una excesiva proliferación microvascular. Sin embargo, existen otras propiedades indicativas de malignidad tales como una pobre diferenciación neoplásica astrocitaria, invasión, pérdida de diferenciación estructural y funcional (anaplasia), variación en el tamaño y forma, tanto de la célula, como del núcleo (polimorfismo celular), además, por una alta actividad mitótica (**Figura 3**) (Stoyanov y Dzhenkov, 2018).

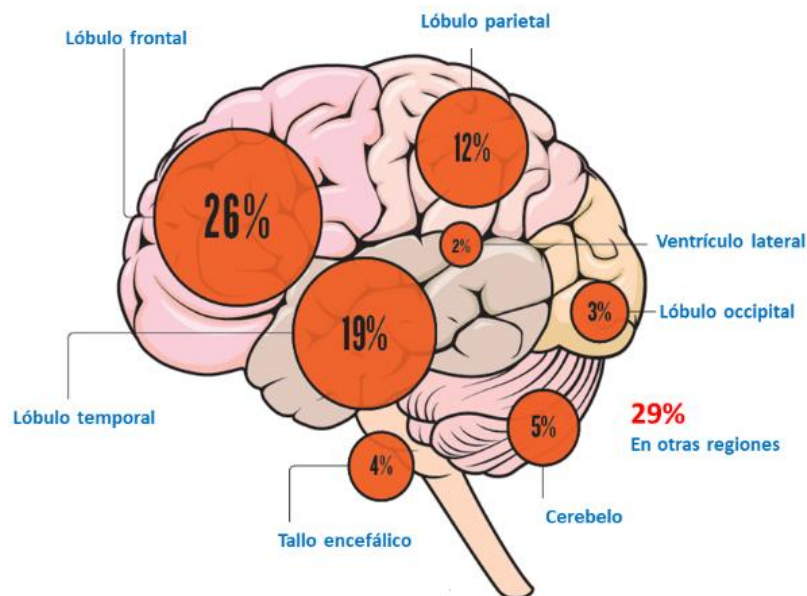


**Figura 3. Características histológicas del GBM.** Tinciones de eosina y hematoxilina de **a)** un tejido en condiciones normales, **b)** tejido de GBM y **c)** alteraciones histológicas del GBM (imagen modificada de Stoyanov, Dzhenkov, 2018, y Lisenman, *et., al* 2019).

### 2.1.3 Localización y sintomatología.

Aún cuando la mayoría de los tumores del SNC se localiza en las meninges, el GBM se encuentra habitualmente en la corteza cerebral, siendo las zonas más afectadas el lóbulo frontal, temporal y parietal (**Figura 4**) (Gould, 2018), con respecto a los hemisferios del cerebro, ambos pueden ser afectados sin ninguna distinción. La **Tabla I** muestra algunas características observadas con detalle en los pacientes.

Debido a la presión intracraneal y a la destrucción del tejido neuronal, los pacientes suelen presentar síntomas, tales como: cefalea, convulsiones, visión borrosa, problemas de equilibrio, náuseas, vómito, parálisis en extremidades y deterioro cognitivo (Gould, 2018), con lo cual, su calidad de vida se ve gravemente afectada.



**Figura 4. Zonas afectadas en el cerebro por el GBM.** El glioblastoma puede desarrollarse en diferentes zonas del cerebro, siendo la región supra sensorial la más afectada, mientras que el lóbulo occipital y el cerebelo las menos propensas (imagen modificada de Gould, 2012).

**Tabla I. Características tumorales del GBM.** Comprende aquellas observadas en un estudio clínico de 330 pacientes (Proveniente de Award *et al.*, 2017).

Variable	Frecuencia
<b>Lado</b>	
Derecho	139 (42.1%)
Izquierdo	168 (50.9%)
Bilateral	23 (7.0%)
<b>Ubicación</b>	
Frontal	132 (40.0%)
Temporal	139 (42.1%)
Parietal	99 (30.0%)
Occipital	50 (15.2%)
Ventricular	117 (36.0%)
Hipocampo	51 (15.5%)
Tallo cerebral	4 (1.2%)
Profundidad nuclear/Ganglio basal	32 (9.7%)
Cerebelo	3 (0.9%)
<b>Morfología</b>	
Lesión en "mariposa"	22 (6.7%)
Multifocal	57 (17.3%)
<b>Impacto funcional</b>	
Área elocuente	143 (43.3%)
Área motora	62 (18.8%)
Área sensorial	43 (13.0%)
Área visual	87 (26.4%)
Área del lenguaje	25 (7.6%)
Área de la memoria	26 (7.9%)

#### 2.1.4 Incidencia y mortalidad.

Aproximadamente el 50% de las neoplasias intracraneales corresponden a los gliomas, siendo entre el 50 al 80% la fracción asociada al GBM, convirtiéndolo en el tumor cerebral más recurrente en el mundo (Trejo *et al.*, 2018. Gould, 2018). En México, las tendencias son similares; se ha reportado que el 67% de la frecuencia de los tumores cerebrales diagnosticados corresponden a este tipo de tumor (Aguirre *et al.*, 2016).

La incidencia del GBM a nivel mundial se estima de 0.6 a 3.7 casos por cada 100.000 personas (Wang *et al.*, 2019), registrándose una tasa de incremento del 3% cada año (Gately *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de su baja incidencia, esta enfermedad presenta una letalidad extremadamente alta. La supervivencia media con tratamiento es de aproximadamente 14.6 meses y menos del 5% de los pacientes diagnosticados e intervenidos logran vivir más de 5 años (Stupp *et al.*, 2009, Huang y Yang, 2018). Además, el registro de la mortalidad de la enfermedad no se ha modificado durante las últimas tres décadas (Gould, 2018).

Se ha observado que los hombres tienen un 55% más probabilidad de presentar glioblastoma que las mujeres. El GMB primario es más frecuente en adultos mayores (Edad promedio de 65 años), mientras que el GBM

secundario se presenta más en la población con una edad promedio de 45 años (Tamimi y Juweid, 2017). La tasa de incidencia observada para las diferentes poblaciones, en orden de mayor a menor es: norteamericanos blancos, europeos blancos, caucásicos, latinos y asiáticos (Tamimi y Juweid, 2017).

### 2.1.5 Tratamientos.

La primera línea de atención para el GBM es la intervención quirúrgica bajo el lineamiento de *resección máxima segura*, sin embargo, en la mayoría de los casos, no es posible remover el total del tejido tumoral debido a que, por su ubicación, las funciones cerebrales podrían estar comprometidas. La naturaleza infiltrativa del tumor también resulta otra limitante para una intervención quirúrgica exitosa (Awad *et al.*, 2017). El empleo de radioterapia con quimioterapia concomitante es una de las estrategias más empleadas debido a los buenos resultados obtenidos hasta el momento, ya que ha permitido un incremento en la media de supervivencia de 14.6 meses con respecto a los pacientes que no la recibieron, la cual fue de 12.1 meses (Stupp *et al.*, 2009).

Por otra parte, el número de fármacos empleados para el tratamiento de GBM es muy reducido, siendo los más importantes dos agentes alquilantes: temozolomida (TMZ, temodal®) y carmustina (gliadel®). Ambos compuestos son profármacos y no poseen una actividad específica en el ciclo celular. La carmustina fue aprobada para GBM en 2002. El fármaco se administra como una tableta polimérica conteniendo 3.85% de carmustina, la cual se coloca en la zona intervenida inmediatamente después de la cirugía. Con este tratamiento, el incremento en la media de supervivencia de 220 pacientes fue de 2.3 meses. La baja eficacia se atribuye a la difusión del fármaco hacia otras zonas del tejido no tumoral y su alto costo lo hace poco accesible a muchos pacientes (Parrish *et al.*, 2015).

La TMZ es el fármaco de elección para el tratamiento del GBM. Fue aprobado por la FDA en 1999 (Cohen *et al.*, 2005). Esta molécula se convierte rápidamente al metabolito alquilante activo MTIC (metil-triazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida). La conversión es espontánea, no enzimática y se lleva a cabo en las condiciones fisiológicas en los tejidos en los que se distribuye. Los efectos citotóxicos de MTIC se manifiestan a través de la alquilación (metilación) de ADN en los sitios N7 y O6 en guanina y el N3 en adenina mediante la adición de grupos metilo. (Zhang *et al.*, 2012). El fármaco se administra por vía oral y cruza la barrera hematoencefálica, sin embargo, presenta una alta afinidad por la glicoproteína P y una vida media corta, de 1.8 h (Newlands *et al.*, 1992). El esquema del tratamiento está en función de la tolerabilidad del paciente (Stupp *et al.*, 2014). Los efectos adversos, asociados son: toxicidad hematológica, miocardiopatía, ulceración oral, hepatotoxicidad y toxicidad pulmonar (Shapira *et al.*, 2019). En México, el uso de nitrosoureas, combinado con carmustina, procarbazona y vincristina ha sido ampliamente utilizado como una alternativa de reemplazo ante el elevado costo que representa la TMZ (Celis *et al.*, 2015).



Con respecto al empleo de medicamentos biotecnológicos, el uso de bevacizumab no ha mostrado ser más eficaz que la terapia convencional (Diaz *et al.*, 2017). Existen otras alternativas que continúan siendo evaluadas, como es el caso del uso de vacunas (Winograd *et al.*, 2016).

## 2.2 Retos en el acceso de fármacos al cerebro.

El empleo de fármacos antitumorales solos o en combinación, es y seguirá siendo uno de los pilares en el tratamiento de los tumores sólidos debido a la viabilidad, la factibilidad, la accesibilidad, y por supuesto la eficacia, particularmente, en los estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, la quimioterapia se enfrenta a diversos factores que minimizan su éxito, uno de ellos es el microambiente tumoral. Este microambiente presenta una gran variedad de características que merman la eficacia de la terapia, entre ellas: el aumento de la acidez y la hipoxia en el tejido tumoral, que puede afectar la estabilidad de los fármacos, la red vascular está pobremente organizada lo cual genera variabilidad de presiones de flujo, así como un incremento en las distancias inter-capilares en el tumor, a diferencia de lo que ocurre en un tejido sano. De igual forma las multicapas de células cancerosas impiden el acceso del fármaco al núcleo del tumor (Tannock *et al.*, 2002).

En el caso del GBM, el tratamiento farmacológico presenta una dificultad adicional asociada a un aspecto anatómico-fisiológico, la barrera hematoencefálica (BHE). Durante la progresión tumoral, se ha observado que aún cuando la BHE presenta pérdida de su integridad, se mantiene su capacidad de impedir el paso de los fármacos antitumorales (van Tellingen *et al.*, 2015). Además, algunas zonas tumorales mantienen sus condiciones intactas (de Vries *et al.*, 2006).

La BHE es una “barrera física” altamente compleja y especializada, su principal función radica en regular el intercambio de una gran variedad de sustancias esenciales, ya que posee una gran variedad de mecanismos que le confieren una alta selectividad, tanto en el ingreso como en el egreso y también, delimita el acceso de patógenos, de fármacos y sustancias tóxicas, todo esto le confiere lo necesario para mantener la homeostasis neuronal. (Abbot *et al.*, 2010). Está constituida por células endoteliales que forman las paredes de los capilares que circundan la red neurovascular. El sistema conocido como “uniones estrechas” (acrónimo de tight junctions, TJ, por sus siglas en inglés) obliga a que el transporte sea de carácter transcelular. La presencia de las TJ en la BHE genera una alta resistencia eléctrica endotelial de 1500-2000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  comparada con la mayoría de la microvasculatura periférica la cual es de 3-30  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Lochhead *et al.*, 2012, Crone y Olesen 1982).

Un estudio demostró que, de 7000 moléculas evaluadas, únicamente el 5% podían atravesar la BHE a concentraciones terapéuticas (Aday *et al.*, 2016). Una concepción común es que las moléculas pequeñas, con

peso molecular menor de 400 Da y que presenten lipofilicidad considerable (en un rango de 1 a 3, Amott, y Planey 2012), podrían atravesar por difusión pasiva, sin embargo, se demostró que sólo el 10% logran atravesar, ya que estas son expulsadas por diversas proteínas endógenas transmembranales tales como la P-gp, que pertenece a la familia MDR (Multi Drug Resistance Protein) y BCRP (Crawford *et al.*, 2016).

### 2.3 La administración nasal de fármacos como método para la evasión de la barrera hematoencefálica.

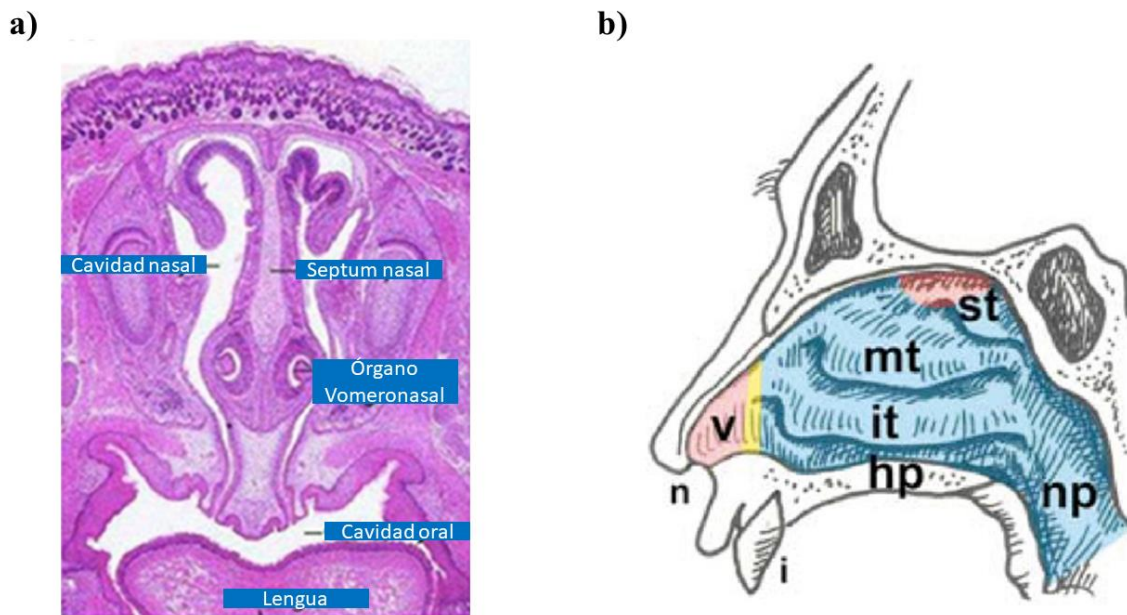
A principio de 1869, se encontró que el tinte inyectado en el espacio subaracnoideo aparecía en los ganglios linfáticos cervicales profundos, lo que indicaba alguna forma de comunicación entre los dos espacios que parecían estar ubicados dentro de la nariz (Crowe *et al.*, 2018). En 1986, se demostró que trazas de conjugados de aglutinina de germen de trigo podrían localizarse en los axones de los nervios olfativos y en el interior del bulbo olfatorio después de su administración por vía nasal (Balin *et al.*, 1986). Por lo anterior, se ha considerado que esta vía tiene un alto potencial para el tratamiento del GBM (Bruismann *et al.*, 2019).

#### 2.3.1 Anatomía de la cavidad nasal.

La vía nasal es la principal ruta de acceso de aire al cuerpo; ingresando un volumen de 20-30 L/min de aire, para acumular un total de 12 000 L de aire diariamente (Djupesland, 2013). El pH de la superficie nasal es de 7.39, mientras que el de las secreciones nasales es de 5.5-6.5 en adultos y 5.0-6.7 en infantes (Behl *et al.*, 1998).

La nariz comprende dos cavidades simétricas independientes, derecha e izquierda, que están divididas por el septum nasal mientras que la cavidad nasal y la cavidad oral, están divididas a su vez, por el hueso palatino (**Figura 5a**). La cavidad nasal está recubierta por una capa de moco y poseen un área total superficial de 150-200 cm<sup>2</sup>, con un volumen total de 13-25 mL (Illum, 2000), además, posee una extensión de 12-14 cm y una altura de 5 cm. El septum nasal también contiene en su base, una pequeña apertura donde la terminal del nervio vomeronasal se encuentra accesible mediante del órgano del mismo nombre (VNO) (**Figura 5a**). Este órgano está asociado a la capacidad de recolectar información por medio de receptores de sustancias conocidas como vomeroferrinas, las cuales se asocian a conductas tanto de nivel social, sexual como maternal (Naser *et al.*, 2008). Esta ruta ha sido también propuesta para la absorción de fármacos hacia el cerebro, aunque no ha sido bien establecido el mecanismo (Erdó *et al.*, 2018).

Cada una de las cavidades nasales puede dividirse, con base a las características del epitelio, en tres regiones principales, nombradas región vestibular nasal, región respiratoria y región olfatoria; el atrio es una región intermedia entre el vestíbulo y la región respiratoria (**Figura 5b**).



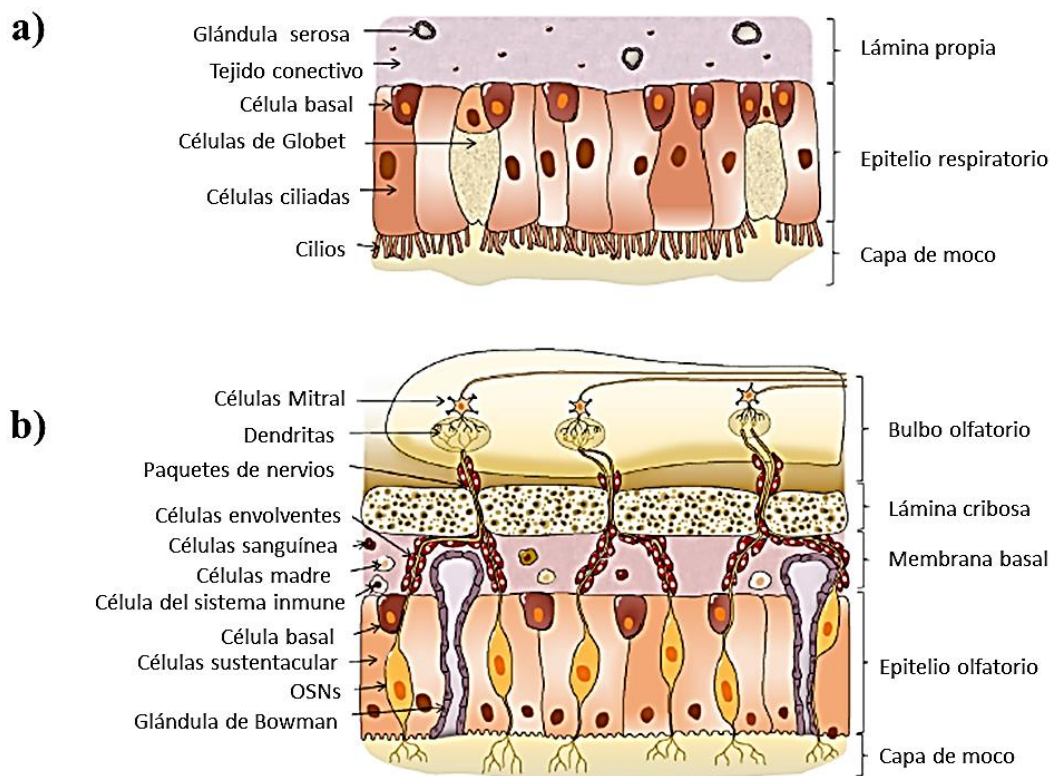
**Figura 5. Descripción de la cavidad nasal. a)** Histología de la cavidad nasal y **b)** Regiones de acuerdo con el epitelio de la cavidad nasal: rosa, amarillo, azul y rojo representan la región vestibular, atrio, respiratorio y olfativo. *n*: fosas nasales, *v*: vestíbulo; *it*: turbinato inferior, *mt*: turbinato medio, *st*: turbinato superior, *hp*, hueso palatino y *np*: nasofaringe (modificado de Erdő *et al.*, 2018, Harkema *et al.*, 2012).

La región vestibular es la más anterior de la cavidad y se localiza inmediatamente después de las fosas nasales, su superficie es de tan sólo 0.6 cm<sup>2</sup>; contiene los vellos nasales cuya función es filtrar el aire introducido para eliminar partículas grandes. La absorción de fármacos en esta región está altamente restringida (Erdő *et al.*, 2018).

La región respiratoria prosigue a la región vestibular y consiste en una red compleja de paredes laterales conocidas como turbinatos. Estas estructuras se proyectan desde el muro lateral hacia el interior de la cavidad nasal y participan en el calentamiento, filtración y humectación del aire inhalado (**Figura 6b**). Es la región respiratoria más amplia con 130 cm<sup>2</sup> aproximadamente y la más vascularizada. En esta región se lleva a cabo la mayor absorción sistémica de fármacos, debido a la alta vascularización y a las microvellosidades que recubren al epitelio. (Bourganis *et al.*, 2018) (**Figura 6a**).

En contraste con la región respiratoria, la región olfatoria recibe el abastecimiento de sangre por medio de las ramificaciones de la arteria oftálmica. Esta región ocupa un área superficial de 2.0-12.5 cm<sup>2</sup> (1.25-10.0% del área total de la cavidad nasal). Las células sustentaculares son las más abundantes en este epitelio, por otra parte, las OSNs neuronas sensoriales olfatorias (OSNs por sus siglas en inglés) representan las células más importantes. Estas son células tipo bipolares, intercaladas entre las células sustentaculares. Son responsables de la recepción de olor y de la transducción del estímulo químico hacia la señal neuronal, el cual es la base del proceso olfativo. Las OSNs poseen dendritas en la superficie apical que se proyectan sobre la capa de moco nasal. En la superficie basal las OSNs poseen axones desmielinizados que transmiten las señales del estímulo

olfativo por medio del nervio olfativo y se insertan en la placa cribiforme del hueso etmoides, para comunicarse al glomérulo del *bulbo olfatorio*, el cual, tiene comunicación directa hacia el cerebro (Bourganis *et al.*, 2018) (Figura 6b)

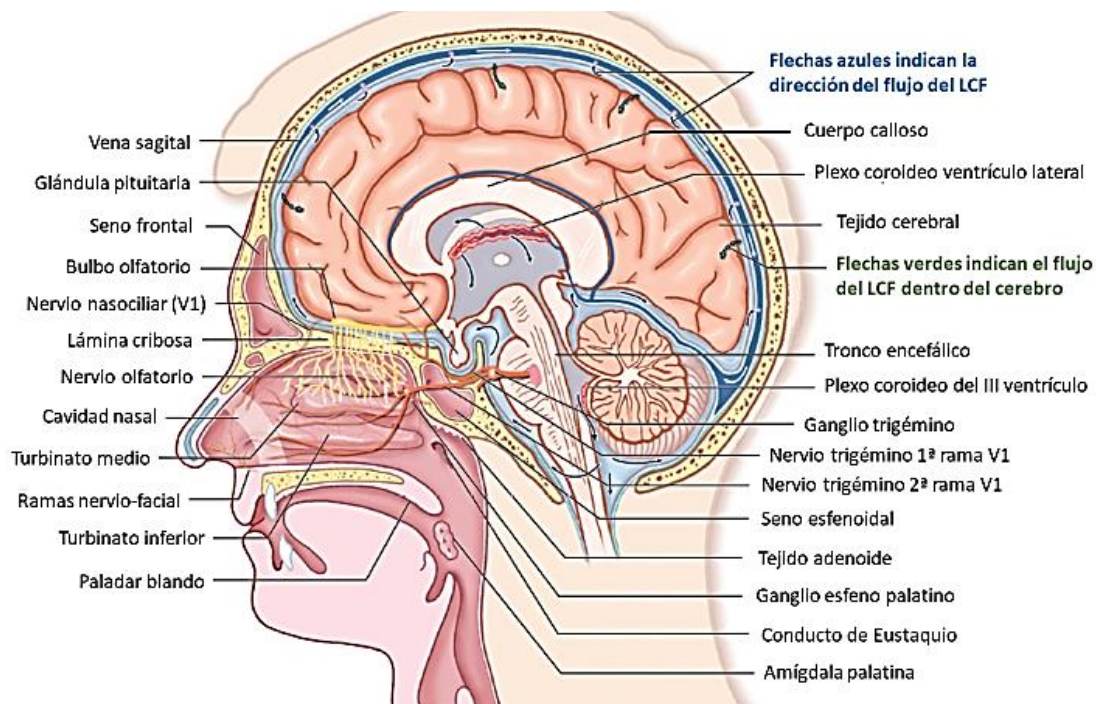


**Figura 6. Principales epitelios donde se presenta la absorción de fármacos a) respiratorio y b) olfativo (modificado de Bourganis *et al.*, 2018).**

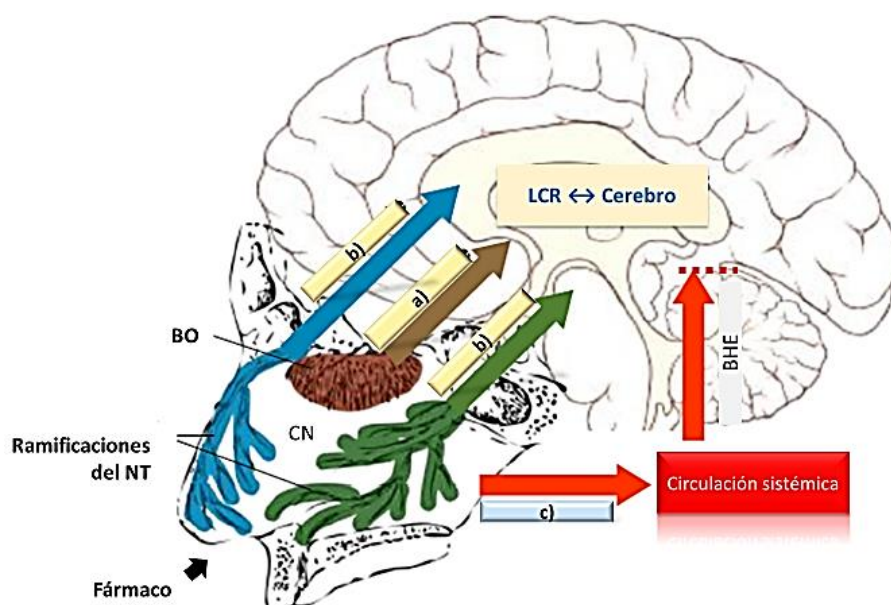
### 2.3.2 Vías y mecanismos para la liberación de fármacos desde la cavidad nasal hacia cerebro.

La vía intranasal (IN) es un método no invasivo para evadir la BHE y permitir el acceso de fármacos al SNC. Se ha explorado también la administración de moléculas biológicas tales como, péptidos, proteínas, oligonucleótidos y vectores virales (Lochhead *et al.*, 2012). Esta vía presenta un significativo interés atribuido a la anatomía de la zona (Figura 7), ya que permite que los fármacos accedan directamente hacia el cerebro mediante el epitelio olfatorio o por medio del nervio trigémino. Además, la absorción en la zona del epitelio respiratorio evita el efecto de primer paso, por lo que la cantidad en circulación sistémica se ve incrementada (Figura 8).



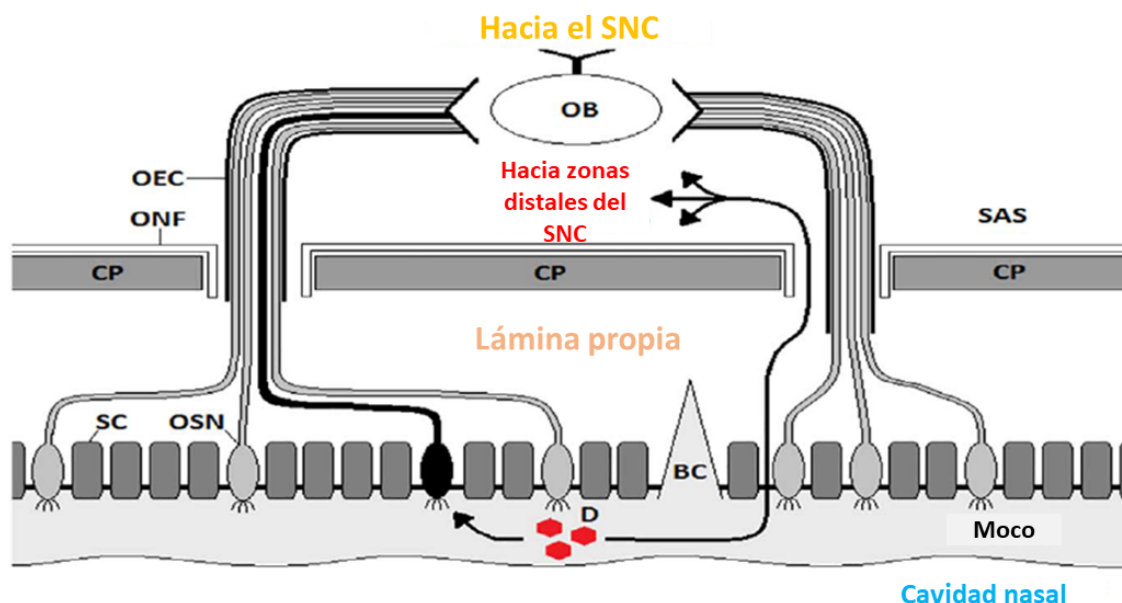


**Figura 7. Relación anatómica entre la cavidad nasal y el SNC (modificado de Djupesland *et al.*, 2014).**



**Figura 8. Vías de acceso de fármacos hacia el cerebro administrados por vía intranasal. a) epitelio olfatorio y b) nervio trigémino ambas se consideran como vías de acceso directo y c) epitelio respiratorio dónde se presenta absorción sistémica. El predominio de cada vía radica tanto de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como de las condiciones anatómo-fisiológicas de cada área de la cavidad nasal LCR: Líquido cefalorraquídeo, BO: bulbo olfatorio, CN: Cavidad nasal, NT: nervio trigémino y BHE: barrera hematoencefálica.**

El transporte de fármacos desde la cavidad nasal hasta el parénquima se da por medio de los nervios olfatorios o desde las ramificaciones del nervio trigémino. Una vez que las moléculas son liberadas en las secciones iniciales de los nervios, están disponibles para distribuirse en el cerebro. Este proceso ocurre por medio de dos vías, una extracelular y otra intracelular (**Figura 9**) (Crowe *et al.*, 2018).



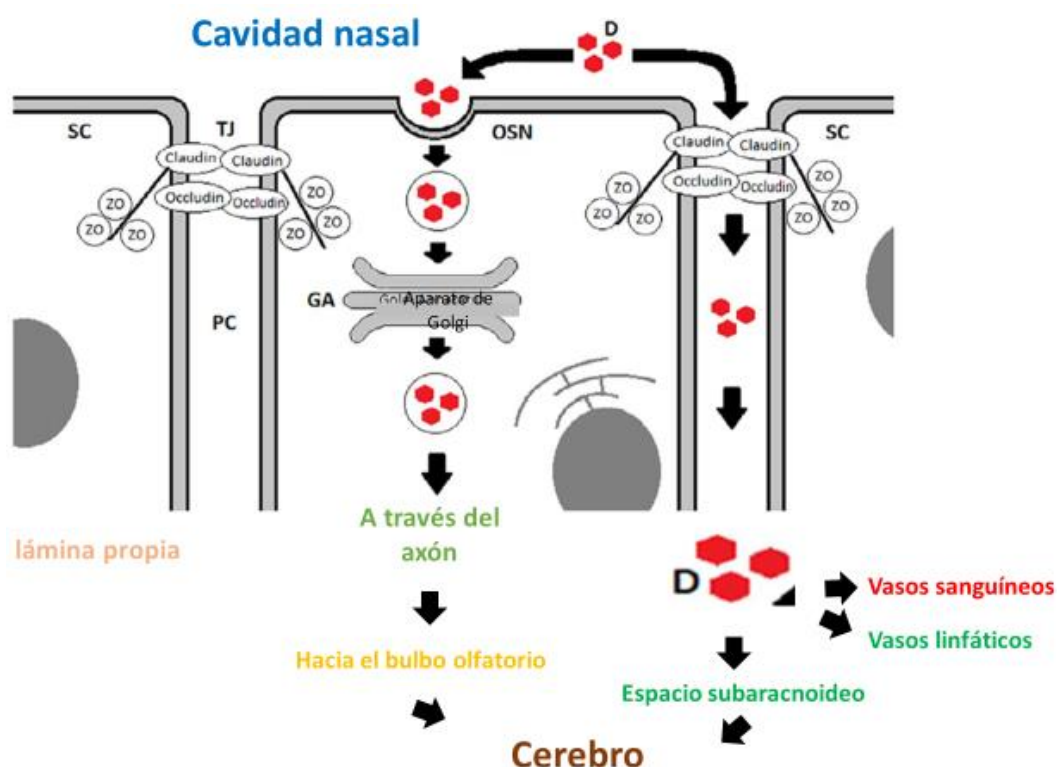
**Figura 9. Esquema de los dos procesos para el transporte de fármacos hacia el cerebro.** Izquierda, vía intracelular, el fármaco (D, hexágonos rojos), es captado por las neuronas (resaltadas en negro) que lo conducen al bulbo olfatorio (OB). A la izquierda, la vía extracelular, el fármaco atraviesa la lámina propia hasta alcanzar el espacio subaracnoideo (SAS) dónde es distribuido al cerebro. SC: células sustentaculares, OSN: neuronas sensoriales olfatorias, BC: glándula de Bowman, CP, lámina cribosa, OEC: Células envoltoras olfatorias, ONF: fibroblastos del nervio olfatorio (modificado de Crowe *et al.*, 2018).

El mecanismo intracelular se inicia con la internalización de la molécula en la neurona olfatoria, conduciéndola por medio de una vesícula en el interior de la célula a través de la proyección neuronal para finalmente liberarla por exocitosis. Una vez internalizado el fármaco en el endosoma de la neurona olfatoria, es conducido a través del axón, Parte del fármaco se dirige al aparato de Golgi y luego se dirige mediante transporte intracelular mediante vía axonal hacia el bulbo olfatorio dónde es liberado en las células postsinápticas. Este es un proceso muy lento, sin embargo, se presume que es el principal en el transporte directo de fármacos hacia el cerebro (Crowe *et al* 2018).

Por otra parte, la vía extracelular inicia cuando el fármaco cruza el epitelio nasal por medio de transporte paracelular entre las neuronas olfatorias circulando a través de las uniones estrechas (TJ), para llegar a la lámina propia. El epitelio nasal, como en todos los epitelios está estructurado por una variedad de células que están interconectadas por medio de las TJ ubicadas en los costados laterales de las paredes celulares externas. Las TJ en la cavidad nasal, son proteínas integrales unidas a la actina del citoesqueleto; pueden clasificarse como

trixelinas, ocludinas, claudinas o moléculas de adhesión. Cada una de estas proteínas se extiende dentro del espacio intercelular, restringiendo el movimiento de solutos hacia el espacio extracelular; se ha observado que el transporte de las moléculas lipofílicas no es afectado por las TJs. Una vez que el fármaco llega a la lámina propia, puede distribuirse a una variedad de zonas ya sea por los vasos sanguíneos o por los vasos linfáticos.

Para acceder al SNC, el fármaco se difunde a través del espacio perineuronal entre las células neuronales olfatorias y los fibroblastos neuronales olfatorios (ONFs). La capa de ONFs, está interconectada con las meninges, las cuáles rodean al cerebro. El líquido cefalorraquídeo atraviesa continuamente la lámina propia en la región neuronal sensorial olfatoria. Esta conexión crea una vía dónde las sustancias pueden trasladarse de un compartimiento a otro. Esta vía es la misma en los nervios trigéminos o nervios olfativos siendo esta la más rápida para acceder fármacos al SNC (**Figura 10**) (Crowe *et al* 2018).



**Figura 10. Transporte de fármacos hacia el cerebro.** 1) El proceso intracelular muestra endocitosis / pinocitosis, 2. 3) el endosoma (EN) es conducido y reconocido en el aparato de Golgi (GA), 4) finalmente es transportado al bulbo olfatorio (OB). 5) el proceso extracelular implica movimiento en el espacio paracelular (PC) 6) a través de las uniones estrechas (TJ) 7) y finalmente el arribo a la lámina propia. (SAS) dónde es distribuido al cerebro. SC: células sustentaculares, OSN: neuronas sensoriales olfatorias, OEC: Células envolventes olfatorias (modificado de Crowe *et al.*, 2018).

### 2.3.3 Consideraciones en la administración de fármacos por vía intranasal.

Uno de los mecanismos de protección de la cavidad nasal es la capa de moco nasal. Esta presenta un grosor de 3-5  $\mu\text{m}$  y se extiende 2-4  $\mu\text{m}$  de longitud (Bourganis *et al.*, 2018). Aproximadamente el 3% de este moco consiste en mucinas (glicoproteínas), mientras que el 90-95% es agua con electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  150, 41, 4, 5 y 139 mM respectivamente), proteínas séricas, acuaporinas, inmunoglobulinas, y lípidos. El moco nasal, es un gel con un comportamiento No-Newtoniano (fluido viscoelástico), posee tanto propiedades viscosas (fluido) como elásticas (sólido). Las propiedades viscosas permiten al moco transferir la energía eficientemente de los cilios, mientras que sus propiedades elásticas le permiten relajarse de manera suficiente para expeler las partículas (Merkus *et al.*, 1998).

Otro mecanismo de protección de la cavidad nasal y determinante en la liberación de fármacos es el aclaramiento mucociliar nasal (AMC). La función de este sistema es remover las sustancias ajenas y partículas de la cavidad nasal para prevenir que accedan a las vías respiratorias bajas. El tránsito normal en humanos es de 12-15 min, el promedio de la velocidad del AMC es de 8 mm/min, con intervalos que van desde 1 hasta 20 mm/min (Merkus *et al.*, 1998).

En la **Tabla II**, se presentan las ventajas y desventajas de la administración nasal de fármacos. Se ha encontrado que existe gran variabilidad y limitada absorción en áreas del epitelio nasal, lo cual puede superarse añadiendo promotores de absorción a la formulación. (Lochhead *et al.*, 2012), sin embargo, su empleo debe ser cauteloso y examinarse ampliamente debido a los posibles efectos adversos.

**Tabla II. Ventajas y desventajas de la vía intranasal para la administración de fármacos.**

Ventajas	Desventajas
Método no invasivo para la evasión de la BHE.	Limitado a fármacos con alta potencia / volumen reducido (25-200 $\mu\text{L}$ ).
Al ser un método no invasivo, se evitan procesos infecciosos.	Movimiento mucociliar activo.
Posee una área amplia de absorción sistémica.	Amplia degradación enzimática.
Rápida absorción, alta biodisponibilidad, por lo tanto, dosis bajas.	Variabilidad inter-individuo.
Administración sencilla y autoejecutable.	Poca aceptación del paciente.
Evasión del metabolismo hepático y del metabolismo del tracto gastrointestinal.	
Evasión de efectos irritativos de la mucosa gástrica.	
Reducción de sobredosis.	

#### 2.3.4 Factores que influyen en la administración nasal.

Entre los factores que afectan son:

La deposición, la cual se refiere al proceso dónde se concentra la formulación en la cavidad nasal. Se ha observado que la deposición en la zona anterior de la cavidad nasal provee tiempos prolongados de residencia, sin embargo, esta porción posee una capacidad más reducida para la absorción, además, se restringe el acceso al área olfativa. Por otro lado, la deposición en la porción posterior, donde la permeabilidad es mayor, ofrece un mejor acceso a la región olfativa, pero está asociada a tiempos cortos de residencia (Pathak 2018). Harris *et al.*, 1986 reportaron que las soluciones atomizadas se depositaron en la porción anterior de la cavidad nasal, mientras que las gotas nasales se depositaron en la parte posterior y fueron removidas rápidamente, por lo tanto, las características de la formulación están en función de mecanismo de absorción que se desee conseguir en la cavidad nasal.

La diversidad enzimática de la cavidad nasal puede afectar la estabilidad de los fármacos administrados por esta vía ya que podrían degradarse, por lo cual, debe considerarse la sensibilidad de estos a dichas degradaciones, para ello es recomendable emplear sistemas que permitan la protección de los fármacos. La fase I del metabolismo de fármacos en la cavidad nasal se lleva a cabo principalmente por el complejo multienzimático del citocromo P450, principalmente la CYP450 reductasa-NADPH dependiente; la epóxido hidrolasa, carboxilesterasa y anhidrasa carbónica son otras enzimas que participan en dicha etapa, mientras que la glucuronil y sulfotransferasa, y glutatión-s-transferasa son enzimas involucradas en la fase II (Sarkar 1992).

El pH es un factor determinante en el desarrollo de formulaciones nasales. Las razones para considerar este parámetro son: evitar daño a la membrana nasal, permitir que el fármaco se encuentre en su forma no ionizada para favorecer su absorción, evitar alteraciones para permitir invasiones bacterianas en la cavidad nasal, mantener la funcionalidad de los excipientes como agente conservador en caso de emplearse (Pathak 2018). Para ello, se ha observado que es recomendable mantener el pH de las formulaciones en un intervalo de 4.5-6.5 (Behl *et al.*, 1998). Por otra parte, todas las formulaciones hipotónicas o isotónicas son recomendables para la administración nasal (Arora *et al.*, 2002), ya que soluciones hipertónicas pueden causar contracción de las células (Ohwaki *et al.*, 1987).

Las gotas de la formulación generadas por nebulizadores se ha observado que producen tamaños de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , las cuales son capaces de llegar al pulmón, mientras que los spray pueden generar un tamaño de gota de 50  $\mu\text{m}$ , por otro lado, los polvos con tamaños de partícula menores a 10  $\mu\text{m}$  pueden depositarse en la zona respiratoria alta y llegar al pulmón, mientras partículas mayores a 50  $\mu\text{m}$  son impactadas en el tejido nasal y conducidas al tracto gastrointestinal, por lo tanto, lo ideal son partículas entre 10 y 50  $\mu\text{m}$ . Los fármacos de bajo

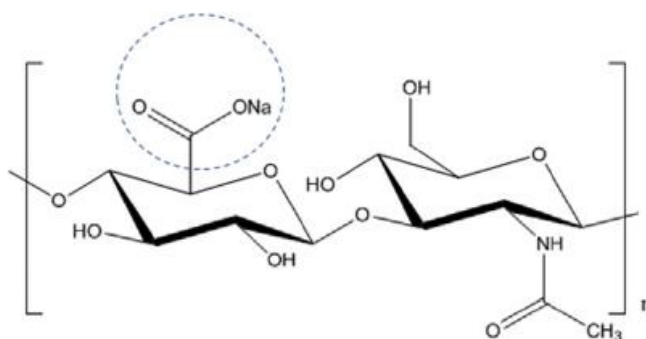


peso molecular (<400 Da), que presentan carácter lipofílico se consideran buenos candidatos para transportarse hacia el cerebro (Djupesland y Skretting, 2012).

### 2.3.5 Empleo de hialuronato de sodio en la administración nasal.

Una característica importante en el desarrollo de los sistemas de administración de fármacos por vía nasal es la viscosidad, característica que permite incrementar tiempo de residencia evadiendo el AMC, (Murgia *et al.*, 2018).

Por su biocompatibilidad y sus propiedades bioadhesivas, el hialuronato de sodio (NaH), es un biopolímero que ha sido empleado en las formulaciones para administración nasal (Horvát *et al.*, 2009, Nars *et al.*, 2016). Este biopolímero también ha mostrado ser un agente mucoadhesivo (Ludwig, 2005) lo que prolonga el tiempo de permanencia en la cavidad nasal. El ácido hialurónico está presente en la matriz extracelular de vertebrados, en el tejido conectivo, el líquido sinovial, en el humor vitreo y humor acuoso (Jiang *et al.*, 2007). Su composición química, comprende unidades repetidas de ácido D-glucoronico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glicosídicos alternados  $\beta_{1,3}$  y  $\beta_{1,4}$  (**Figura 11**) (Jiang *et al.*, 2007). Las propiedades fisicoquímicas del NaH se ven influidas por diversos factores, tales como: concentración, peso molecular, el pH, fuerza iónica y uniones covalentes y no covalentes del medio en el cual esta solubilizado (Krause *et al.*, 2001).



**Figura 11.** Estructura química del hialuronato de sodio (Khaleghi *et al.*, 2020).

## 2.4 Reposicionamiento del mebendazol para el tratamiento del GBM.

El desarrollo tradicional de nuevos fármacos es un proceso largo y costoso atribuido principalmente a la inversión requerida en las etapas preclínica y clínica (Xue et al., 2018). Bajo este contexto, se ha empleado el reposicionamiento de fármacos (RF), para aumentar el número alternativas terapéuticas sobre todo en el terreno oncológico. El RF es el método mediante el cual se reevalúa un nuevo uso terapéutico de fármacos que han sido aprobados o aquellos que, durante la etapa de investigación clínica, mostraron una respuesta farmacológica diferente a la establecida al inicio del estudio (Würth *et al.*, 2016). Esta estrategia se basa principalmente, en la idea de que una molécula, con actividad farmacológica, podría tener afinidad no sólo por un único blanco terapéutico, sino, a varios de ellos, sin embargo, este planteamiento debe considerar tanto el efecto terapéutico como posibles efectos adversos, los cuales están ligados a la dosis empleada (Medina *et al.*, 2013).

El reposicionamiento de fármacos presenta diferentes ventajas: al poseer un registro ante la autoridad sanitaria, su perfil farmacocinético como de seguridad han sido previamente documentados, además, existe una considerable información de sus propiedades fisicoquímicas, así como de las técnicas analíticas para su cuantificación e identificación. Adicionalmente, es muy factible la obtención, tanto de la materia prima como de las sustancias de referencia, indispensables para agilizar el redireccionamiento de la investigación (Kirtonia *et al.*, 2020). Sin embargo, el RF también representa riesgos, ya que debe analizarse con profundidad los nuevos hallazgos biológicos, los parámetros farmacológicos y las observaciones clínicas. Además, las condiciones patológicas de los pacientes pueden incrementar la posibilidad de efectos adversos inesperados o diferentes. De igual forma, el desarrollo de nuevas formulaciones o la exploración de nuevas vías de administración podría modificar el perfil biofarmacéutico y los nuevos regímenes de dosificación también podrían generar eventos tóxicos inesperados (Würth *et al.*, 2016).

Considerando que los tumores sólidos son el resultado de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, existe una gran variedad de blancos terapéuticos o rutas de señalización que podrían bloquearse para una respuesta terapéutica significativa en el tratamiento de tumores malignos (Dueñas *et al.*, 2008, Medina *et al.*, 2013).

El presupuesto destinado al tratamiento del GBM en muchas regiones del mundo es limitado. Los altos costos de los tratamientos, las escasas alternativas terapéuticas y la limitada capacidad de los fármacos antitumorales para atravesar la BHE, ha dado lugar a que un sector muy amplio de la población quede desprotegida, por lo que el reposicionamiento de fármacos es un enfoque importante para el tratamiento de esta enfermedad (Seliger y Hau 2018, Tan *et al.*, 2018).

En 1972, los laboratorios *Janssen Pharmaceutica* sintetizaron el compuesto benzimidazólico, mebendazol (MBZ), el cual fue posteriormente comercializado en Estados Unidos y Canadá. Desde entonces, el fármaco es

empleado para uso veterinario y humano prescrito para el tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos como: tricocéfalos, oxiuros, anquilostomas y áscaris (Guerini *et al.*, 2019).

Aun cuando no se conoce exactamente el mecanismo de acción MBZ se ha propuesto que inhibe la formación de los microtúbulos (MTs) por unión a la tubulina, bloqueando la absorción de glucosa y depletando los depósitos de glucógeno, lo que da lugar a la muerte del parásito (Rew y Fetter, 1986).

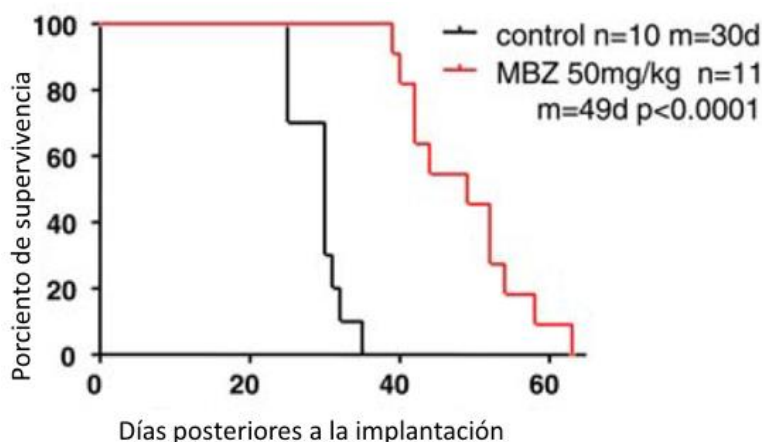
La tubulina está conformada por dos subunidades conocidas como:  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. La composición de los MTs es muy diversa en las diferentes células que componen a los tejidos en los humanos, debido a la existencia de isotipos de tubulina (6 formas de  $\alpha$ -tubulina y 7 formas de  $\beta$ -tubulina) (Jordan y Wilson, 2004). Ambas subunidades conforman un heterodímero que, al agruparse, forman el núcleo del microtúbulo. La formación de los MTs es un proceso dinámico que implica un equilibrio entre la polimerización y despolimerización. Se han identificado tres dominios proteicos donde los fármacos pueden unirse, conocidos como: el *dominio de vincristina*, el de *colchicina* y el de *paclitaxel*. Los fármacos que se unen a los dos primeros dominios favorecen una despolimerización de los MTs, ejemplo de ellos son los alcaloides de la vinca y la colchicina, mientras que la unión al último dominio favorece una estabilización anormal del MT, sin embargo, se ha demostrado que los fármacos a concentraciones nano-molares pueden tener un efecto indistinto y, por lo tanto, es viable asignarlos como inhibidores de MTs únicamente (Staton *et al.*, 2011). El mebendazol pertenece a la primera clasificación, inhibe la polimerización de los MTs por la unión a la subunidad  $\beta$ -tubulina en el dominio “colchicina” (Laclette *et al.*, 1980). Los microtúbulos han sido un blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer, de hecho, varios fármacos anticancerosos aprobados, tienen como blanco terapéutico este organelo, tal es el caso del paclitaxel (taxol®) o la vincristina.

En el 2002, Mukopardy *et al.*, demostraron la actividad apoptótica del MBZ, sobre diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón. El estudio mostró una alta potencia ( $CI_{50}$  de  $\approx 0.16 \mu M$ ) en la inhibición del crecimiento de las células A549 y H460, además no se observó efecto tóxico a  $1.0 \mu M$  para los controles (WI38 y HUVEC). Posteriormente, en el mismo estudio, los autores confirmaron el efecto inhibitorio del crecimiento celular del MBZ en líneas cancerosas de mama, ovario, colon y osteosarcoma, determinado una  $CI_{50}$  comprendida en un intervalo de  $0.01$  a  $0.8 \mu M$ . El estudio *in vivo* mostró una reducción en el tamaño del tumor con respecto al control. Se sabe que éste es el primer antecedente que expone el reposicionamiento del MBZ con actividad anticancerosa. De manera particular fue muy relevante la alta potencia observada en todas las evaluaciones y el reducido efecto tóxico. Esos estudios aportaron evidencia del mecanismo de acción de la actividad antineoplásica del MBZ, entre ellos se pueden mencionar los siguientes: despolimerización de la tubulina (Bai *et al.*, 2011, Sasaki *et al.*, 2002, De Witt *et al.*, 2017), la inhibición de la angiogénesis (Bai *et al.*, 2015), inhibición de las rutas de señalización vinculadas en la progresión de cáncer, tal como, la vía hedgehog (Larsen



et al., 2015), sensibilización a la quimio y radioterapia (Markowitz et al., 2017), la inducción de apoptosis (Doudican *et al.*, 2008), inhibición de cinasas (Nygren *et al.*, 2013), y también se observó la inducción a la respuesta inmunitaria antitumoral (Blom *et al.*, 2017, Rubin *et al.*, 2018).

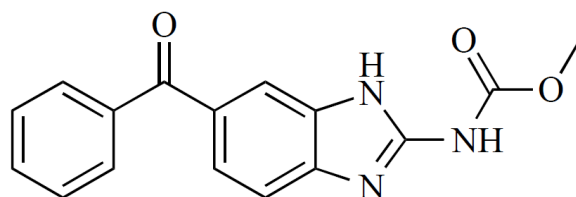
La actividad del MBZ en el GBM fue descubierta por serendipia en el 2011 por Bai *et al.* Inicialmente, observaron la eficacia del flubendazol en un modelo de tumor cerebral al ser utilizado para combatir una infestación parasitaria. Este hallazgo dio origen a la evaluación de la actividad de una gama de compuestos bencimidazolicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando que el MBZ proporcionó los resultados más prometedores. La  $CI_{50}$  en las líneas GL261 (glioblastoma de ratón) y 060919 (glioblastoma humano) fue de 0.24  $\mu\text{M}$  y 0.1  $\mu\text{M}$  respectivamente. El estudio *in vitro* reveló que el MBZ generó una disrupción de los MTs; el dato fue corroborado por la reducción de la polimerización de la tubulina. Posteriormente, se evaluó la media de la supervivencia en el modelo murino ortotópico de glioma al ser administrado por vía oral, encontrando un incremento con respecto al control de 49 días (**Figura 12**).



**Figura 12.** Estudio de supervivencia de MBZ en el modelo murino ortotópico de glioma reportado por Bai *et al.*, 2011. El MBZ incrementó la media de supervivencia con respecto al control en el modelo después de administrarse por vía oral una dosis de 50 mg/kg 5 días antes de la implantación, posteriormente, 20 días continuamente después de la implantación y 5 días más.

#### 2.4.1 Mebendazol (MBZ).

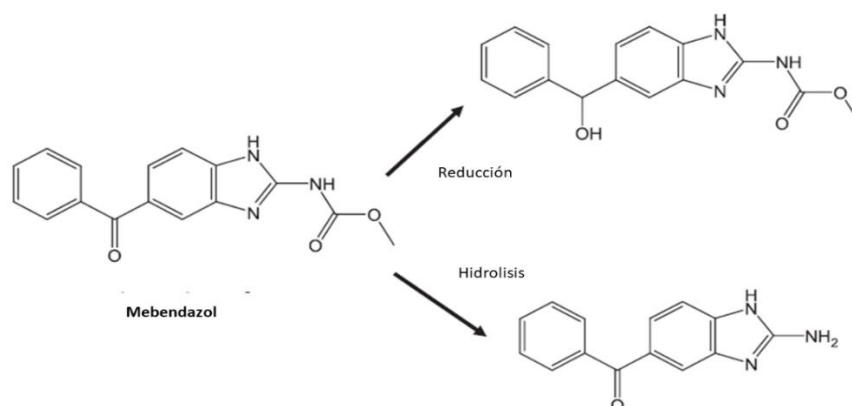
La estructura química del MBZ se presenta en la **Figura 13**. El núcleo o anillo benzimidazólico se considera una estructura química privilegiada, debido a su alta capacidad para interactuar con los sistemas biológicos mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y de ion-dipolo, además de interacciones de coordinación  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$  y de catión- $\pi$  (Torres *et al.*, 2015).



**Figura 13. Estructura química del mebendazol,** (5-Benzoyl-1H-benzimidazol-2-ylcarbamato de metilo) y su origen del núcleo benzimidazólico, su masa molecular es de 295.29 g/mol.

El MBZ es apropiadamente lipofílico (log P de 2.89) y presenta una baja solubilidad acuosa (71.3 µg/mL) (Poturcu y Demiralay 2019), por ello está clasificado como fármaco tipo II conforme al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (baja solubilidad, alta permeabilidad). Debido a la protonación del grupo -NH y N= de anillo benzimidazólico (altamente ácido y débilmente básico), presenta dos valores de pKa: 3.27 y 9.56 (Shalaeva *et al.*, 2008, Tahlan *et al.*, 2019). Presenta una baja biodisponibilidad (<10%) con una alta variabilidad inter e intra paciente (Pantziarka *et al.*, 2014). Su vida media es de 2.5 a 5.5 h en pacientes con función hepática normal (Poturcu y Demiralay 2019). Su biodisponibilidad se ve ligeramente incrementada, al administrarlo conjuntamente con una dieta alta en grasas (Pantziarka *et al.*, 2014). El MBZ se une a proteínas plasmáticas en un 95% (Poturcu y Demiralay 2019). Se ha reportado también que no tiene afinidad por la Pg-P (Dupuy *et al.*, 2010), sin embargo, Bai *et al.*, 2015 reportó que al administrar juntamente con elacridar, molécula que presenta unión específica a Pg-P, los niveles del fármaco en LCR aumentaron significativamente. El MBZ, también presenta un extenso metabolismo hepático; en humanos se han encontrado dos principales metabolitos generados por la reducción del grupo ceto al grupo hidroxilo y por la decarbamilación del grupo imidazólico (**Figura 14**) (Dayan, 2003), la cual se lleva a cabo en los microsomas y en el citosol respectivamente (Nishumuta *et al.*, 2013).

Los niveles de mebendazol se incrementan al administrarlo juntamente con cimetidina, un inhibidor de diferentes enzimas del citocromo P450 (Pantziarka *et al.*, 2014).



**Figura 14. Principales metabolitos de MBZ** (tomado de Nishumuta *et al.*, 2013).

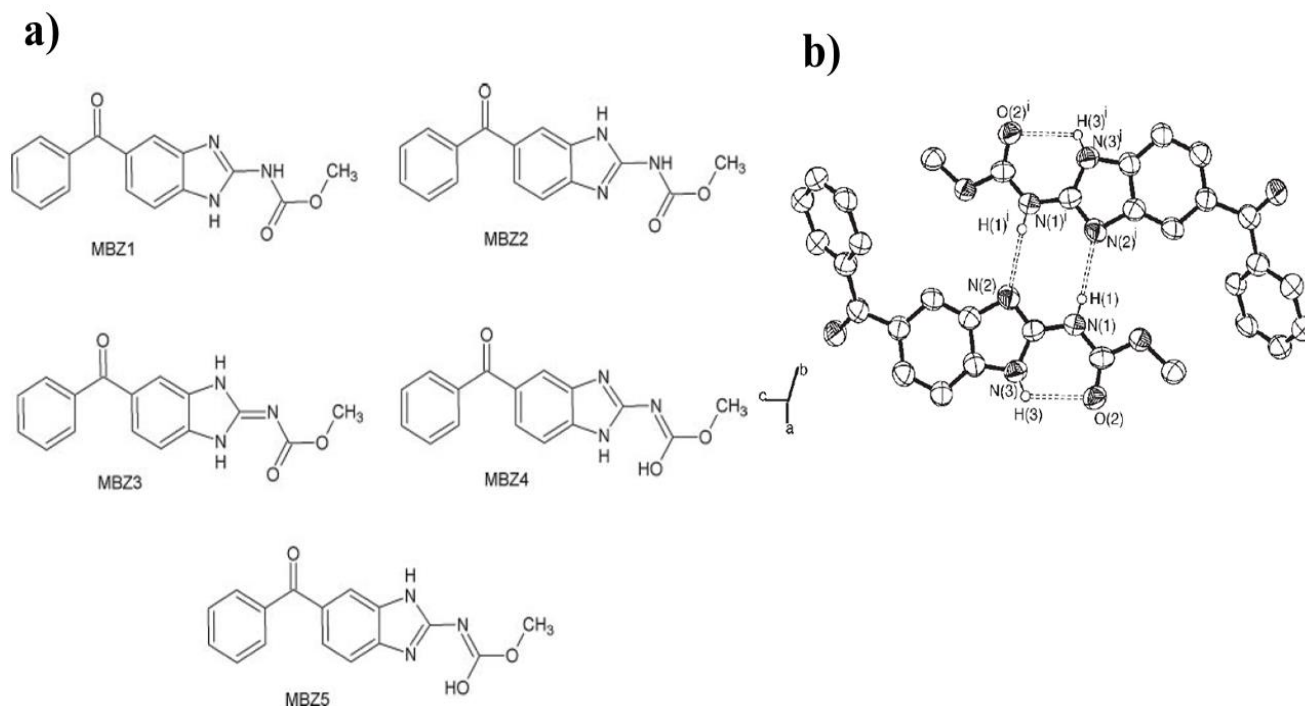
#### 2.4.2 Importancia de la cristalinidad del MBZ.

La existencia de tres formas polimórficas de MBZ, conocidas como polimorfos A, B y C, ha sido ampliamente reportada. Existen diferencias tanto en la estabilidad termodinámica como la solubilidad de estos arreglos cristalinos, así el orden de la estabilidad de mayor a menor es: polimorfo A > polimorfo C > polimorfo B. (Himmelreich *et al.*, 1977), mientras que la solubilidad acuosa reportada para la formas A, B y C es de  $9.84 \pm 0.05$ ,  $71.3 \pm 0.5$  y  $35.4 \pm 0.5$  mg l<sup>-1</sup> respectivamente y la solubilidad reportada en HCl 0.1 M es de:  $20 \pm 5$ ;  $70 \pm 4$  y  $40 \pm 3$  mg l<sup>-1</sup> en el mismo orden (Calvo *et al.*, 2016). Estas diferencias de solubilidad mostraron respuestas terapéuticas diferentes entre los tres polimorfos en un modelo *in vivo* de GBM (Bai *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la materia prima de MBZ, contiene una mezcla de los tres polimorfos en las que pocas veces se conoce su proporción. Además, durante el proceso de compresión, el polimorfo C puede convertirse al polimorfo A (Calvo *et al.*, 2016), que es la forma cristalina más estable y menos soluble lo cual puede dar diferencias en la respuesta terapéutica.

Las diferentes formas tautoméricas del MBZ (**Figura 15a**), son decisivas para la variedad conformacional cristalina de la molécula atribuido a los enlaces de hidrogeno que se presentan, específicamente en las formas amino-imina (Agatonovic *et al.*, 2008) Se ha observado que en la forma MBZ1 predomina el polimorfo C (Martins *et al.*, 2009). En la **Figura 15b**, se muestra algunas interacciones inter e intra-moleculares que se presentan en el empacamiento de la molécula. Se pueden observar fuertes interacciones de tipo *puentes de hidrógeno* para formar un dímero entre los átomos N(1)-H(1)...N(2) en donde el átomo de nitrógeno de la fracción del carbamato se comporta como donador mientras que el nitrógeno de la imina del grupo benzimidazol se comporta como un grupo aceptor. En el mismo plano se puede observar también que los dímeros se unen a cada uno mediante enlaces de hidrogeno no clásicos con una energía menor entre los átomos C(6)-H(6)...O(2). Además, los átomos N(3)-H(3)...O(2) presentan interacciones intramoleculares moderadas. De este modo, se

puede explicar las diferentes conformaciones que generan la morfología cristalina de MBZ (Martins *et al.*, 2009).



**Figura 15. Factores que determinan la cristalinidad del MBZ a)** diversas formas tautomericas y **b)** proyecciones en el plano 1,2,3 de dímeros de MBZ dónde se presenta la interacción inter e intramolecular de los átomos que conforman a la molécula, imagen obtenida mediante el software ORTEP (tomado de Martins *et al.*, 2009).

## 2.5 Desarrollo de microemulsiones para incrementar la solubilidad del MBZ.

Se han reportado diferentes estrategias para incrementar la solubilidad del MBZ. Entre ellas, el desarrollo de complejos de inclusión (Saidman *et al.*, 2019), la elaboración de micropartículas redispersables de hidroxipropilcelulosa (de la Torre *et al.*, 2014), modificaciones de su cristalinidad (Chen *et al.*, 2012) y de su estructura química (Gutierrez *et al.*, 2018, de Paula *et al.*, 2013, García *et al.*, 2011), desarrollo de nanopartículas (Graves *et al.*, 2015), elaboración de sistemas auto-emulsificables por spray-dry (Rameshlal *et al.*, 2016) y sistemas auto nanoemulsificables (Rao *et al.*, 2018).

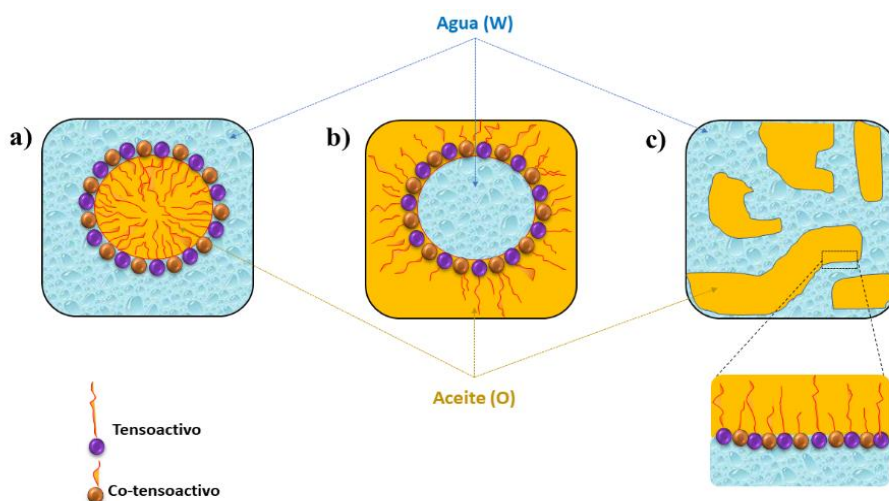
Los sistemas de liberación de fármacos a base de lípidos (LBDDS por sus siglas en inglés) continúan mostrando interés en su empleo, motivado por el hecho de que entre el 40 - 70% de los fármacos en etapa de desarrollo poseen una baja solubilidad acuosa y una limitada absorción, lo cual reduce su biodisponibilidad. (Rane y Anderson, 2008). En ocasiones, las formulaciones convencionales, como las tabletas y polvos encapsulados, no son suficientes para resolver dichas complicaciones. Los LBDDS han demostrado su capacidad de incrementar la biodisponibilidad de los fármacos hidrofóbicos debido a que pueden permanecer disueltos hasta su absorción

(Savla *et al.*, 2017). Aproximadamente el 6% de los medicamentos aprobados hasta el 2013, se formularon empleando esta tecnología; y para el 2017, la FDA, había aprobado 37 sistemas LBDDS para moléculas altamente específicas marcando así una tendencia en su uso y desarrollo (Savla *et al.*, 2017). Estos sistemas comprenden una gama amplia de formulaciones que contienen, ya sea en suspensión o solubilizando el fármaco en la fase lipídica. Entre los diferentes LBDDS se encuentran: los liposomas, los sistemas lipídicos nanoparticulados y las microemulsiones.

En 1981 Danielsson y Lindman dieron por primera vez la definición de microemulsión, la cual es frecuentemente usada como punto de referencia. Las microemulsiones se definen como un sistema de agua, aceite y por lo menos un compuesto anfifílico que se presenta como una solución líquida simple, transparente y termodinámicamente estable.

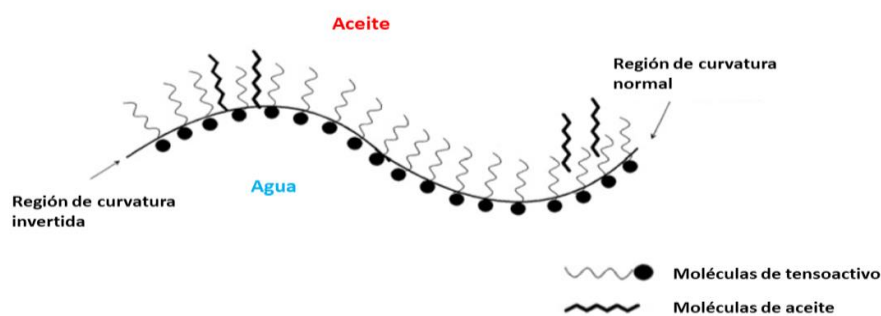
### 2.5.1 Tipos y clasificación de las microemulsiones.

En la **Figura 16**, se presenta el esquema de las tres estructuras más comunes que se forman en una microemulsión. Las microemulsiones se pueden clasificar en tres tipos: (O/W), (W/O) y bicontinuas (Callender *et al.*, 2017). Cualitativamente, se puede asumir que las gotas o glóbulos de la microemulsión corresponden a la fase de menor proporción, sin embargo, debe considerarse que a pesar de que esta tendencia sea la más común, no es exclusiva su ocurrencia, de ahí que la caracterización fisicoquímica de estos sistemas debe ser lo más extensa posible (Lawrence y Rees, 2012).



**Figura 16. Estructuras más comunes que adoptan las microemulsiones.** En el sistema a) O/W, b) W/O y c) bicontinuas (Modificado de Lawrence y Rees, 2012).

En cada una de ellas, existe una interfase constituida por una monocapa de tensoactivo que separa los dominios lipofílico e hidrofílico. Los sistemas W/O y O/W se estructuran como gotitas esféricas que adoptan más bien una forma elipsoide. La extensión de la capa interfacial está determinada por la interacción que se presenta entre la fase oleosa, y las cadenas hidrofóbicas de los tensoactivos (**Figura 17**). La cadena hidrocarbonada de los lípidos se inserta en la región de las cadenas hidrofóbicas de los tensoactivos, esta interacción genera una curvatura de la capa interfacial que determina la extensión de la región de isotrópica o de microemulsión (Lawrence y Rees, 2012).

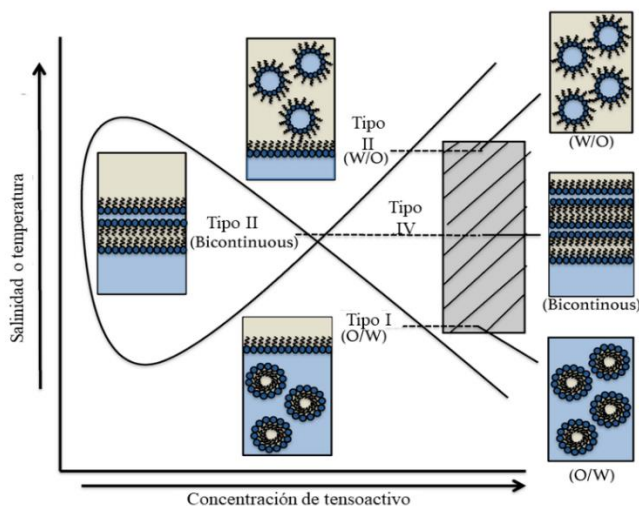


**Figura 17. Curvatura de la microemulsión.** Inserción de las moléculas de lípidos entre las cadenas hidrofóbicas en la monocapa interfacial del tensoactivo en la microemulsión. Se puede observar que, cuando hay una mayor penetración del aceite, la curvatura se amplía hacia el agua, (Curvatura invertida) (modificado de Lawrence y Rees, 2012).

Afuera de la región de microemulsión, específicamente cercana a esta, las proporciones de los componentes, tanto tensoactivos, agua y aceites son insuficientes para formar una sola fase (microemulsión), en este caso, lo que se forma son varios equilibrios de fases, cuya complejidad está en función del número y composición química de los excipientes involucrados, por lo tanto, las microemulsiones coexisten en equilibrio con fases compuestas por excesos tanto de agua como de aceite en donde los tensoactivos se encuentran dispersados en ambos componentes. De acuerdo con Winsor, estas fases pueden coexistir en cuatro equilibrios: Tipo I, bifásicas, dónde hay un exceso de aceite y poca presencia de O/W, Tipo II, bifásicas, dónde hay un exceso de W/O y poca cantidad de agua, Tipo III, trifásicas, dónde hay un exceso de aceite y agua y una proporción media de microemulsión y Tipo IV, monofásico, una sola fase de microemulsión, todas en equilibrio (Winsor, 1948, Solans y García 1997), siendo este último tipo de microemulsión el más explorado en los sistemas de liberación de fármacos (Lawrence y Rees, 2012).

En la **Figura 18**, se muestra un diagrama típico de los diferentes equilibrios de fases y sus cambios en función de la temperatura / salinidad y concentración del tensoactivo. Los cambios sutiles en la temperatura y la salinidad son dos variables que impactan considerablemente la transición de fases desde el Tipo I→II→III para

los tensoactivos no-iónicos y tensoactivos iónicos respectivamente. Mientras que un incremento en la concentración de los tensoactivos induce una transición desde cualquier tipo de fase a un Tipo IV con las restricciones de temperatura y salinidad.

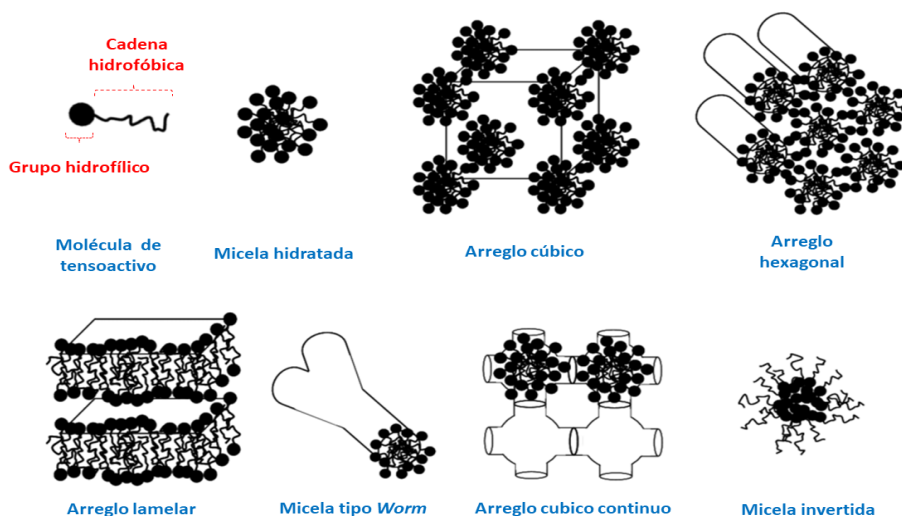


**Figura 18. Efecto de la temperatura, la salinidad y la concentración de tensoactivo en los diferentes equilibrios de las microemulsiones** (Modificado de Callender *et al.*, 2017).

### 2.5.2 Los tensoactivos en microemulsiones.

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas que se incorporan a las mezclas aceite-agua para reducir la tensión interfacial y estabilizar el sistema mediante la generación de una doble capa que solvata las partículas dispersadas y, por lo tanto, el ángulo de contacto entre las dos fases. En las dispersiones acuosas, pueden adoptar una variedad de estructuras de auto-asociación, que están determinadas por fuerzas inter e intramoleculares. Cuando los tensoactivos se incorporan a mezclas inmiscibles de aceite y agua, se posicionan en la interfase (O-W), la cual está favorecida termodinámicamente (Lawrence y Rees, 2012). A partir de ese estado, se pueden generar una gran variedad de fases microscópicas. En la **Figura 19**, se muestra un esquema de las diferentes estructuras de auto-asociación que conforman los tensoactivos en presencia de agua, aceite o mezclas de ellos y que están involucradas en las estructuras que se forman en una microemulsión.





**Figura 19. Diversas estructuras de autoasociación de los tensoactivos.** Se forman cuando están en contacto con fases acuosas o lipídicas o combinación de ellas.

Los tensoactivos empleados para formular microemulsiones pueden clasificarse conforme a la carga que aportan al medio, en i) no iónicos, ii) anfótericos, y iii) catiónicos o aniónicos. Los glóbulos de las MEs tipo O/W generalmente poseen mayor volumen de interacción a diferencia de las MEs tipo W/O.

Los tensoactivos tipo iónicos su mecanismo de estabilización es debido a la formación de una doble capa eléctrica en la superficie generándose un importante efecto repulsivo. Para las MEs tipo O/W estabilizadas por tensoactivos no iónicos, aunque existe un área de hidratación asociada a los grupos polares, el factor de repulsión predominante es por efectos estéricos. Como ejemplo de tensoactivos no iónicos empleados en la formulación de microemulsiones nasales se puede citar: la serie de los Tween, la serie de los Spam, Cremophor El, Cremophor RH 40, Transcutol, o Solutol HS15 (Shadab *et al.*, 2018).

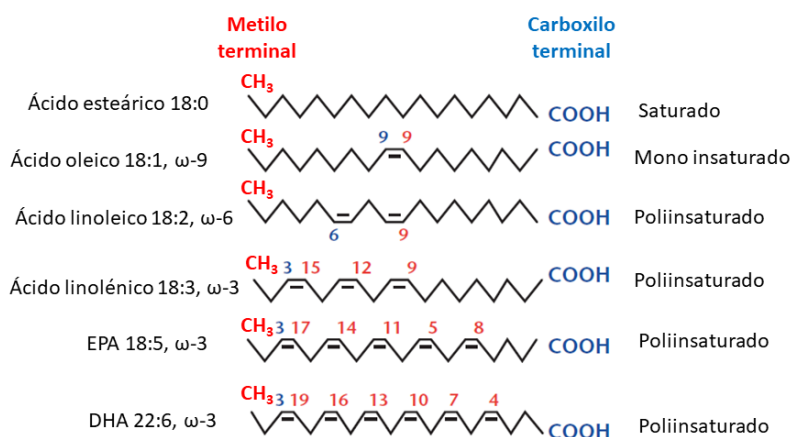
El valor HLB se emplea como guía para el desarrollo de las MEs. Este valor toma en cuenta la contribución tanto hidrofílica como lipofílica de los fragmentos de la molécula. Se acepta que valores bajos de HLB (3-6) promueven la formación de microemulsiones W/O, mientras que tensoactivos con un valor de HLB alto (8-18) tienden a la formación de microemulsiones tipo O/W (Lawrence y Rees, 2012).

Generalmente, el desarrollo de microemulsiones es acompañada por el empleo de co-tensoactivos, los cuales son compuestos anfifílicos; comparado con el tensoactivo, presentan un grupo polar reducido y un tamaño pequeño de cadena carbonada (Salager *et al.*, 2005). Los alcoholes de cadena corta, tales como el etanol o el propilenglicol, son cosolventes y también se emplean comúnmente como co-tensoactivos. El etanol ha sido ampliamente usado para la elaboración de microemulsiones, por su capacidad de incrementar la región de ME atribuida a i) la inserción en la capa interfacial dándole una fluidez a esta, y ii) su capacidad para disolver la formación de estructuras tipo cristales líquidos (Klossek *et al.*, 2013, Salager 1988).



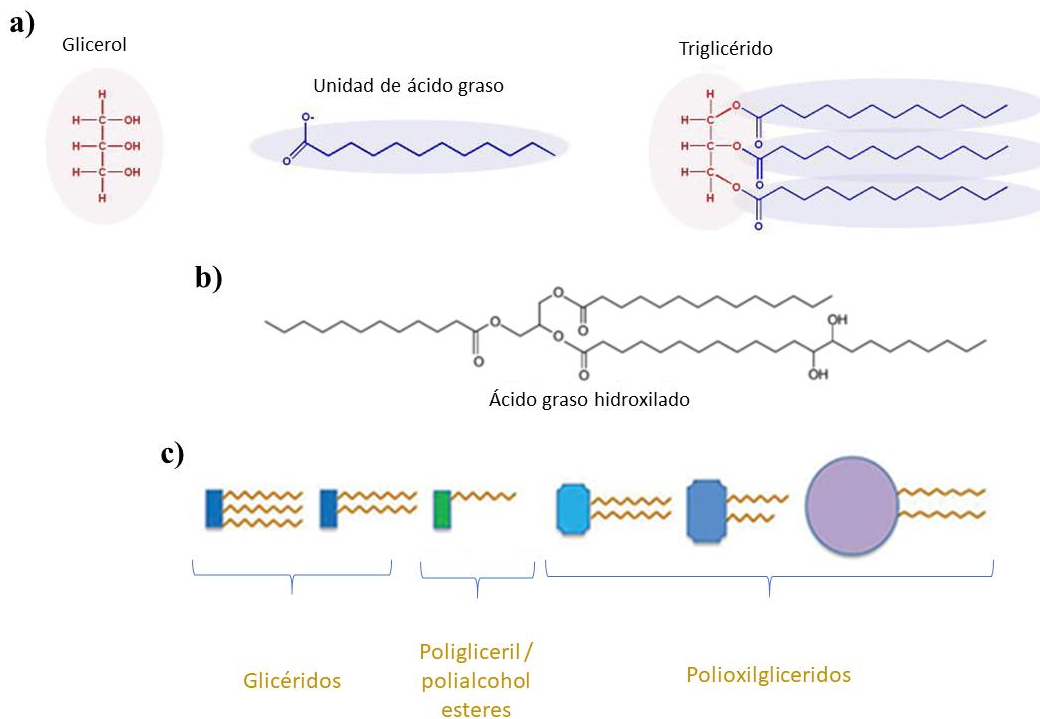
### 2.5.3 Fase lipídica en microemulsiones.

Los ácidos grasos son un subgrupo de lípidos que se emplean frecuentemente para la formulación de microemulsiones. Están constituidos por una cadena carbonada con un grupo metilo al final (asignado como omega,  $\omega$ ), mientras que en el otro extremo poseen un grupo carboxilo. Se clasifican como ácidos grasos saturados, donde toda la cadena carbonada esta hidrogenada o ácidos grasos insaturados, en los que cadena carbonada posee por lo menos un doble enlace entre cada carbono en cualquier posición de la cadena carbonada. Los dobles enlaces le confieren restricciones en la movilidad a la molécula justo en esta posición. El ácido oleico, posee 18 átomos de carbono y un doble enlace en la posición 9 de la cadena carbonada ( $\omega$ -9), mientras que el ácido docosahexaenoico (DHA), contiene 22 átomos de carbono, con 6 dobles enlaces en la cadena carbonada ( $\omega$ -3) (**Figura 20**), ambos compuestos han mostrado una capacidad para incrementar la permeabilidad de fármacos en la mucosa nasal cuando fueron formulados en MEs (Shinde *et al.*, 2016, Patel *et al.*, 2016).



**Figura 20. Estructura química de los ácidos grasos.** Se muestran los dos empleados en el presente trabajo, ácido oleico y DHA. EPA: ácido eicosapentaenoico (Modificado de Rustan y Drevon, 2005).

Por otra parte, los esterés de ácidos grasos, los cuales son cadenas hidrocarbonadas unidas a grupos hidrofílicos tales como, glicerol, poliglicerol o polialcoholes (**Figura 21a**) también se han empleado para el desarrollo de MEs. Por las características de la longitud de la cadena del ácido graso o modificaciones realizadas a la estructura, comercialmente existen en la actualidad una gran variedad de compuestos para mejorar sus propiedades iniciales (**Figura 21b**) tales cómo, puntos de fusión, capacidad de solubilización, su estabilidad térmica y química o miscibilidad (**Figura 21c**) (Lepree, 2017).



**Figura 21. Estructura de los triglicéridos empleados en la formulación de microemulsiones.**  
a) origen de los triglicéridos, b) estructura de un excipiente con diversas modificaciones a su estructura de origen y c) esquema de los diferentes tipos de excipientes de origen triglicérido.

En el mercado, existen una gran diversidad de compuestos modificados que suelen emplearse como fase lipídica, cómo es el caso de los triglicéridos de cadena media (mono, di y triglicéridos) derivados del aceite de coco, que han mostrado características importantes en el diseño de microemulsiones, tales como, una estabilidad química a diferentes temperaturas, calidad de grado farmacéutico y perfil de seguridad, características que han permitido su aprobación por la FDA. Entre ellos se encuentran: Labrafac® CM (C<sub>8</sub> / C<sub>10</sub> mono- / gliceridos poliglicolizados del aceite de coco), Labrafil® M 1944 (ácido oleico / gliceridos poliglicolizados del aceite de maíz), Labrafil® M 2125 (ácido linoléico / gliceridos poliglicolizados del aceite de maíz) o Labrasol® (C<sub>8</sub> / C<sub>10</sub> mono- / gliceridos poliglicolizados del aceite de coco) (Constantindes, 1995).

#### 2.5.4 Estabilidad termodinámica de las microemulsiones.

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la estabilidad termodinámica de las microemulsiones, siendo una de las más aceptadas la que establece que la energía libre es dependiente de la disminución en la tensión interfacial entre la zona de agua-aceite y del cambio de la entropía del sistema, de tal manera que:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

Dónde  $\Delta G_f$  es la energía libre de formación,  $\gamma$  es la tensión interfacial de la interfaz aceite-agua,  $\Delta A$  es el cambio en el área interfacial del proceso de emulsificación,  $\Delta S$  es el cambio de la entropía del sistema asociada al proceso de dispersión y  $T$  es la temperatura.

La hipótesis plantea que cuando la microemulsión se crea, el gran número de las pequeñas gotas formadas hace que el cambio en el área interfacial ( $\Delta A$ ) sea muy grande. El valor de  $\gamma$  es positivo durante todo el proceso, sin embargo, es un valor muy pequeño y es superado por el efecto de la entropía, en orden de magnitudes de mN/m. Por lo tanto, la contribución entrópica es un componente determinante, el cual está atribuido al cambio que se produce cuando las pequeñas gotitas se dispersan sobre una de las fases, además, existen otros procesos dinámicos que favorecen a la entropía, tales como la difusión de los tensoactivos en la capa interfacial y el intercambio dinámico de los tensoactivos durante el equilibrio micela-monómero. Por lo tanto, un valor negativo de la energía libre ocurre cuando una importante reducción de la tensión interfacial es acompañada por un cambio significativo de la entropía, en tal caso, la formación de la microemulsión es un proceso espontáneo y el resultado es una dispersión termodinámicamente estable (Lawrence y Rees, 2012).

Las microemulsiones tipo W/O entrópicamente son más favorecidas, ya que las cadenas hidrofóbicas que se extienden en la fase oleosa y se exponen hacia afuera de la gota, presentan una mayor libertad direccional. Por lo tanto, su preparación suele ser más sencilla. Debe considerarse que, si bien las MEs son termodinámicamente estables, podrían presentarse barreras cinéticas durante su preparación, las agitaciones mecánicas o procesos de calentamiento pueden vencer dichas barreras energéticas y su uso suele ser común en el desarrollo de MEs (Lawrence y Rees, 2012).

#### 2.5.5 Métodos de preparación.

Los métodos de preparación de microemulsiones se consideran como métodos de baja inversión de energía. Se basan principalmente por la formación espontánea, la cual, está fundamentada en procesos fisicoquímicos. Entre estos métodos se pueden citar: emulsificación espontánea (SE), inversión de fases por temperatura (PIT) e inversión de fases por composición (PIC).

El método SE se basa en la formación espontánea de la microemulsión cuando dos líquidos (las fases acuosas y oleosa) se combinan a una temperatura determinada (**Figura 22**). Las gotitas se forman espontáneamente por el movimiento de las sustancias dispersables en el agua desde la fase oleosa, generando una turbulencia interfacial, el sistema tiene a las condiciones más favorables para establecer un equilibrio y adopta las formas geométricas más favorecidas energéticamente. El método puede variar en diversas etapas, tales como,

composición de las fases (mezcla de tensoactivos, mezcla de aceites), condiciones ambientales (temperatura, fuerza iónica, pH) y las condiciones durante mezclado (velocidad de agitación, velocidad y orden de adición de los componentes) (McClements, 2011).

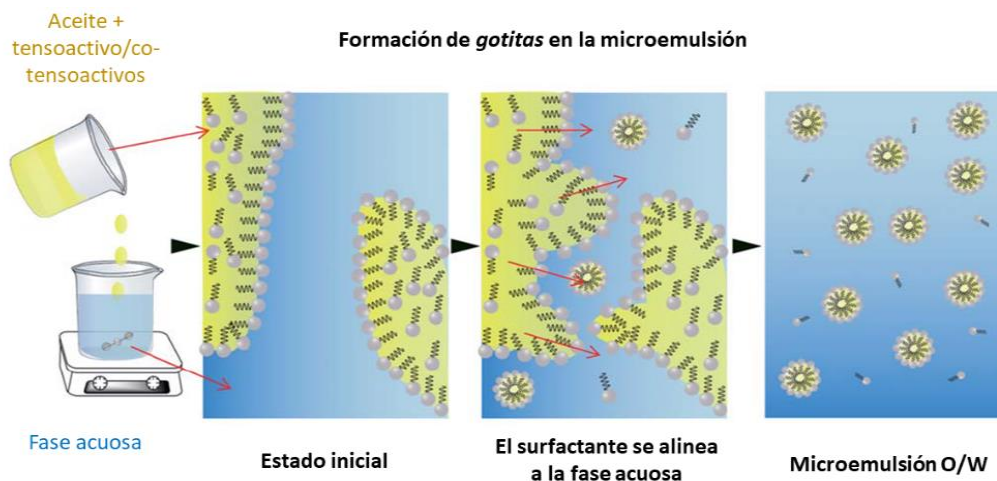


Figura 22. Esquema que propone las etapas que ocurren durante la elaboración de las microemulsiones mediante el método SE (modificado de McClements, 2011).

Por otra parte, el método PIT (**Figura 23**) se basa en los cambios que ocurren para obtener una curvatura óptima o una solubilidad efectiva de los tensoactivos, particularmente, no-iónicos cuando el sistema es sometido a modificaciones de la temperatura (McClements, 2011)

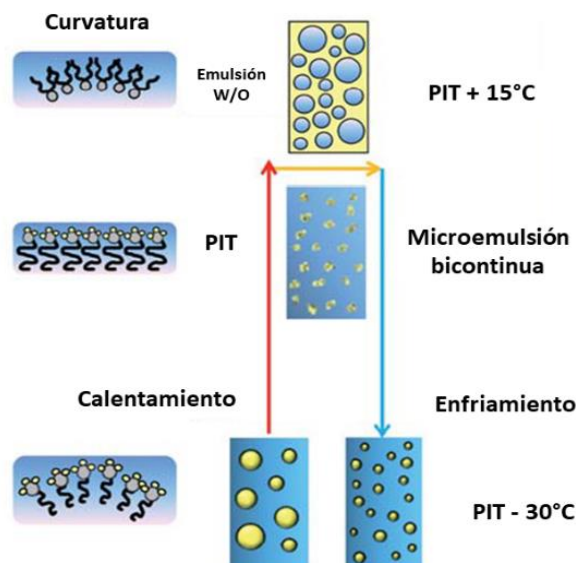
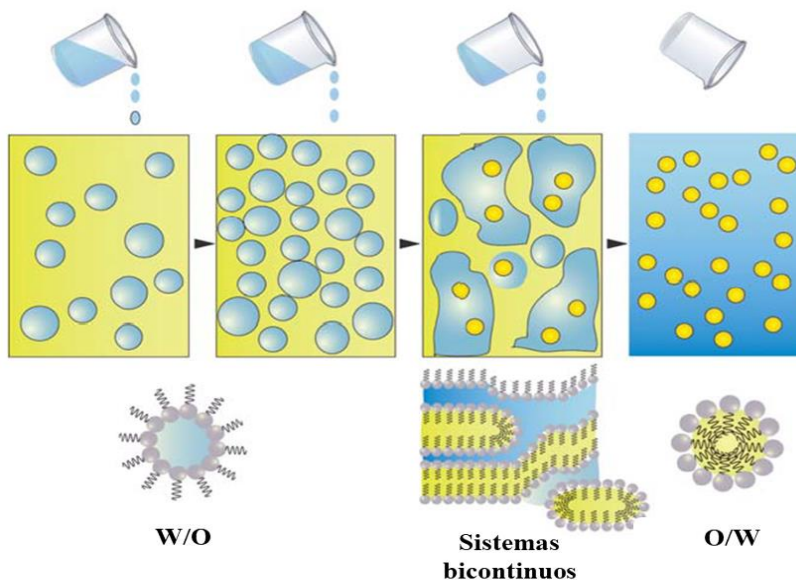


Figura 23. Diagrama que muestra la formación de una microemulsión mediante el método PIT (modificado de McClements, 2011).

En este caso del método PIC, una emulsión de tipo W/O, se va añadiendo agua al sistema con agitación constante, existe un punto crítico dónde el sistema puede contener el agua, el sistema tiende a equilibrar los

cambios en la composición y se van formando pequeñas gotitas, entonces, el sistema presenta un punto de inversión de fases dónde hay un cambio de W/O a O/W. El tamaño de las gotitas formadas depende de la velocidad de agitación y la cantidad de agua agregada (**Figura 24**) (McClements, 2011).



**Figura 24.** Esquema que muestra la elaboración de microemulsiones mediante el método PIC. La cantidad de agua añadida a la emulsión inicial se incrementa progresivamente, hasta que ocurre una inversión de fases, generando la formación de una microemulsión tipo O/W (modificado de McClements, 2011).

### 2.5.6 Microemulsiones para la administración nasal de fármacos.

En la tabla III se presentan ejemplos de fármacos desarrollados en presentación microemulsión para administración nasal, lo que demuestra que es una estrategia atractiva para acceder fármacos al SNC.

**Tabla III.** Potencial de las microemulsiones para favorecer el acceso de fármacos al cerebro por AIN.

No	Fármaco formulado	Contribución al efecto terapéutico	Referencia
1	Mesilato de saquinavir	Mejorar la biodisponibilidad del fármaco en el tratamiento del VIH.	Hosny <i>et al.</i> , 2014.
2	Nimodipino	Incrementar la liberación del fármaco en el SNC.	Pathak <i>et al.</i> , 2014.
3	Buspirona	Incrementar los niveles del fármaco en el cerebro.	Larsen <i>et al.</i> , 2015.
4	Sulfóxido de albendazol	Mejorar el control sobre la neurocisticercosis	Shinde <i>et al.</i> , 2015.
5	Tacrina	Incremento de la memoria en un modelo animal de amnesia inducida por escopolamina.	Jogani <i>et al.</i> , 2018.
6	Terifluromida	Manejo del glioma.	Gadhava <i>et al.</i> , 2019.

## III JUSTIFICACIÓN

El glioblastoma es un tipo de tumor cerebral de crecimiento rápido siendo el más frecuente y agresivo del sistema nervioso central. El tratamiento común consiste en radioterapia concomitante con quimioterapia, dando una esperanza de vida de tan solo 14.6 meses. A la fecha, el número de fármacos utilizados para este tratamiento es limitado, particularmente por la dificultad que presentan los fármacos de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que es importante desarrollar nuevas alternativas terapéuticas basadas en vías alternas y nuevas formas de dosificación.

El fármaco antihelmíntico, mebendazol, ha demostrado su eficacia anticancerosa tanto en modelos de glioblastoma *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, su baja solubilidad acuosa compromete su absorción y, por ende, el efecto terapéutico. Es por ello, que se requiere desarrollar formulaciones novedosas y explorar vías de administración eficientes que permitan el acceso del fármaco al líquido cefalorraquídeo para su uso en el tratamiento del glioblastoma capaces de contribuir en el control y manejo de esta enfermedad.

## *IV HIPÓTESIS*

El desarrollo de microemulsiones conteniendo mebendazol, empleando mezclas de ácido oleico con ácido docosaheptaenoico o ácido oleico con Labrafil M 2125 como fase lipídica con hialuronato de sodio como agente mucoadhesivo, favorecerá su administración por vía nasal y podría ser eficaz en el tratamiento de glioblastoma.

## V OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, caracterizar y evaluar un nuevo sistema en forma de microemulsión para la liberación nasal de mebendazol.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y validar el método analítico por cromatográfica de líquidos de alta resolución, para la cuantificación del MBZ en los estudios de solubilidad y determinación del contenido en la microemulsión.
- Elaborar diagramas de fases pseudo-ternarios para seleccionar los componentes de la microemulsión.
- Caracterizar fisicoquímicamente las microemulsiones con el mayor contenido de mebendazol.
- Evaluar la toxicidad nasal de las microemulsiones con mayor contenido de mebendazol.
- Determinar la capacidad antiproliferativa del MBZ *in vitro* empleando células de glioma.
- Evaluar la eficacia del MBZ incorporado en la microemulsión en el modelo murino ortotópico de glioma después de la administración intranasal.



## VI PARTE EXPERIMENTAL

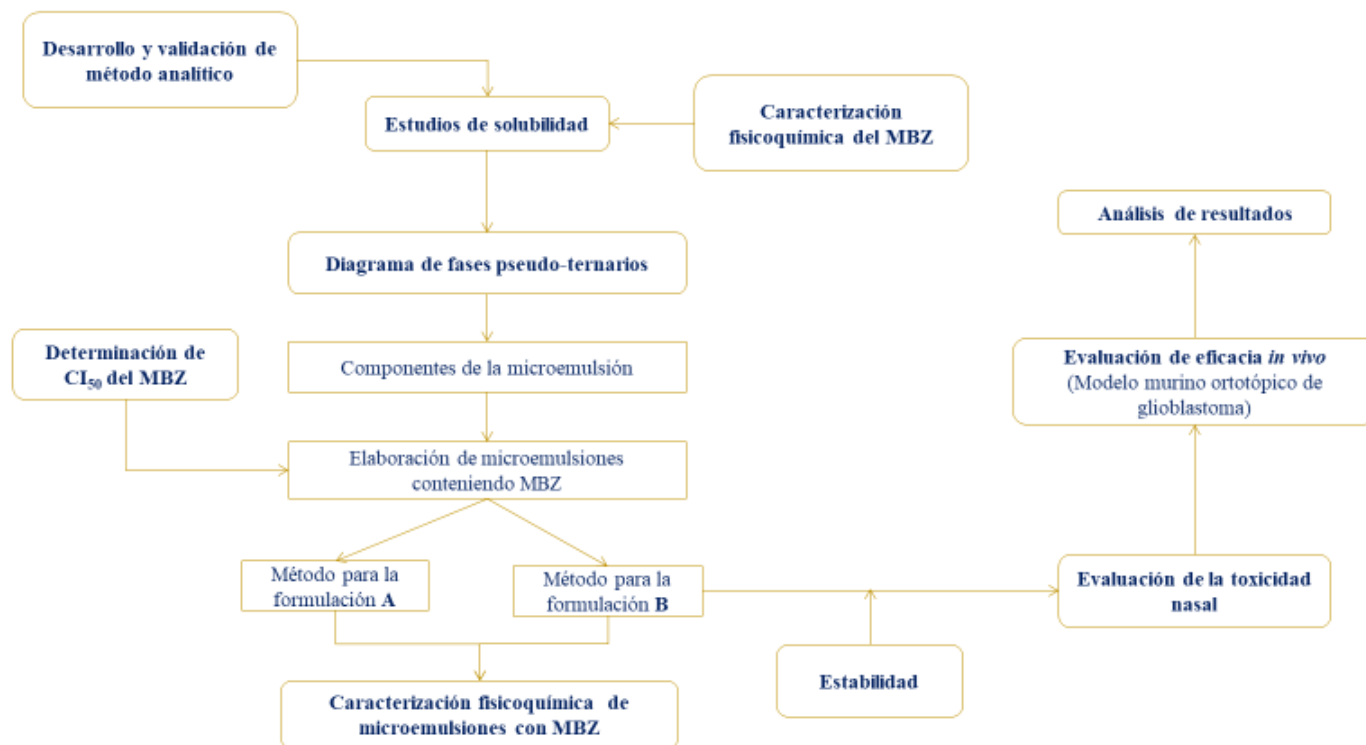
### 6.1 Materiales, reactivos y equipos.

- ✓ Mebendazol (KA, Malle Pharmaceuticals Ltd, India y Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Ácido oleico (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Super Refined® Ácido oleico (Croda®, Reino Unido).
- ✓ Incromega® DHA 500TG, aceite enriquecido con ácido docosahexaenoico (Croda®, Reino Unido).
- ✓ Transcutol® HP (Gattefossé, Francia).
- ✓ Labrafac® (Gattefossé, Francia).
- ✓ Labrasol® ALF (Gattefossé, Francia).
- ✓ Labrafil® M 1944 CS (Gattefossé, Francia).
- ✓ Miristato de isopropilo (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Tween 80® (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Cremophor® RH40 (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Polietilenglicol 400 (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Propilenglicol (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Metanol grado HPLC (J.T. Baker®, Estado Unidos de América).
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker®, Estado Unidos de América).
- ✓ Ácido fórmico (Fluka®, Alemania).
- ✓ Ácido fosfotúngstico (Agar scientific®, Reino Unido).
- ✓ Agua desionizada (Milli Q, Millipore®).
- ✓ Solución de calibración para conductímetro 1413 $\mu$ S/cm (HANNA®, Estado Unidos de América).
- ✓ Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucosa (Aldrich®, Estados Unidos de América).
- ✓ Suero fetal bovino (Biowets, Nuailé, Francia).
- ✓ Solución antibiótica antimicótica estabilizada 100x (Aldrich®, Estados Unidos de América). Filtro para jeringa 0.45  $\mu$ m, nylon (Macherey-Nagel, Alemania).
- ✓ Papel filtro Whatman #1 (GE Healthcare, Cytiva, Brasil).
- ✓ Tubo de diálisis con membrana de celulosa de 20 KDa (Spectra, Estados Unidos de América).
- ✓ Columna para Cromatografía de Líquidos de alta Resolución, Eclipse XDB-C-18, 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm (Agilent, Estados Unidos de América).
- ✓ Baño de agitación (Shel-Lab, SWBR17).
- ✓ Centrifuga (Eppendorf, 5416).
- ✓ Analizador de tamaño de glóbulo/molecular y de potencial zeta. (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Panalitica).
- ✓ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Shimadzu, LC-10AT)) con detector de UV vis (Shimadzu, SPD-10AV).
- ✓ Conductímetro (HANNA HI98311).
- ✓ Microscopio (Leica DM500).
- ✓ Histoquinete (Leica RM2125RTS).
- ✓ Baño de flotación (Leica HI1210).
- ✓ Centro modular de inclusión de tejidos (Leica EG1150).

## 6.2 Metodología.

### 6.2.1 Diagrama de trabajo.

En la **Figura 25** se presenta el diagrama utilizado para el desarrollo del presente trabajo:



**Figura 25.** Diagrama de trabajo.

### 6.2.2 Caracterización fisicoquímica del MBZ.

Se caracterizaron dos lotes de mebendazol del mismo fabricante: lote 1 (MBZ-01) y lote 2, (MBZ-02) así como una tercera muestra comercial (Aldrich®) (MBZ-03). Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

#### 6.2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El espectro de infrarrojo se obtuvo empleando un espectrómetro Perkin-Elmer modelo Spectrum 400, con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en un rango de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### 6.2.2.2 Difracción de rayos X de polvos (DRXP).

Los patrones de difracción de rayos X de polvos se obtuvieron empleando un difractómetro de rayos X polvo Bruke D8 Advance, equipado con un detector (monocromador de Cu). Las muestras fueron analizadas en un rango de  $2\theta = 3^\circ$  a  $40^\circ$ , con un tiempo de adquisición de 28 min.

### 6.2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La caracterización por DSC se realizó empleando contenedores de aluminio de 40  $\mu$ L. Para ello se pesaron de 2.0 a 4.0 mg de muestra, la velocidad de calentamiento fue de 10°C por minuto en un intervalo de 80 a 320°C con un flujo de 100 mL/m de aire ultrapuro.

### 6.2.3 Método analítico para la cuantificación de MBZ por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

La curva de calibración se preparó a partir de una solución stock pesando el equivalente de 15 mg de MBZ-03, disolviendo con 1 mL de ácido fórmico y aforando a 100 mL con metanol para obtener una concentración final de 150  $\mu$ g/mL. De la solución anterior se tomaron las alícuotas respectivas para preparar las siguientes concentraciones: 1.5, 3.0, 9.0, 15.0, 30 y 51.0  $\mu$ g/mL. Las muestras se aforaron a 10 mL con metanol; la curva se preparó por triplicado el mismo día del análisis inyectando las muestras directamente al equipo.

La determinación se realizó empleando el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución Shimadzu equipado con una bomba binaria y un detector de UV. Las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 247 nm, manteniendo la temperatura a 25°C, empleando un flujo isocrático de 1.2 mL/min e inyectando 10  $\mu$ L de las muestras. La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de metanol-agua a una proporción de 60:40 (v/v) respectivamente. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna cromatográfica C<sub>18</sub>, 4.6 X 150 mm, 5 $\mu$ m (Agilent Zorbax Eclipse XDB). Las pruebas de desempeño que se realizaron fueron coleo del pico y platos teóricos aceptando como criterio un intervalo de 0.8 a 1.5 y no menor a 3000 respectivamente. En cada evaluación se evaluó la adecuabilidad aceptándose aquellos análisis con un CV% menor a 2%.

### 6.2.4 Estudios de solubilidad de MBZ en diferentes excipientes.

Se evaluó la solubilidad del MBZ en diferentes componentes que son empleados para la formulación de microemulsiones, las cuales se agrupan en compuestos lipídicos, tensoactivos, co-tensoactivos y cosolventes. Los excipientes se eligieron consultando el sitio electrónico “*Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products*” de la página electrónica de la FDA revisando las dosis permitidas por vía nasal. De igual forma se revisaron las propiedades fisicoquímicas tales como el valor de HLB (>9, <15) y su carácter iónico, en este caso se eligieron tensoactivos no iónicos, debido a la baja toxicidad que poseen (Kaur y Mehta, 2017). Los componentes seleccionados y las proporciones evaluadas se presentan en la **Tabla IV**.

Para realizar el estudio se colocaron, en tubos *ependorf*, 2 mL de cada uno de los componentes, se le agregó mebendazol (MBZ-02) hasta alcanzar la saturación. Las mezclas se mantuvieron en un baño con agitación durante 48 h a una temperatura de  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 100 rpm. Concluido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se aforó con metanol. Se determinó la cantidad disuelta del fármaco en cada excipiente empleando el método HPLC previamente descrito.

**Tabla IV.** Compuestos evaluados en el estudio de solubilidad. **AO:** ácido oleico, **DHA:** ácido docosaheptaenoico.

Compuesto	Proporción
<b>Fase lipídica</b>	
Ácido oleico	1
Aceite de soya	1
ácido docosaheptaenoico	1
Mirstato de isopropilo	1
Labrafac®	1
Peceol®	1
Labrafil® M 2125	1
AO/DHA	1:1
AO/DHA	3:1
Ácido oleico/Labrafil® M 2125	1:1
<b>Tensoactivos, co-tensoactivos y Cosolventes</b>	
Labrasol®	1
Tween® 80	1
Transcutol® HP	1
Cremophor® RH-40	1
Polietilenglicol 400	1
Propilenglicol	1
Etolol	1

### 6.2.5 Desarrollo de los diagramas de fases pseudo-ternarios.

Para elaborar los diagramas de fases pseudo-ternarios, se eligieron los componentes lipídicos y sus mezclas, tensoactivos y el cosolvente en los cuales la solubilidad del MBZ fue más alta.

La construcción de los diagramas de fases pseudo-ternarios se realizó mediante el método de titulación. Para lo cual, se agregó lentamente, con una bureta de 10 mL, el agua, a la mezcla compuesta por la fase lipídica y *Smix*

(combinación de tensoactivo/co-tensoactivo) contenidos en un vaso de precipitados de 10 mL. La homogenización de las mezclas se realizó mediante una lenta agitación magnética. Se registró la apariencia como composición transparente, blanquecina, translúcida, viscosa o separación de fases.

Inicialmente se evaluaron diferentes combinaciones de Tween 80 y etanol (Smix) en una relación peso/peso (p/p) las cuales fueron: 3:1, 2:1 y 1:1. Cada una de estas combinaciones se mezcló con la combinación de ácido oleico / ácido docosahexaenoico (2:1) en una relación p/p de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 y 90:10. Posteriormente, a cada combinación se le agregó agua gota a gota con agitación constante y a temperatura ambiente.

Posteriormente, se redefinieron los componentes, empleando ácido oleico / ácido docosahexaenoico (3:1) y combinaciones de Labrafil, Transcutol y Etanol y la combinación de Tween 80, Transcutol y etanol en una relación peso/peso (p/p) de 1:1:1 cada una.

Finalmente, se evaluó la combinación de ácido oleico / Labrafil M 2125 (1:1) con la combinación de Tween 80, Transcutol y etanol a proporciones de 2:1:1, 1:0.5:1 y 1:2:1.

A partir de los diagramas de fases pseudoternarios, se seleccionaron aquellas combinaciones que presentaron una mayor región de isotropía, con una mayor incorporación de agua y manteniendo la apariencia transparente después de centrifugar a 4500 rpm durante 15 min

#### **6.2.6 Elaboración de microemulsiones conteniendo MBZ (MBZ ME).**

Se prepararon 2 microemulsiones empleando para ello, 2 métodos diferentes:

Preparación de la formulación A. El fármaco se solubilizó en Transcutol durante 30 min con agitación magnética moderada. Posteriormente se agregó el ácido oleico, posteriormente se incorporó el DHA y se agitó durante 30 minutos. Se agregó el Tween 80 y el etanol manteniendo la agitación durante 30 minutos para cada componente. Una vez homogenizada la mezcla, se agregó lentamente el agua, empleando agitación lenta y constante a temperatura ambiente.

Preparación de la formulación B: Se solubilizó el MBZ en el Labrafil M 2125 a una temperatura de 80°C, conforme a las recomendaciones del fabricante. Se esperó a que la temperatura alcanzara los 50°C y se incorporó el ácido oleico, manteniendo la agitación durante 40 min. Una vez que la temperatura alcanzó los 25°C, se incorporó el Transcutol manteniendo la agitación durante 30 min, después se incorporó el Tween 80 y el etanol. Por último, se agregó la fase acuosa lentamente y se mantuvo con agitación suave durante 30 min más.

Para la elaboración de microemulsiones conteniendo mebendazol con hialuronato de sodio (MBZ-NaH ME), se agregó lentamente el hialuronato de sodio (NaH) a la fase acuosa y se mantuvo en agitación durante 2 h. Posteriormente se agregó a la fase lipídica/Smix, conteniendo o no el fármaco para formar la microemulsión mediante los métodos anteriormente reportados.

Una vez preparadas las formulaciones, estas se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos.

### **6.2.7 Cuantificación de MBZ en la microemulsión**

Se tomaron 500  $\mu$ L de las formulaciones preparadas conteniendo MBZ, colocando el volumen en un matraz aforado de 10 mL, la mezcla se aforó con metanol con agitación moderada. Las soluciones se inyectaron directamente al equipo de HPLC empleando el método previamente descrito.

### **6.2.8 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones.**

#### *6.2.8.1 Inspección visual.*

Todas las muestras fueron observadas de manera visual determinando las características de: transparencia, translucidez, turbidez, mezcla blanquecina o lechosa y separación de fases.

#### *6.2.8.2 Determinación de Tamaño de glóbulo (DTP), polidispersión (IP) y potencial zeta (PZ).*

Las determinaciones de tamaño de glóbulo, potencial zeta y polidispersión se realizaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica en un ángulo de incidencia de 90 °. Todas las muestras se colocaron directamente en la celda del equipo. Las determinaciones de potencial zeta se realizaron en una celda capilar. Las tres determinaciones se realizaron en un equipo Zeta sizer nano S90 (Malvern) a 25°C.

#### *6.2.8.3 Determinación de pH de las formulaciones.*

La determinación se realizó en un potenciómetro Thermo Scientific. La medición se llevó a cabo a temperatura ambiente.

#### 6.2.8.4 Determinación de conductividad eléctrica (S/m).

La determinación se realizó utilizando un conductímetro waterproof tester Hanna Instruments (Woonsocket, RI, USA) previamente calibrado. Todas las evaluaciones se realizaron a temperatura ambiente.

#### 6.2.8.5 Determinación de la morfología mediante el análisis de microscopía de transmisión electrónica (TEM).

En una rejilla de cobre con recubrimiento de carbón con un tamaño de malla de 400 se colocó la muestra de microemulsión hasta cubrir totalmente la rejilla permitiendo el secado durante 24 horas, posteriormente se tiñó la muestra durante 20 segundos con una solución de ácido fosfotúngstico al 1% retirando el exceso con papel filtro. Concluido el tiempo, las muestras se secaron a temperatura ambiente manteniéndolas sobre papel filtro aisladas del polvo. Las rejillas se colocaron directamente el microscopio electrónico de transmisión (JEOL 2010) realizando las determinaciones a una velocidad de aceleración de 200 kv.

#### 6.2.8.6 Estudio de reología.

##### 6.2.8.6.1 Estudio de la viscosidad de las microemulsiones.

Las determinaciones de viscosidad y de reología se llevaron a cabo empleando un reómetro Híbrido Discovery DHR3, TA Instruments (Delaware, USA) provisto de una geometría cilíndrica de doble pared. Las muestras se colocaron en la cámara y las determinaciones se realizaron a 25°C controlando la temperatura mediante un baño de agua por un sistema de recirculación. Las pruebas de efecto de viscosidad con respecto a la temperatura se realizaron con una tasa de incremento de 2°C/min, en un rango de temperatura de 20°C a 50°C.

##### 6.2.8.6.2 Estudio viscoelástico de la formulación B

La determinación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de disipación o pérdida ( $G''$ ) se obtuvo mediante los parámetros de tensión controlada y de la frecuencia angular únicamente para la formulación B. La región lineal viscoelástica (LVE), sobre  $G'$  y  $G''$ , se determinó usando la tensión controlada en un rango de 0.01 a 100 %, mientras que la frecuencia angular se construyó a 10 rad s<sup>-1</sup> (1.5915 Hz). Considerando que la región lineal de LVE fue sobre un rango de frecuencia de 0.1 a 10 Hz al aplicar una tensión menor a 10% de deformación, las evaluaciones de  $G'$  y  $G''$  se realizaron bajo estas condiciones, aplicando 1 % de deformación.

##### 6.2.8.6.3 Evaluación de la viscosidad de la formulación B con respecto a la temperatura.

Con la finalidad de descartar un efecto de inversión de fases, se determinó el efecto de la viscosidad a una velocidad constante de esfuerzo de 1s<sup>-1</sup> con respecto a la temperatura en un rango de 20 a 50°C.



#### 6.2.8.7 Estudio de estabilidad de la formulación B.

Como parte de la evaluación de la estabilidad de la microemulsión de la formulación B, se monitoreó el contenido de MBZ a temperatura ambiente (25°C) durante 89 días. Para ello, se prepararon por triplicado microemulsiones conteniendo MBZ sin hialuronato de sodio (MBZ ME) y con hialuronato de sodio (MBZ-NaH ME). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz, se cuantificaron al inicio, a los 59 días y a los 89 días, tomando una alícuota de cada muestra, diluyendo con metanol e inyectando al equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando el método analítico, previamente reportado.

### 6.2.9 Determinación de la concentración inhibitoria cincuenta del MBZ.

#### 6.2.9.1 Condiciones del cultivo celular.

Se empleó la línea celular C6 (glioma de rata) (ATCC). Las células se mantuvieron en el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany) conteniendo 4500 mg/mL de glucosa, L-glutamina, piruvato y 25 mM de ácido (4-(2-hidroxietil)-1- piperazinaetil sulfónico), adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany) y 100 U/mL de penicilina-streptomicina, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany). El cultivo se incubó en una cámara de humedad manteniendo un 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. Las evaluaciones se realizaron empleando un cultivo celular al 80% de confluencia.

#### 6.2.9.2 Condiciones de evaluación.

La determinación de la CI<sub>50</sub> del MBZ en la línea C6 se realizó empleando el ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT. Para establecer las condiciones de evaluación se evaluó: a) el número de células utilizar y b) la máxima cantidad de DMSO a emplear sin que se afectara el crecimiento celular.

Para determinar el número de células a utilizar, en una placa de 96 pozos, se sembraron de 1500 a 48000 células en el medio de cultivo. Transcurridas 24 h, se cambió el medio de cultivo y se incubó durante 72 h a 5% de CO<sub>2</sub>.

Concluido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y a cada pozo se le agregaron 10 µL del reactivo MTT a una concentración de 5 mg/mL completando a un volumen final de 100 µL con medio de cultivo. El tiempo de exposición del reactivo se realizó a 3 horas. Se retiró la solución de MTT y se agregaron 110 µL de DMSO, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany). La placa se agitó durante 15 min (Roto-Shake Genie, Scientific Industries Inc. U.S), y se determinó la absorbancia a 570 nm empleando un espectrofotómetro (Eon, BioTek Instruments, Inc, US.). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la evaluación de la cantidad de DMSO a utilizar, las células fueron expuestas a 1.0, 0.75, 0.5 y 0.0 % de DMSO durante 72 h. Se empleó también un control de 24 h de incubación sin DMSO y se siguió el

procedimiento anteriormente descrito.

### 6.2.9.3 Determinación de la $CI_{50}$ del MBZ en la línea celular C6.

En una placa de cultivo de 96 pozos, se colocaron  $3.0 \times 10^3$  células en 100  $\mu$ L de medio de cultivo, se adicionó el MBZ a concentraciones de 0.006, 0.025, 0.099, 0.397, 1.589, 6.356, 25.42 y 101.00  $\mu$ M, empleando como blanco una solución al 0.7% de DMSO. Las células fueron incubadas durante 72 h a 5% de  $CO_2$ . La viabilidad celular se determinó por reducción del compuesto MTT, como se describió anteriormente. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos se procesaron empleando el software GradPhad versión 5.

## 6.2.10 Evaluación *in vivo* de la toxicidad nasal.

### 6.2.10.1 Animales.

El estudio se llevó a cabo empleando ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 250-270 g de peso. Los animales se adquirieron en Envigo México. Previo al estudio los animales se mantuvieron en periodo de aclimatación durante 5 días registrando el peso al inicio. Los animales se alojaron en áreas controladas donde se mantuvo la temperatura a  $22 \pm 2^\circ C$ , con una humedad relativa de 40 a 70% y una iluminación fluorescente con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química-UNAM mediante el oficio 348/18.

### 6.2.10.2 Administración nasal.

Uno de los modelos animales aceptados para la evaluación de la toxicidad nasal es el de la rata (Emami *et al.*, 2018, Gizurason, 1990). En el presente estudio se emplearon 18 ratas distribuidas en tres grupos, las cuales fueron asignadas aleatoriamente. Los grupos estuvieron conformados de la siguiente forma: Grupo I, solución salina; Grupo II, vehículo de la microemulsión de la formulación B y Grupo III, microemulsión de la formulación B conteniendo 260  $\mu$ g/mL de MBZ. A los animales se les administró diariamente el control o tratamiento (20  $\mu$ L / narina) durante 14 días empleando una micropipeta con punta de plástico estéril. Los animales fueron observados durante todo el estudio para registrar eventos como, comportamiento retraído, respiración anormal, caída de pelo, sangrado, o muerte. El peso de los animales fue registrado al inicio, a los siete días y al final del estudio.

En la **Figura 26** se presenta el procedimiento que se empleó para la administración nasal, colocando 20  $\mu\text{L}$  en cada narina. Este método resultó confiable para realizar la administración de la microemulsión (MBZ-NaH ME).



**Figura 26. Administración intranasal en el estudio de toxicidad de la formulación B (MBZ-NaH ME).**

#### 6.2.10.3 Procesamiento de muestras.

Al concluir el periodo de administración, las ratas se sacrificaron en una cámara de  $\text{CO}_2$ , bajo los lineamientos del protocolo preclínico aprobado, después, se decapitaron. Se recolectaron las siguientes secciones del tejido nasal: epitelio nasal craneal (cerca a fosa nasal), epitelio nasal medio (parte media de la cavidad nasal) y epitelio nasal caudal (conchas etmoidales). Las muestras se sumergieron en formol buffereado al 5% para su fijación, se colocaron en casetes para deshidratarlas y se incluyeron en parafina. De estos bloques se obtuvieron cortes de 3 micras de grosor con el micrótopo, las cuales se dispusieron en el baño de flotación para generar la extensión de los cortes y después se colocaron en la incubadora para retirar la parafina. Los cortes se tiñeron de manera convencional mediante la técnica hematoxilina y eosina para su análisis bajo el microscopio.

#### 6.2.11 Estudio *in vivo* de la eficacia de la microemulsión de mebendazol en un modelo murino ortotópico de glioblastoma.

##### 6.2.11.1 Animales.

El estudio se llevó a cabo empleando ratas macho de la cepa *Wistar de 150 – 180g de peso*. Las ratas se adquirieron en la Universidad Autónoma Metropolitana. Previo al estudio los animales estuvieron en periodo de aclimatación durante 5 días registrando el peso al inicio. Los animales se alojaron en áreas controladas donde se mantuvo la temperatura a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de 40 a 70% y una iluminación fluorescente

con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional del “Instituto Nacional de Cancerología” de México con el número: (010/017/IBI) (CEI/601/109) y los estudios se llevaron a cabo conforme a lo dispuesto por la legislación mexicana expresado en la *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

#### 6.2.11.2 Generación del modelo murino ortotópico de glioblastoma.

Para la generación del modelo *in vivo*, se emplearon ratas con peso de  $200 \pm 10$  g, las cuales fueron anestesiadas por vía aérea empleando de 4 a 5% de isoflurano con flujo de oxígeno de 0.5 a 1.0 L/min, posteriormente, se administró tiletamina/zolacepam a una dosis de 30 a 50 mg/kg por vía intraperitoneal. Mediante cirugía estereotáxica, se perforó 3 mm en la intersección de las suturas coronal y sagital de la superficie dorsal craneal (bregma), posteriormente se introdujo una aguja con una cánula donde se perfundió un volumen de 3  $\mu$ L con  $1 \times 10^6$  células C6 utilizando una velocidad de flujo de 0.5  $\mu$ L/min durante 6 min. Concluida la inoculación de las células, se retiró lentamente la aguja y se colocó una membrana regeneradora de hueso con pegamento y se suturó con hilo quirúrgico. Las ratas se colocaron en cajas de acrílico para permitir su recuperación. Como control de la cirugía, se empleó un grupo con inoculación únicamente de medio de cultivo (Grupo Sham). Después de 7 a 10 días de la inoculación, se inició la administración de las microemulsiones.

#### 6.2.11.3 Evaluación de la eficacia de microemulsiones conteniendo MBZ.

La administración se llevó a cabo administrando los tratamientos directamente a la cavidad nasal con una micropipeta con una punta de plástico, 20  $\mu$ L en cada narina de la rata previamente anestesiadas con isoflurano durante 14 días continuos.

La asignación de los grupos fue la siguiente: Grupo Sham, ratas únicamente inoculadas con medio de cultivo y sin administración de tratamiento; Grupo control, ratas con generación de tumor y sin administración de tratamiento; Grupo MBZ-NaH ME, ratas con generación de tumor y administración de la formulación B y Grupo NaH ME, ratas con generación de tumor y administración del vehículo de la formulación B. Los grupos estuvieron conformados por un número total de 6 especímenes ( $n=6$ ) a los cuales se les registró el peso y se determinó la media de la supervivencia empleando el método de Kaplan-Meier procesando los datos en el software GraphPad versión 5.

#### 6.2.11.4 Estudio *ex vivo* de intensidad de fluorescencia.

Las imágenes de intensidad de fluorescencia emitida desde el cerebro de las ratas de los diferentes grupos fueron determinadas al final de la administración de los tratamientos. Para ello, las ratas fueron inyectadas por vía intravascular en la vena caudal bajo anestesia (vía aérea de 1-3% de isoflurano con 100% de oxígeno), 100  $\mu$ L del agente de contraste (péptido IRDye 800CW-RGD abs: 776 nm, em: 792 nm), obtenido de LI-COR Biosciences, y empleado a una concentración de 1 nmol. Después de 48 h de la administración del agente, las ratas fueron sacrificadas y el tejido cerebral fue disectado y se midió la fluorescencia inmediatamente a una longitud de onda de 800 nm mediante el sistema Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR). Las imágenes de fluorescencia absoluta fueron adquiridas empleando una resolución de 337  $\mu$ m mediante el software Odyssey Application. La captación de fluorescencia del tejido neuronal se obtuvo restando la intensidad de la fluorescencia de los controles y tratamientos a la fluorescencia de fondo del control. La relación área/señal fue empleada para la comparación de todos los grupos.

#### 6.2.11.5 Análisis histológico.

Al final de la administración de los tratamientos o de la supervivencia, las ratas fueron sacrificadas y perfundidas con solución salina y posteriormente, con paraformaldehído al 4%. El tejido cerebral fue extraído y procesado mediante el método de hematoxilina-eosina (*H&E*), anteriormente descrito en la sección de procesamiento de muestras en el estudio de toxicidad, utilizando cortes en el plano coronal y de 2 mm de ancho.

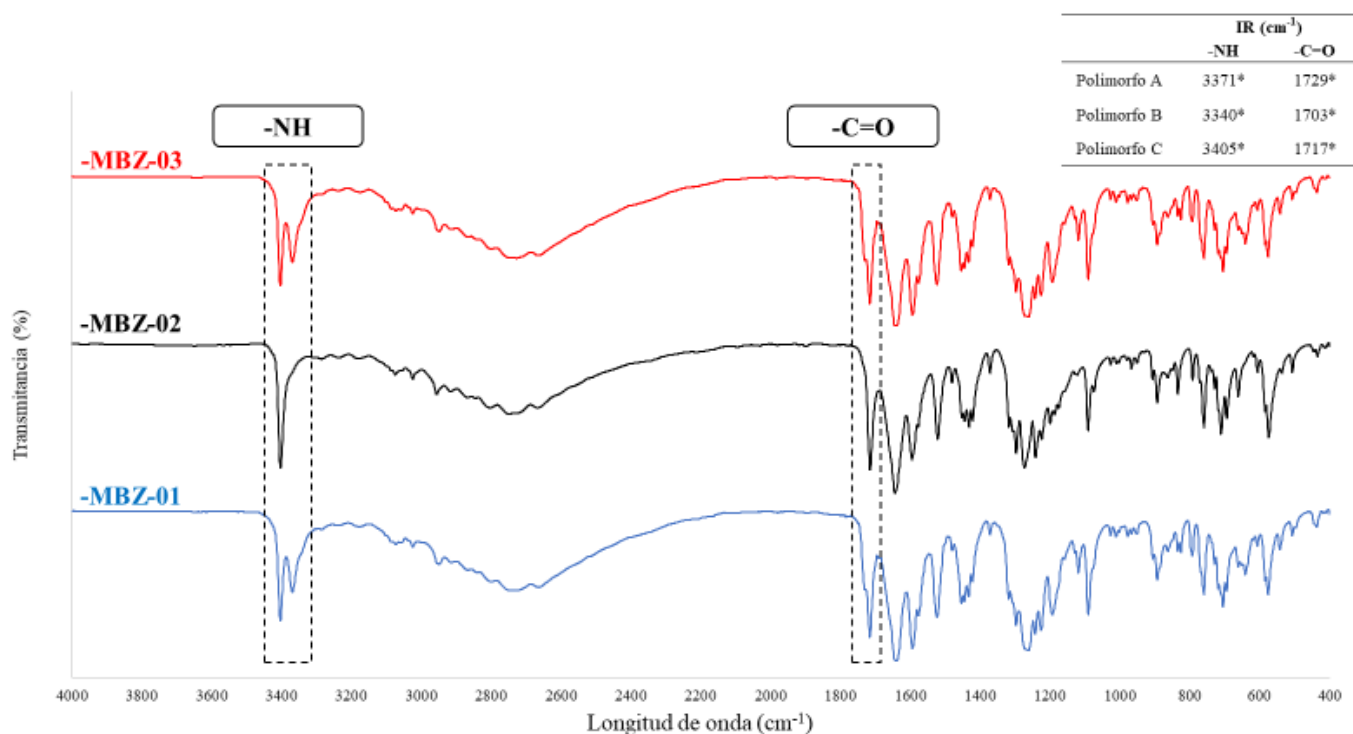
## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización fisicoquímica del MBZ.

La materia prima de MBZ comercialmente disponible, contiene una mezcla de los tres polimorfos a proporciones variables, por lo tanto, puede haber diferencias en la solubilidad. Esto es un factor que afecta el desarrollo de la formulación debido a los tiempos y energía requerida para vencer las fuerzas intermoleculares de los diferentes arreglos cristalinos, que son las responsables tanto de la estabilidad termodinámica como de la solubilidad (Martins *et al.*, 2009). Una opción sería desarrollar la formulación con la forma polimórfica C, debido al equilibrio entre solubilidad y estabilidad, sin embargo, el costo se incrementaría de manera considerable. Aunado al efecto reportado que, bajo condiciones de humedad y temperatura no controladas, el polimorfo C tiende a transformarse a la forma polimórfica A. Por lo tanto, se decidió utilizar la materia prima disponible y determinar las diferencias de la cristalinidad entre los lotes para seleccionar el lote más adecuado para el desarrollo de la formulación. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

#### 7.1.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

En 2015, Bai y colaboradores, reportaron las señales características de los polimorfos A, B y C. Las bandas situadas a 3371, 3340, 3405  $\text{cm}^{-1}$  están asociadas al enlace -NH; mientras las bandas a longitudes de onda de 1729, 1703, 1717  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al enlace -C=O, para los polimorfos A, B y C respectivamente. En la **Figura 27** se presenta el espectro de IR de las tres muestras de MBZ adquiridas. Se puede observar que en las tres muestras se encuentra la señal de 3405  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al enlace -NH del polimorfo C. En la región de 3371 y 3340  $\text{cm}^{-1}$ , la muestra MBZ-02 no presenta esta señal. Con respecto a la región de enlace -C=O, las muestras MBZ-01 y MBZ-03 presentan las señales correspondientes al polimorfo A y B, mientras que en la muestra MBZ-02, la señal es casi imperceptible.



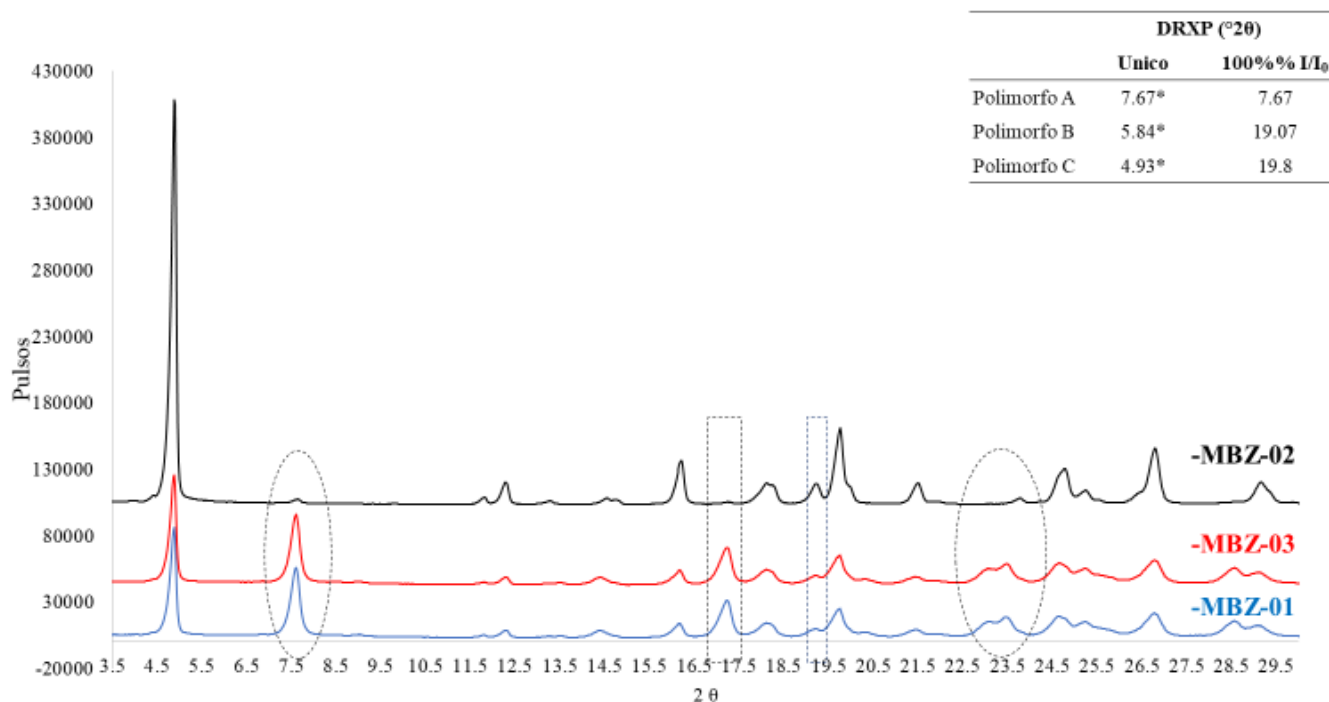
\*Bai, R.Y., *et al.* (2015). Clin Cancer Res; 21, (15).

**Figura 27. Espectro de IR-FT de las diferentes materias primas de MBZ.** MBZ-01, MBZ-02 and MBZ-03 en el rango de 4000-400 cm<sup>-1</sup>. Enlace -NH polimorfo A (3371 cm<sup>-1</sup>), polimorfo B (3340 cm<sup>-1</sup>) y polimorfo C (3405<sup>-1</sup>); para el enlace -C=O polimorfo A (1729 cm<sup>-1</sup>), polimorfo B (1703 cm<sup>-1</sup>) y polimorfo C (1717 cm<sup>-1</sup>) según Bai *et al.*, 2015.

### 7.1.3 Difracción de rayos X de polvos (PXRD).

Con respecto al análisis de DRXP, Brits *et al.*, 2010, reportaron las distancias interplanares características para los tres polimorfos de MBZ, las cuales fueron 7.67 d (Å), para el polimorfo A, 5.84 d (Å) para el polimorfo B y 4.93 d (Å), para la forma C. En la **Figura 28** se presenta el difractograma correspondiente a las muestras MBZ-01, MBZ-02 y MBZ-03. Se puede observar que, la señal atribuida al polimorfo C se encuentra en las tres muestras, sin embargo, la señal para el polimorfo A, se presenta con mayor intensidad en las muestras MBZ-01 y MBZ-03 y no en la MBZ-02. Además, el comportamiento cristalino entre la región de 16.5 a 24.5 es similar entre MBZ-01 y MBZ-03, sin embargo, el patrón de difracción de MBZ-02 difiere con respecto a las dos muestras anteriores.



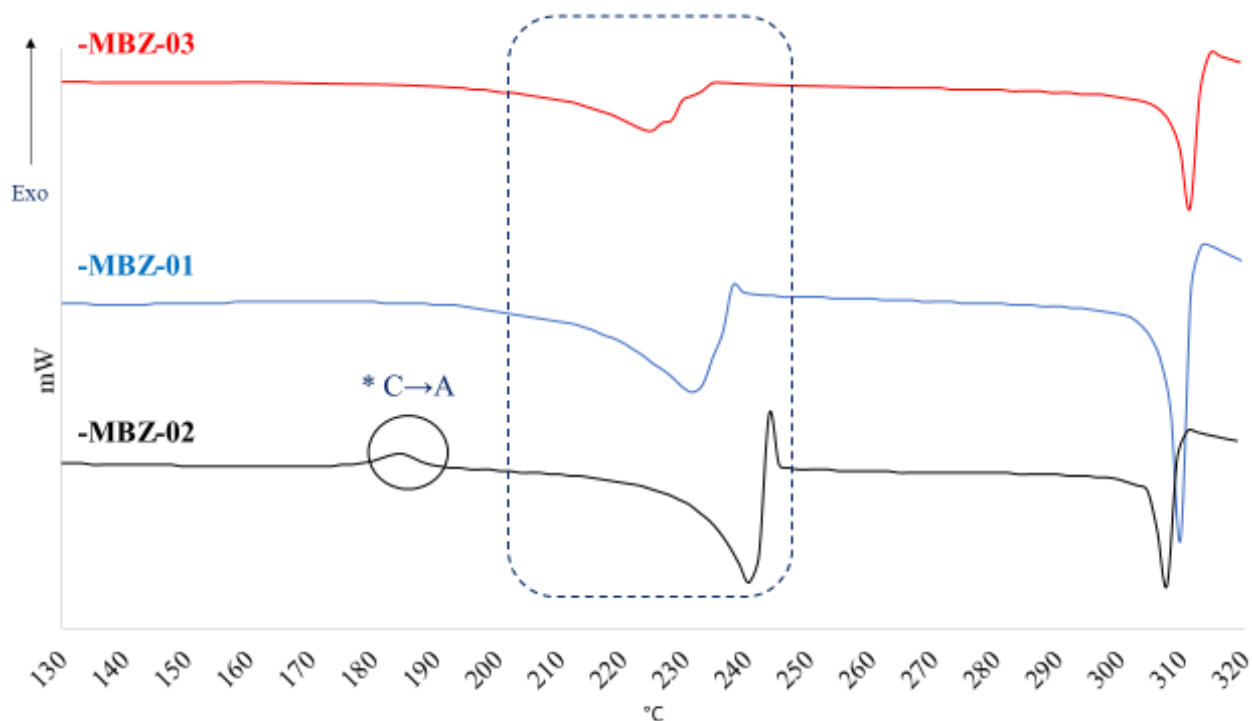


\*Brits, M. *et al.* (2010). *J Pharm Sci.* 99, 1138–1151

**Figura 28.** Difractograma de rayos X de polvos de las materias primas de MBZ. MBZ-01, MBZ-02, y MBZ-03.

#### 7.1.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la **Figura 29** se presenta el termograma correspondiente a las muestras hasta ahora descritas. Se puede observar que todas ellas presentan dos eventos endotérmicos, el primero se encuentra en el rango de 205 a 245°C, mientras que el segundo se encuentra en el intervalo de 303 a 311 °C (Holanda *et al.*, 2018). En el primer evento térmico, se puede observar que las endotermas no muestran una definición total y describen un amplio valle. Este comportamiento, ampliamente reconocido en el análisis calorimétrico de fármacos está asociado a la pureza de la muestra. Las endotermas con un área amplia o distorsionada se asocian a dos eventos, recristalización del fármaco o un comportamiento polimórfico de la muestra, (Catillo *et al.*, 1999). El segundo evento, es común a las tres muestras y ha sido asociado a la descomposición de la molécula (Holanda *et al.*, 2018). En la muestra MBZ-02, se observa que la señal está un poco más definida con respecto a MBZ-01 y MBZ-03 lo cual, podría asociarse a una muestra con un menor carácter polimórfico. En el caso de la muestra MBZ-02 se presentó un evento exotérmico a 185°C, este evento térmico Himmelreich *et al.* (1977) lo atribuyó a una transición de la forma polimórfica C a la forma A.



\*Himmelreich, W., et al. (1977). J Pharm Sci. 6: 123-125.

Figure 29. Termograma de las tres materias primas de MBZ.

Los resultados mostraron que aún cuando las tres muestras contienen una mezcla de los tres polimorfos, el polimorfo C predominó en la muestra MBZ-02, por lo que se seleccionó esta materia prima para el desarrollo de la formulación en presentación microemulsión.

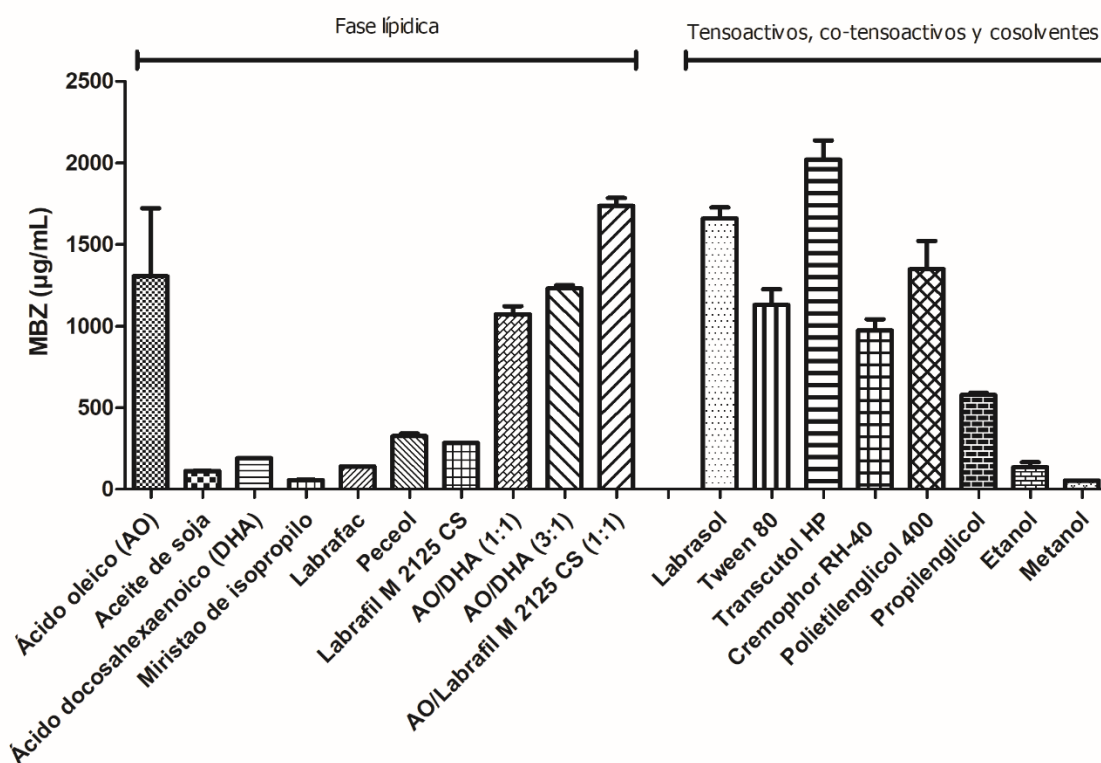
## 7.2 Estudios de solubilidad de MBZ en diferentes excipientes.

En la **Figura 30** se presenta el gráfico de solubilidad de mebendazol en las diferentes fases oleosas, tensoactivos, co-tensoactivos y cosolventes.

Se puede observar que el MBZ presentó una mayor solubilidad en ácido oleico ( $1305 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ ), mientras que la solubilidad en el resto de los compuestos lipídicos fluctuó entre 112 - 326  $\mu\text{g/mL}$ . Kawakami *et al.* 2002 observó que la solubilidad de los fármacos aumentaba al emplear combinaciones de compuestos lipídicos en la formulación de MEs. En el presente trabajo, se exploró este enfoque. Aunque la solubilidad del MBZ en el ácido oleico no se incrementó cuando se combinó con el DHA a una relación 1:1 ( $1073 \pm 69 \mu\text{g/mL}$ ) y en la proporción 3:1 fue semejante ( $1231 \pm 27 \mu\text{g/mL}$ ), se ha reportado que al incorporar DHA a las MEs, el paso del

fármaco a través del epitelio nasal se ve incrementado (Shinde *et al.*,2015), por lo que se consideró conveniente elegir la combinación AO/DHA en la proporción de 3:1.

Anteriormente, Parakh *et al.*, 2015 utilizaron Labrafil M 2125 como fase oleosa para desarrollar sistemas auto-microemulsificables de MBZ. En el presente estudio se encontró que este excipiente incrementó considerablemente la solubilidad del mebendazol al combinarse con ácido oleico en una relación de 1:1 ( $1737 \pm 68 \mu\text{g/mL}$ ). Por lo anterior, para la construcción de los diagramas de fases pseudo-ternarios se seleccionaron las mezclas de AO/DHA y AO/Labrafil M 2125. En el caso de Labrasol, Tween 80, Transcutol, y el PEG los resultados de solubilidad fueron de:  $1660 \pm 09 \mu\text{g/mL}$ ,  $1129 \pm 14 \mu\text{g/mL}$ ,  $2019 \pm 17 \mu\text{g/mL}$  y  $1349 \pm 25 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, por lo que éstos se eligieron como tensoactivos y co-tensoactivos.



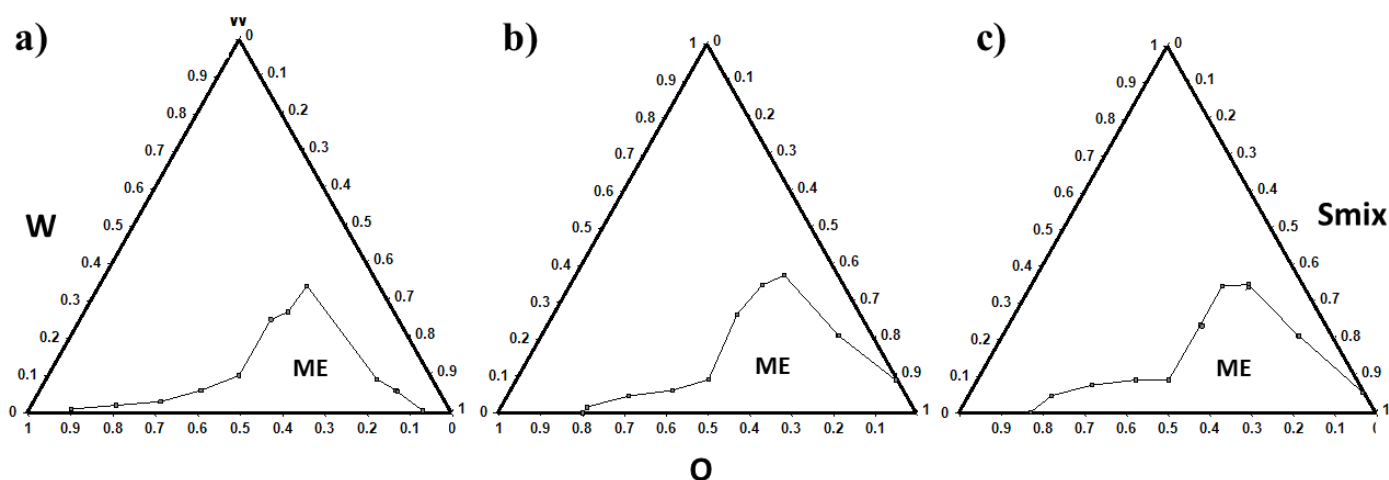
**Figura 30. Solubilidad del MBZ en diferentes componentes.** Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  desviación ( $n=3$ ).

### 7.3 Desarrollo de los diagramas de fases pseudo-ternarios.

Los diagramas de fases pseudo-ternarios son la representación gráfica de la interacción de los tres compuestos, ya sea puros o en combinación, expresados en un triángulo equilátero (triángulo de Gibbs). Estos diagramas se construyen para seleccionar los componentes apropiados y los rangos de concentración en los que se presenta la mayor área de microemulsión.

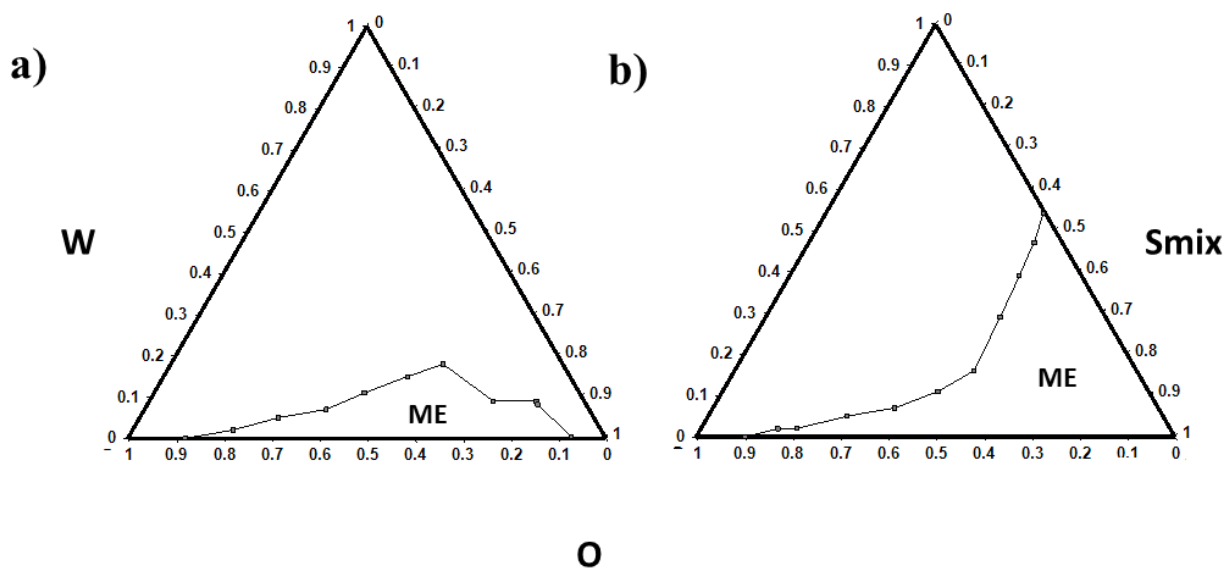
El presente trabajo se enfocó al desarrollo de microemulsiones tipo O/W, las cuales han sido utilizadas ampliamente en la administración nasal.

En la **Figura 31** se presentan los diagramas de fases pseudo-ternarios empleando ácido oleico/ácido docosaheptaenoico (OA/DHA) en proporción 3:1 como fase lipídica y las regiones que se generaron al utilizar diferentes proporciones de la mezcla de tensoactivos/co-tensoactivos: Tween 80 / etanol (Smix). Se puede observar que al utilizar la mezcla Smix en proporción 1:1 (**Figura 31a**) el área monofásica o área de microemulsión (ME) es reducida. El área tampoco se incrementó al aumentar la proporción Smix a 2:1 o 3:1 (**Figura 31b** y **Figura 31c** respectivamente). Además, en todas estas combinaciones, la cantidad de agua incorporada fue menor al 40%. Por lo anterior, se decidió añadir PEG 400 a la combinación: Tween 80/etanol, encontrando que el área microemulsión fue menor y la cantidad de agua incorporada no fue mayor al 30%. Además, se observó una consistencia de gel, por lo que se descartó el uso de este co-tensoactivo.



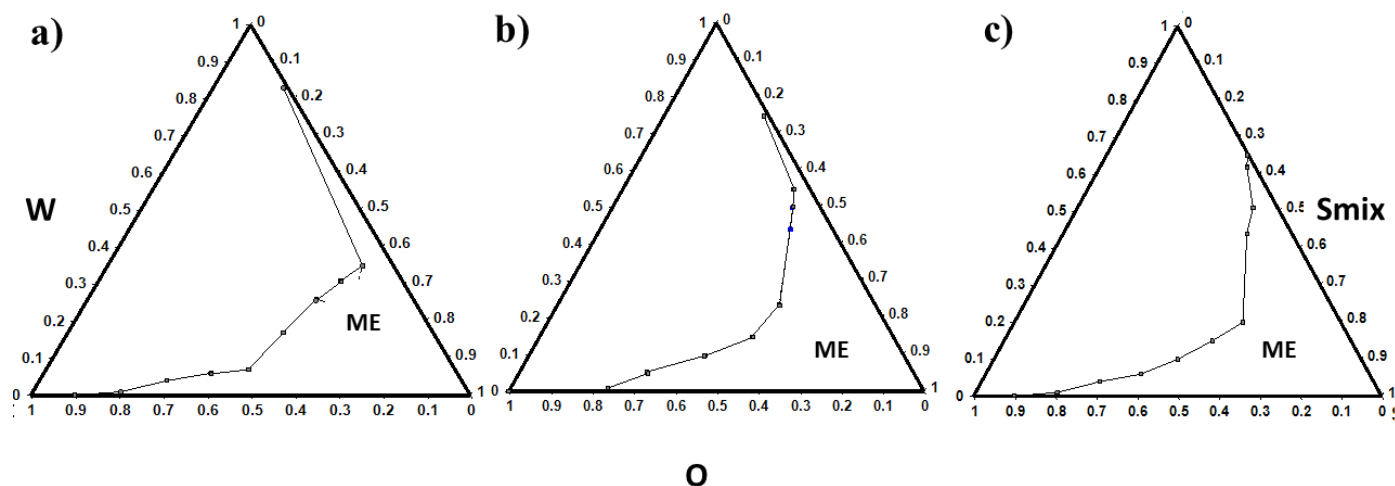
**Figura 31. Diagramas de fases pseudo-ternarios empleando como fase lipídica AO/DHA (3:1) con Tween 80 / etanol a proporciones de a) 1:1, b) 2:1 y c) 3:1 (Smix). ME: región de microemulsión, W: agua, O: fase lipídica.**

En la **Figura 32** se presenta los diagramas pseudoternarios correspondiente al emplear la misma fase lipídica, y la mezcla de Labrasol / Transcutol / etanol y Tween 80 / Transcutol / etanol en proporción 1:1:1 p/p. como Smix. Se puede observar que el área de microemulsión al emplear Labrasol fue muy pequeña (**Figura 32a**), mientras que la incorporación del Transcutol® HP (la presentación ultra pura del dietilenglicol monoetil eter), a la mezcla, Tween 80 / etanol incrementó la región de ME. (**Figura 32b**). El Transcutol ha sido utilizado ampliamente como un disolvente en diferentes formulaciones farmacéuticas (Osborne *et al.*, 2018) debido a su gran capacidad para disolver fármacos, lo cual se ha atribuido a la formación de puentes de hidrogeno con los grupos *eter* y *alcohol* y a su perfil de seguridad (Sullivan *et al.*, 2014). Además, su miscibilidad tanto con fases lipídicas como acuosas favorece el desarrollo de microemulsiones.



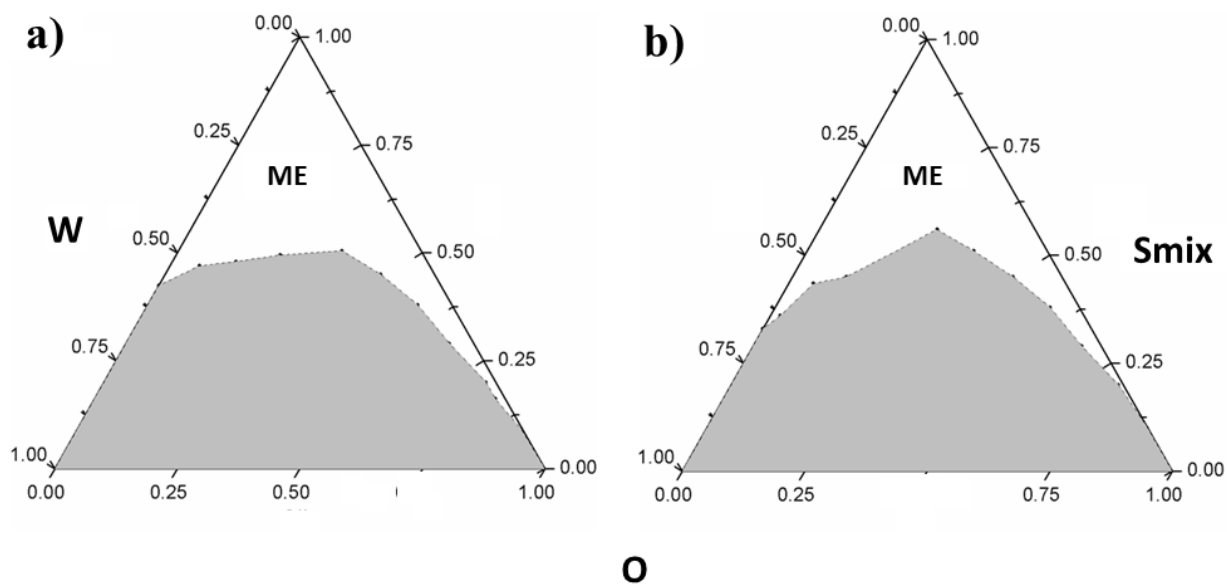
**Figura 32.** Diagramas de fases pseudo-ternarios para la fase lipídica AO/DHA (3:1) empleando la combinación de Smix de a) Labrasol / Transcutol / etanol y b) Tween 80 / Transcutol / etanol, ambas a proporciones de 1:1:1. ME: región de microemulsión, W: agua, O: fase lipídica.

Los diagramas ternarios resultantes de ácido AO / Labrafil M 2125 en proporción 1:1 y diferentes proporciones de Tween 80 / Transcutol / etanol (Smix), se presentan en la **Figura 33**. Se puede observar que al emplear una proporción de Smix de 2:1:1 y 1:0.5:1, las regiones monofásicas fueron amplias y la incorporación de agua fue de más del 70%, (**Figuras 33a** y **33b**) sin embargo, la proporción de fase lipídica fue menor de 8% lo cual daría lugar a que la cantidad de MBZ a ser incorporado a la microemulsión sería muy baja, por lo que, estas combinaciones también fueron descartadas. Al evaluar la Smix a una proporción de 1:2:1(**Figura 33c**), se encontró una región ME amplia que permitió un equilibrio adecuado entre la cantidad de agua incorporada (40%) y una cantidad de fase lipídica del 10%, por lo tanto, se seleccionó esta proporción para desarrollar la segunda formulación.



**Figura 33. Diagramas de fases pseudo-ternarios para la fase lipídica AO/Labrafil M 2125 empleando como Smix: Tween 80 // Transcutol / etanol a proporciones de a) 2:1:1, b) 1:0.5:1 y c) 1:2:1. ME: región de microemulsión, W: agua, O: fase lipídica.**

En la figura 34 se presentan los diagramas de los cuales se seleccionaron los componentes para desarrollar las formulaciones A y B. Las proporciones seleccionadas para la preparación de las formulaciones finales se presentan en la **Tabla V**.



**Figura 34. Diagramas de fases pseudo-ternarios finales. a) formulación A, O: AO/DHA (3:1), Smix: (Tween 80/Transcutol/etanol, 1:1:1) y para la b) formulación B, O: AO/Labrafil M 2125 (1:1), Smix: (Tween 80/Transcutol/etanol, 1:2:1). ME: región de microemulsión, W: agua, O: fase lipídica.**

**Tabla V. Proporciones empleadas para la elaboración de las microemulsiones correspondientes a la formulación A y B.**

Microemulsión	Fase lipídica (% p/p)	Smix (% p/p)	Fase acuosa (% p/p)
<b>Formulación A</b>	9%	51%	40%
	AO/DHA (3:1)	Tween 80/Transcutol/etanol (1:1:1)	Agua
<b>Formulación B</b>	10%	51%	39%
	AO/Labrafil M 2125 (1:1)	Tween 80/Transcutol/etanol (1:2:1)	Agua

#### 7.4 Preparación de microemulsiones conteniendo MBZ (MBZ ME).

La elaboración de microemulsiones en el área farmacéutica está conceptualizada como estrategia de solubilización de fármacos hidrofóbicos la cual se lleva a cabo principalmente en el seno lipídico de la formulación (sistemas de tipo O/W), por lo que esta es la etapa crucial en la elaboración de microemulsiones. En el presente trabajo se emplearon 2 procesos para la preparación de las microemulsiones: temperatura ambiente para la formulación A y calentamiento para la formulación B.

Los resultados mostraron que el método empleado para la formulación A fue viable y sencillo. Esta formulación incorporó una concentración de  $154.27 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$  de mebendazol.

Se ha reportado que para el desarrollo de microemulsiones, el uso de calentamiento permite facilitar la solubilización de fármacos (Parakh *et al.*, 2015). En el caso de la formulación B, al utilizar las etapas fue posible incorporar una mayor cantidad de MBZ sin generar cambios en la apariencia o precipitación. En esta formulación la concentración fue de  $260 \pm 3.36 \mu\text{g/mL}$ . Al preparar las microemulsiones con NaH, no se presentaron cambios físicos, lo cual demuestra que el incorporar el biopolímero a la fase acuosa fue apropiado. Las abreviaturas utilizadas para las microemulsiones bajo estudio se presentan en la **Tabla VI**.

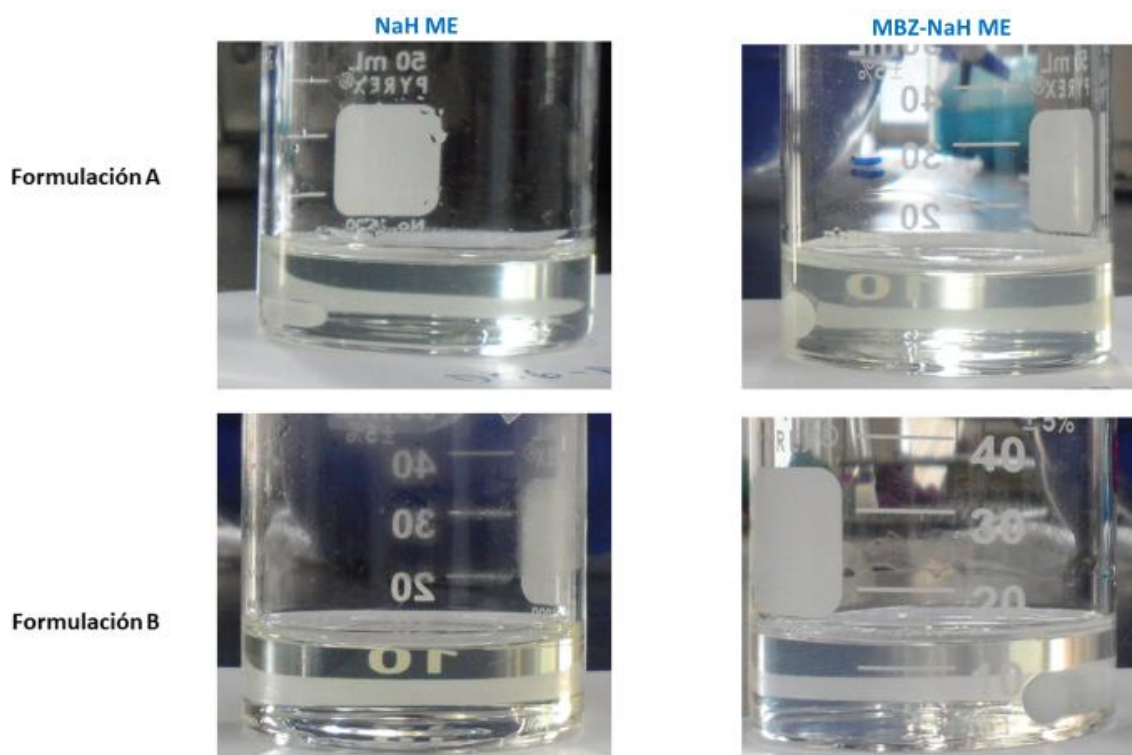
**Tabla VI. Abreviatura y descripción de las microemulsiones evaluadas.**

Término	Descripción
<b>ME</b>	Microemulsión sin hialuronato de sodio y sin mebendazol
<b>MBZ ME</b>	Microemulsión sin hialuronato de sodio y con mebendazol
<b>NaH ME</b>	Microemulsión con hialuronato de sodio y sin mebendazol
<b>MBZ-NaH ME</b>	Microemulsión con hialuronato de sodio y con mebendazol



### 7.5 Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones.

En la **Figura 35** se presenta la apariencia de las microemulsiones correspondientes a la formulación A y la formulación B. Se puede observar que las NaH ME, son líquidas, transparentes y homogéneas. Al agregar el MBZ (MBZ-NaH ME), las microemulsiones mantienen su condición líquida, observándose translúcidas. Esta condición se correlaciona con el resultado de tamaño de glóbulo.



**Figura 35.** Apariencia de las microemulsiones de la formulación A y formulación B.

En la **Tabla VII** se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica de las microemulsiones. La determinación del tamaño de glóbulo se realizó mediante la evaluación del radio hidrodinámico empleando el método de dispersión de luz dinámica. Se puede observar que, al incorporar el fármaco, el tamaño de glóbulo incrementó en ambas formulaciones, sin embargo, este fue menor a 210 nm lo cual se considera aceptable para la administración nasal.

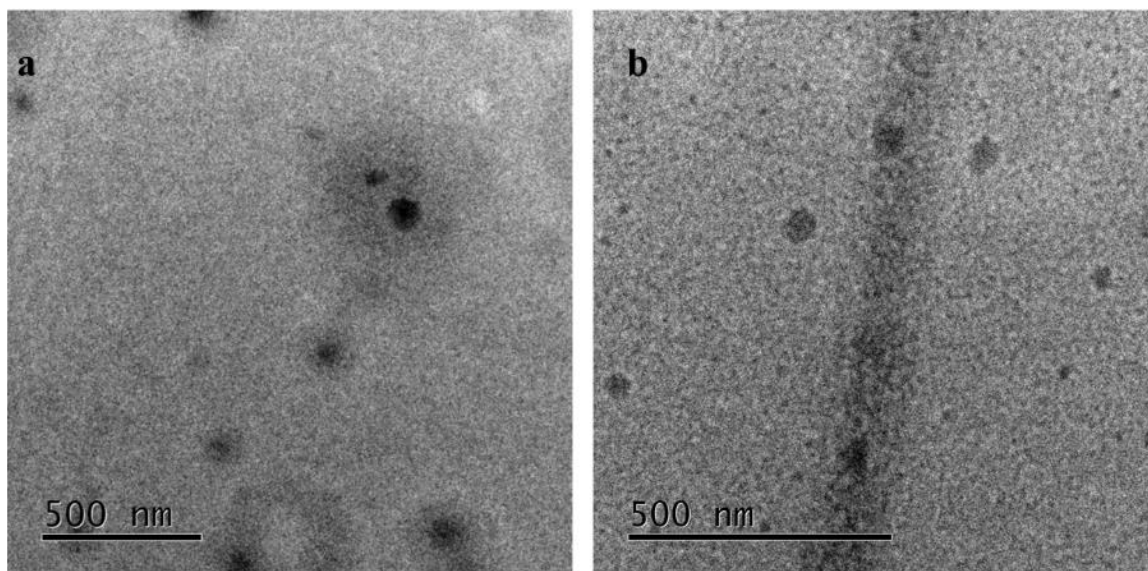
El potencial zeta en todas las formulaciones presentó una carga menor a -0.3. Este valor reducido puede atribuirse a la gran concentración de la mezcla de Smix (Patel *et al.*, 2013). El bajo valor obtenido indica que la estabilidad del sistema estaría explicada por el equilibrio termodinámico y no por la repulsión de cargas. Los valores de polidispersión obtenidos (<0.45) para ambas formulaciones, fueron adecuados para establecer una

homogeneidad en el tamaño de glóbulo (Danaei *et al.*, 2018). Por otra parte, el pH se encontró en el rango de 4.5 a 6.5, el cual es adecuado para la administración nasal (Constantino, 2007). Todas las formulaciones presentaron respuesta al determinar la conductividad, lo cual se puede estar relacionada con la formación de sistemas tipo bicontinuos o de tipo O/W, lo cual también resulta favorable para la administración nasal. La incorporación del MBZ incrementó ligeramente la conductividad en ambas formulaciones, lo cual podría atribuirse a la formación de zonas con un mayor carácter de ionización dinámico atribuido al grupo carboxilo del AO (Bennette *et al.*, 1982).

**Tabla VII. Caracterización fisicoquímica de las microemulsiones correspondientes a la formulación A y la formulación B.**

Microemulsión	MBZ (µg/mL)	Tamaño de glóbulo (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersión n	pH	Conductividad (µS)
<b>Formulación A</b>	-----	115.7	-0.378	0.576	5.03	27
	130	209.0	-0.056	0.439	5.08	31
<b>Formulación B</b>	-----	129.6	-0.203	0.432	5.38	17
	250	145.0	-0.119	0.444	5.36	20

La morfología de las microemulsiones fue determinada mediante el análisis de microscopía de transmisión electrónica (TEM). La técnica es conocida como tinción de tipo negativa; se basa en la proyección de aquellas imágenes que no permitieron el paso del haz de electrones sobre ella. En la **Figura 36** se muestran los resultados obtenidos para las formulaciones A y B. En ambos casos se observa una morfología esférica y no se detectó otra estructura durante el análisis.



**Figura 36. Morfología de la formulación A y formulación B.** Las imágenes fueron obtenidas mediante el análisis de TEM.

## 7.6 Estudio de reología.

### 7.6.1 Estudio de viscosidad de las microemulsiones.

El efecto de la viscosidad en la administración de fármacos en la cavidad nasal ha sido reportado por Shingaki *et al.*, 2016, el cual demostró que la viscosidad incrementó la velocidad de absorción y disminuyó la velocidad en el aclaramiento mucociliar. Diversas investigaciones han reportado valores de la viscosidad para diferentes tipos de fármacos que han sido formulados en microemulsiones nasales, por ejemplo: para una administración conjunta entre albendazol y curcumina reportaron un valor de 170-176 cP (Shinde *et al.*, 2015), y para donezepil, 44 cP (Espinoza *et al.*, 2018), en todas ellas no se empleó polímero. En el caso de microemulsiones de fumarato de quetiapina con chitosan, la viscosidad aumento de 17 cP a 40 cP (Shah *et al.*, 2016), mientras que para microemulsiones de carbamazepina con policarbofilo aumento de 186 a 201 cP (Patel *et al.*, 2013). Aunque se sabe que estos sistemas deben poseer un equilibrio en la viscosidad, hasta el momento, no existe un valor al que deban ajustarse las formulaciones empleadas para una administración por vía nasal.

Las curvas de flujo han sido empleadas para evaluar interacciones inter e intra-moleculares que se pueden presentar entre el medio continuo y los sistemas dispersos en ella. Además, aportan información con respecto a las estructuras de auto-ensamblaje, debido a que la baja viscosidad de las microemulsiones está asociada a sistemas con morfología esféricas y no a estructuras tipo “wormlike”, “Roadlike”, cubicas, hexagonales, o cristales líquidos, los cuales modifican la viscosidad de la microemulsión (Laurence y Ress, 2000). Por ello, es importante evaluar el comportamiento reológico de las microemulsiones.

En la **Figura 37a** y **37b** se presenta las curvas de flujo de las formulaciones A y B respectivamente, dónde se puede observar que, las microemulsiones ME y MBZ ME describieron un comportamiento atribuido a un *fluido*

*Newtoniano* (relación lineal entre deformación contra esfuerzo), además, no se observaron diferencias en la magnitud de viscosidad, lo cual podría sugerir que la incorporación del fármaco a la microemulsión no generó interacciones en la capa interfacial (Calvalho *et al.*, 2016). Por otro lado, al incorporar el NaH al 0.1% a las microemulsiones (NaH ME), la viscosidad como es de esperarse se incrementó tres veces, observándose que el comportamiento fue de un *fluido No Newtoniano*, de manera particular, pseudoplástico (el esfuerzo es alto a baja deformación y decrece al incremento de la deformación hasta alcanzar un valor asintótico).

Al incorporar el MBZ a la microemulsión correspondiente a la formulación A (**Figura 37a**), la viscosidad se incrementó significativamente, esto podría sugerir una interacción de tipo *enlace de hidrógeno* entre -NH o -OH del hialuronato de sodio, y -HC=CH-, -H del DHA con el =N-, -H de las formas tautomérica del MBZ. Estas interacciones, no son deseadas, ya que permiten pronosticar efectos no esperados en el proceso de liberación del fármaco desde la microemulsión hacia el ambiente. En la microemulsión de la formulación B, no se observaron modificaciones significativas en la viscosidad de MBZ-NaH ME con respecto a NaH ME (**Figura 37b**). Con base a los resultados de viscosidad obtenidos y considerando que la cantidad de MBZ incorporada en la formulación B fue mayor, ésta fue seleccionada para llevar a cabo los estudios de viscoelasticidad, toxicidad nasal y el estudio de eficacia.

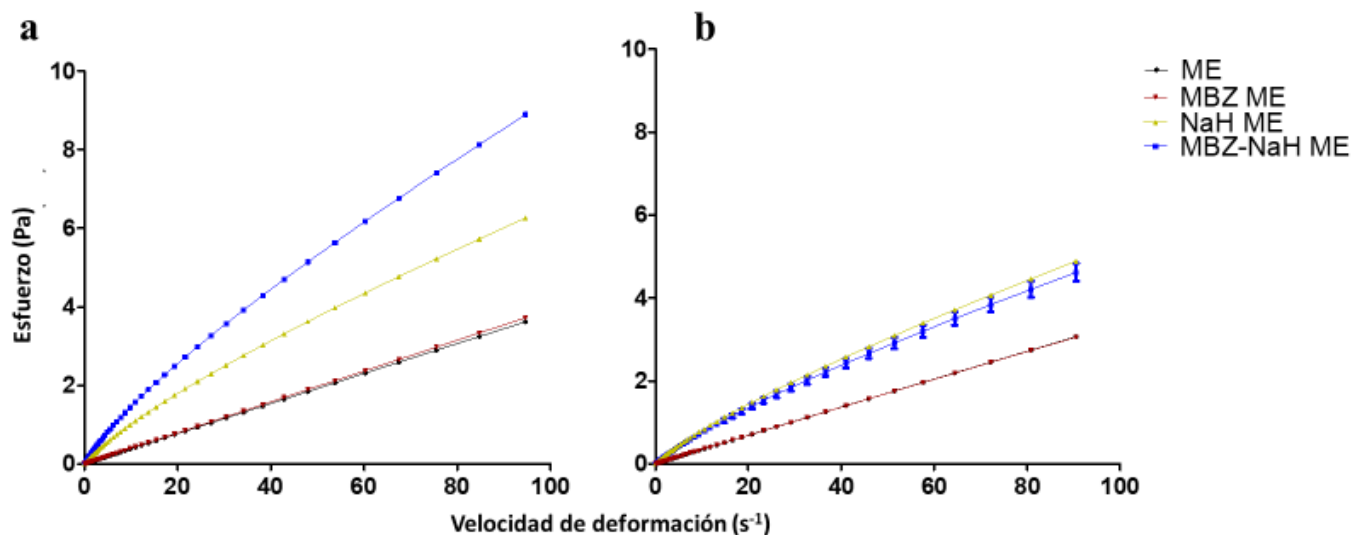


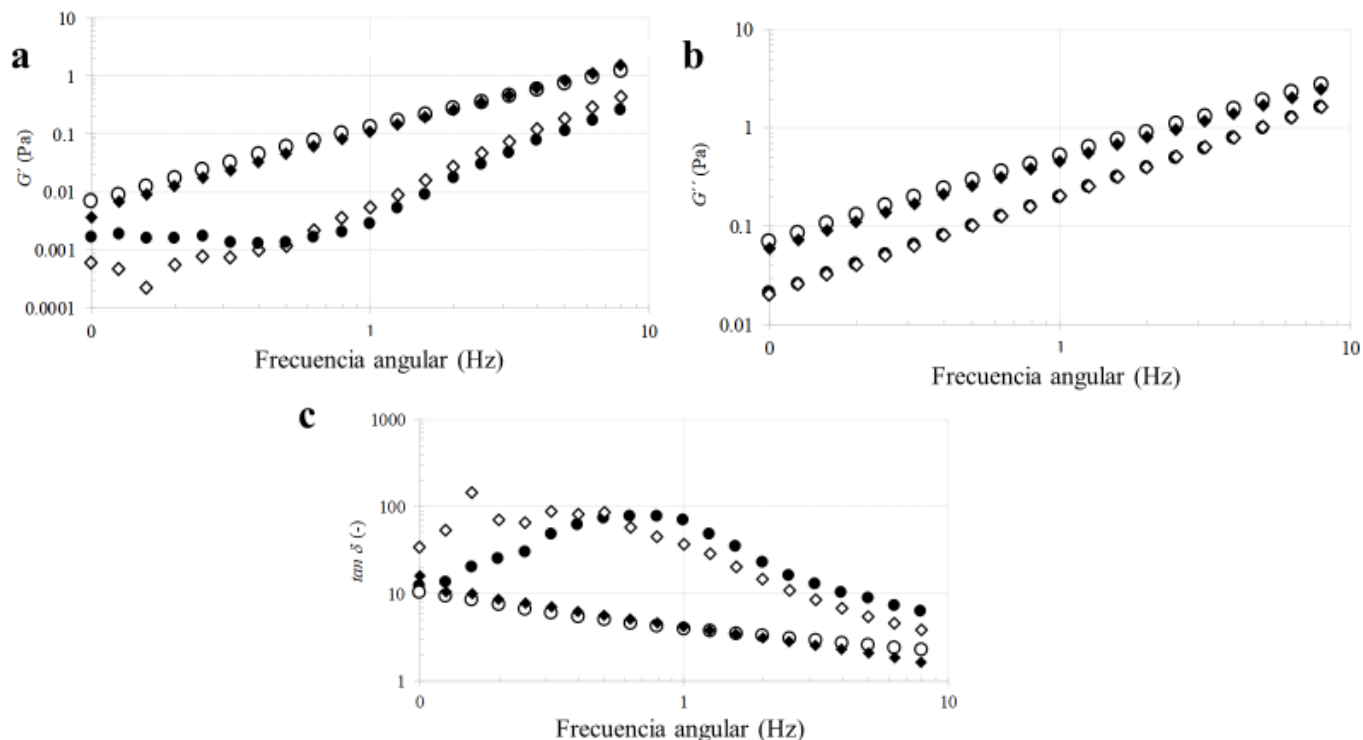
Figura 37. Graficas de flujo de las microemulsiones. a) formulación A y b) formulación B.

### 7.6.2 Estudio viscoelástico de las microemulsiones de la formulación B.

El comportamiento reológico de las microemulsiones está determinado por diversos factores, tales como, el efecto de la capa interfacial, el efecto de los polímeros en el sistema, el volumen de la fase dispersa continua, el tamaño de las partículas dispersadas, el pH, las interacciones supramoleculares de los componentes de la

formulación, y el efecto de tensoactivos (Tadros, 1994). Estas variables y su interacción pueden determinarse mediante la evaluación de la viscoelasticidad del microemulsiones (Formariz *et al.*, 2010).

El comportamiento viscoelástico de la formulación B, tanto para el módulo  $G'$  (módulo de almacenamiento o elástico) como para el módulo  $G''$  (módulo de pérdida o de viscosidad) con respecto a *la frecuencia* se presenta en las **Figuras 38a y 38b** respectivamente. En ambos casos, se observa un incremento en la respuesta en el intervalo de *frecuencia angular* evaluado, esto podría estar asociado a la formación de un enlace tipo *punte de hidrogeno* entre el NaH y el agua, generando una red dinámica con lo cual se incrementa la rigidez del sistema. Este comportamiento indica que la estructura interna de las formulaciones que contienen NaH se mantiene ante la energía de deformación ejercida (Zhao *et al.*, 2016). También se observa que el comportamiento  $G'$  es ligeramente mayor que el  $G''$ , lo cual indica una mayor tendencia a propiedades elásticas del material. Por otra parte, el análisis de factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) (**Figura 38c**), que se refiere a la relación de los módulos de *pérdida* y *almacenamiento*, reveló un comportamiento viscoso a frecuencias bajas, mientras que a frecuencias altas las microemulsiones con NaH presentan un comportamiento elástico, este comportamiento podría estar atribuido a la formación de enlaces de hidrógeno del grupo carboxilo del hialuronato. Estos datos indican que la microemulsión es adecuada para la administración nasal debido a que, la frecuencia o energía atribuida al movimiento mucociliar, generaría un comportamiento de carácter sólido, es decir, se favorecería su permanencia en la cavidad nasal. Además, los grupos carboxilo del NaH, podrían interactuar con los iones calcio de la membrana nasal, lo cual generaría una mayor permanencia de las microemulsiones en la cavidad nasal y favorecería la exposición de esta membrana con el fármaco (Murgia *et al.*, 2018).

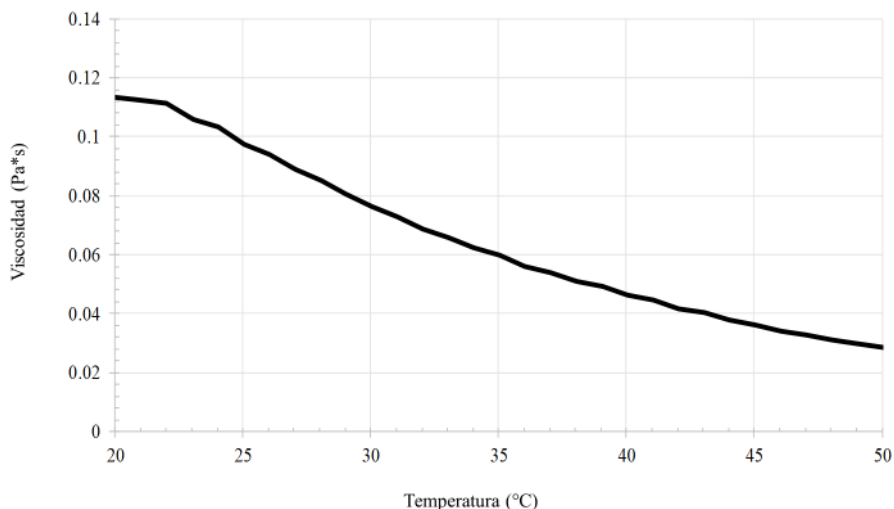


**Figura 38. Estudio viscoelástico de las microemulsiones.** a) Modulo de almacenamiento,  $G'$ , b) módulo de pérdida  $G''$  y c) relación  $G'/G''$  ( $\tan \delta$ ). ME (●), MBZ ME (◇), NaH ME (○) y MBZ-NaH ME (◆) ( $n=3$ ,  $\pm$ desviación estándar).

### 7.6.3 Evaluación de la viscosidad de la formulación B con respecto a la temperatura.

Si bien las microemulsiones por definición poseen una estabilidad termodinámica, su propia naturaleza constitutiva, que implica dos fases inmiscibles, las vuelve altamente sensibles a factores externos que pueden alterar el equilibrio del sistema, siendo la temperatura uno de los factores más importantes. Para determinar el impacto de esta variable sobre la microemulsión se realizó la evaluación del cambio de la viscosidad con respecto a la temperatura. Los resultados se presentan en la **Figura 39**. Se puede observar que la viscosidad decae con respecto a la temperatura, un efecto esperado, sin embargo, no presenta cambios abruptos sobre el intervalo evaluado, por lo tanto, se descartan efectos asociados a la inversión de fases o inestabilidad de la formulación (MBZ-NaH ME) durante el intervalo de 20 a 50°C.

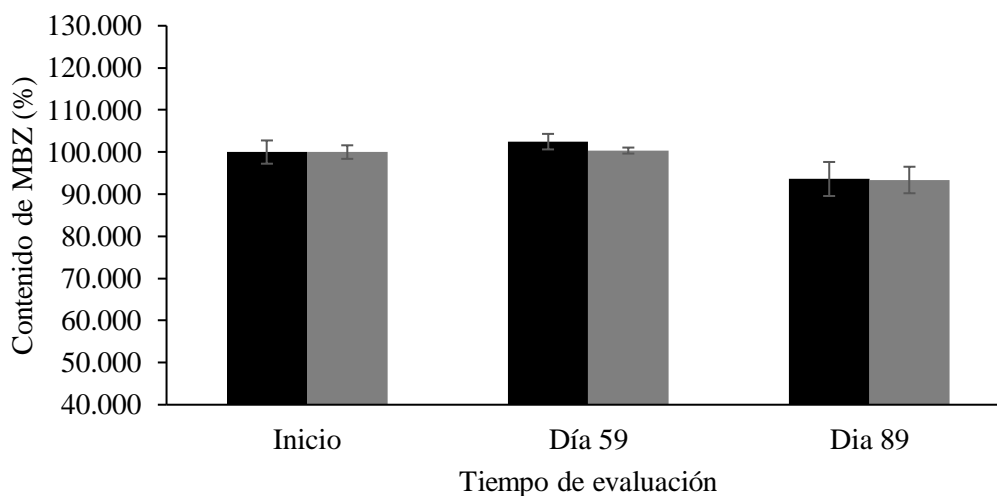




**Figura 39. Efecto de la viscosidad vs temperatura para la microemulsión MBZ-ME-NaH de la formulación B (n=3,  $\pm$ desviación estándar).**

### 7.7 Estabilidad de la formulación B a temperatura ambiente

En la **Figura 40** se muestra el porcentaje de MBZ a los diferentes tiempos de muestreo. Se puede observar que a los tres meses, el contenido fue mayor a 93%. La adición de NaH a la formulación no modificó los resultados, lo que indica que la formulación B (MBZ-NaH ME) podría conservarse a temperatura ambiente durante al menos los tres primeros meses después de su preparación.



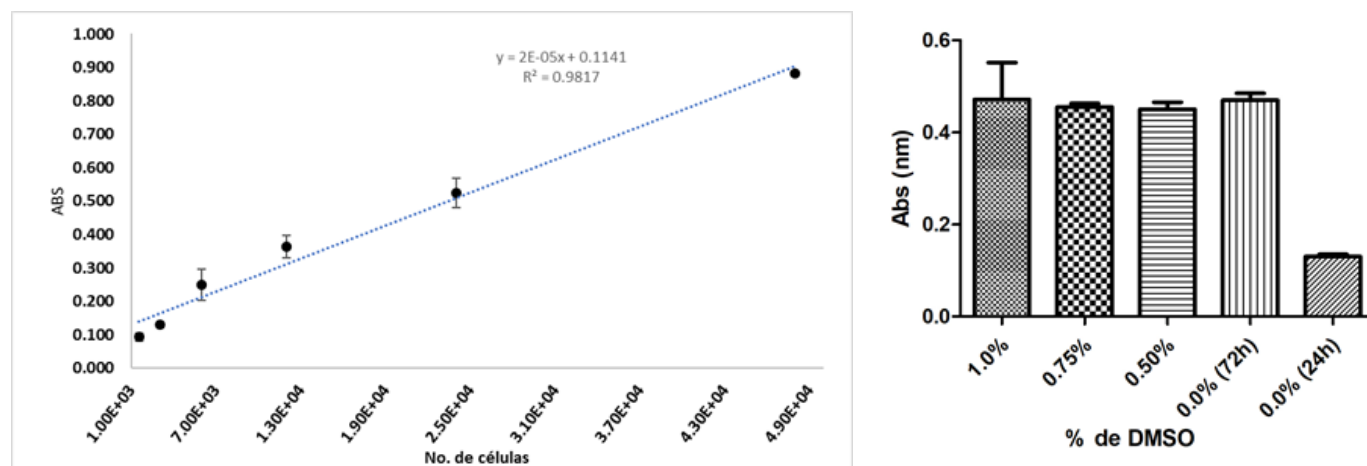
**Figura 40. Estabilidad de la microemulsión de la formulación B. Barra negra: MBZ-NaH ME, barra gris: NaH ME (n=3,  $\pm$ desviación estándar).**



## 7.8 Determinación de la $CI_{50}$ del MBZ.

### 7.8.1 Condiciones de evaluación

En la **Figura 41a** se observa la relación directa entre el crecimiento celular y la respuesta después de sembrar diferentes cantidades de células durante 24 h. Considerando que esta línea celular se reproduce rápidamente, para el estudio se utilizaron 3000 células, con lo que se obtuvieron resultados reproducibles. En la **Figura 42b** se presenta el efecto de diferentes concentraciones de DMSO en la respuesta a 72 horas de exposición. En ella se puede observar que no existen diferencias en la respuesta al utilizar las diferentes concentraciones, por lo que para solubilizar el MBZ se eligió el DMSO al 0.75%.



**Figura 41. Condiciones para determinar la  $IC_{50}$  del MBZ.** a) curva de crecimiento celular vs respuesta analítica b) determinación del efecto de la concentración de DMSO sobre el crecimiento celular.

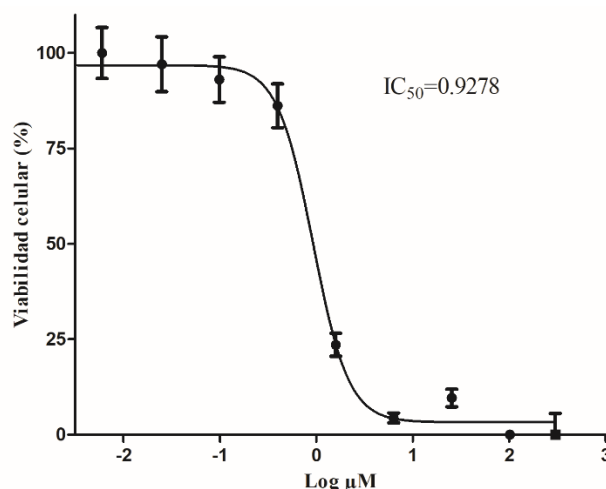
### 7.8.2 Determinación de la $CI_{50}$ del mebendazol sobre la línea C6.

En la **Figura 42** se presenta la curva de viabilidad celular en función de la concentración. El valor de  $CI_{50}$ , fue de  $0.92 \mu\text{M}$ . Este es el primer estudio que reporta el valor en la línea C6. Los valores encontrados en el presente estudio fueron más altos a los previamente reportados en la línea de glioma de ratón (GL261) ( $0.24 \mu\text{M}$ ) y en la línea de glioblastoma de humano (060919) ( $0.11 \mu\text{M}$ ) (Bai et al 2015), lo cual podría explicarse por las diferencias en las líneas celulares, ya que la línea C6 está catalogada como la más resistente y agresiva.

Al revisar la literatura se encontró que los valores de  $CI_{50}$  de carmustina y temozolomida (ampliamente utilizados en glioblastoma) empleando la línea C6 fueron:  $9.8 \mu\text{M}$  y de  $560 \mu\text{M}$  (Soma et al., 1995, Huang et al., 2008). El valor de  $CI_{50}$  obtenido en el presente estudio para MBZ fue mucho menor, lo que indica que el MBZ es el más potente de los 3.

En el presente trabajo no fue posible determinar la  $CI_{50}$  del MBZ en la microemulsión, debido a que al diluirla con el cultivo celular se presentó una separación de las fases. Aún cuando el acceso de los fármacos al SNC por administración nasal, se favorece con el uso de microemulsiones, se ha reportado que los glóbulos de las

microemulsiones no acceden íntegramente al cerebro e (Ahmad *et al.*, 2017), por lo que se consideró que el valor de  $CI_{50}$  obtenido es confiable para documentar la potencia de MBZ en esta línea celular.

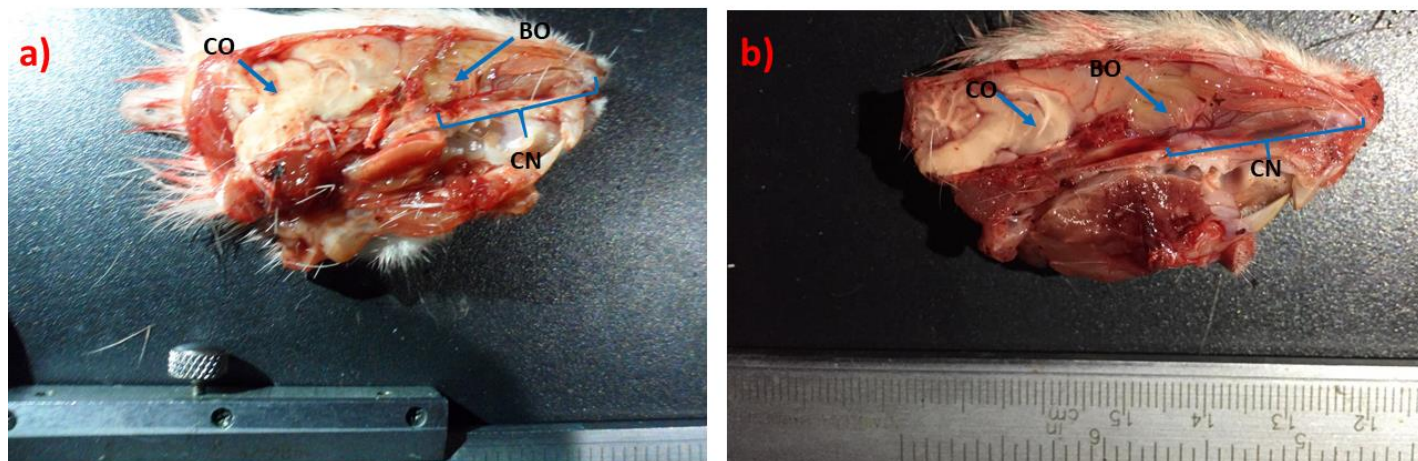


**Figura 42. Curva de inhibición de la viabilidad celular vs concentración del MBZ empleando la línea C6.** Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### 7.9 Evaluación *in vivo* de la toxicidad nasal.

El reposicionamiento de MBZ como un fármaco anticanceroso presenta diferentes ventajas, dado a que su farmacología, su perfil de seguridad y la carcinogenicidad son ampliamente conocidos, sin embargo, el efecto de MBZ sobre el epitelio nasal en presentación microemulsión no ha sido evaluado hasta la fecha y se consideró importante evaluar la toxicidad nasal de la microemulsión para su empleo por esta vía de administración.

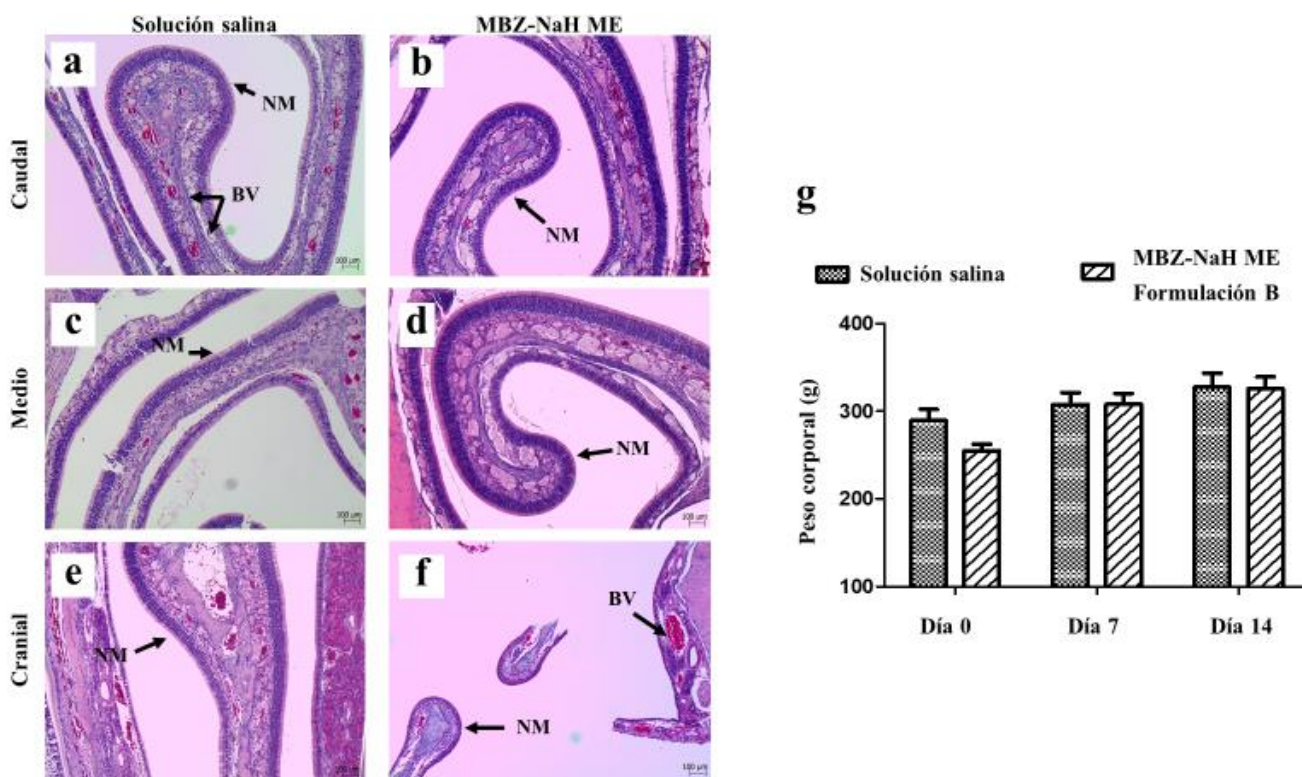
En la **Figura 43** se presenta las imágenes relacionadas a la evaluación macroscópica de la cavidad nasal y cerebro de las ratas inmediatamente tomadas después de ser sacrificadas. Se encontró que, después de la administración de formulación B durante 14 días, no se presentó necrosis, enrojecimiento, alteraciones de color en el tejido o procesos de inflamación.



**Figura 43.** Evaluación macro del estudio de toxicidad nasal para a) control negativo y b) formulación B. CO: cerebro, BO: bulbo olfatorio y CN: cavidad nasal.

Los resultados de microscopía tanto del control negativo, como de la formulación B (MBZ-NaH ME) se presentan en la **Figura 44a-f**. En ellas se aprecia que no existe daño en el área de los vasos sanguíneos. Aún cuando las imágenes muestran que, en algunas zonas, la membrana nasal se ve ligeramente erosionada (**Figura 44f**) no se observaron eventos histopatológicos, tales como desprendimiento de las capas del tejido, infiltración celular, presencia leucocitaria, necrosis del tejido o hemorragias.

Los cambios en el peso corporal han sido empleados como manifestación del estado de salud o daño de los animales (Teo *et al*, 2002) los cuales podrían estar asociados a trastornos metabólicos de los carbohidratos, proteínas o lípidos (Ezeonwumelu *et al.*, 2011). **En la Figura 44g** se presentan los resultados del peso corporal durante los 14 días del estudio. Se puede observar que tanto el grupo control, como el grupo de la formulación B, presentaron un aumento normal de peso corporal y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. De igual forma no se encontró caída de pelo, convulsiones, hemorragias, disminución en el consumo de alimento, diarreas o cambio en el comportamiento; lo cual indica que la administración nasal de MBZ durante en la formulación B (MBZ-NaH ME), fue segura y apropiada.



**Figura 44. Evaluación de la toxicidad nasal.** a-f) microfotografías del epitelio nasal obtenido en tres regiones después de la administración de solución salina y la formulación B (MBZ-NaH ME). g) monitoreo del peso corporal de las ratas durante el estudio. NM: membrana nasal, BV: vaso sanguíneo.

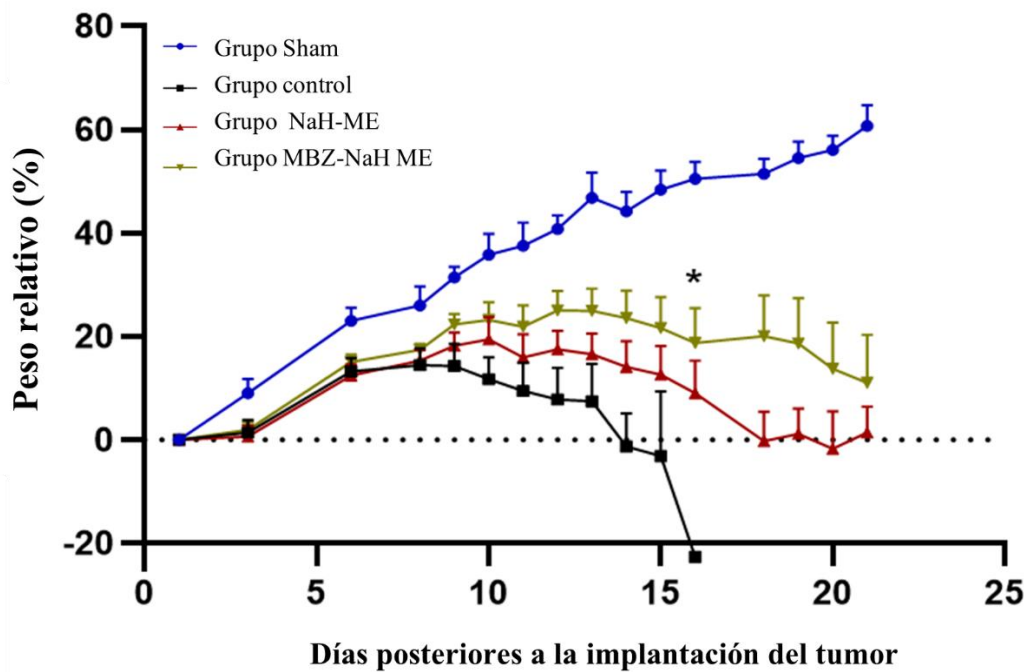
### 7.10 Estudio *in vivo* de la eficacia de las microemulsiones de MBZ en un modelo murino ortotópico de glioblastoma.

El modelo murino, C6, ha sido ampliamente utilizado para evaluar la eficacia de diversos tratamientos (Le *et al.*, 2018, Linsenman *et al.*, 2019). El empleo de este modelo ofrece diversas ventajas que se han observado en el glioblastoma humano, tales como, un índice mitótico alto, generación focalizada de necrosis, invasión del parénquima, desarrollo de angiogénesis y un perfil global transcriptómico (Gieryng *et al.*, 2017, Grobber *et al.*, 2002).

En la **Figura 45** se presenta el seguimiento del peso corporal de las ratas después de la inoculación de la línea celular C6 (glioma de rata) y del grupo sham. Se puede observar que todos los grupos incrementaron su peso hasta los 7 días. Después, el peso corporal de las ratas inoculadas, fue menor con respecto al grupo *sham*, lo cual se atribuye al desarrollo del tumor cerebral (Teo *et al.*, 2002, El *et al.*, 2004). Se puede observar también que, a los días posteriores, el peso corporal del *grupo control* (grupo sin tratamiento) decae drásticamente hasta disminuir más allá de la línea basal. Por otra parte, en el grupo al que se le administró la microemulsión de mebendazol (MBZ-NaH ME) también presentó un decaimiento del peso corporal, sin embargo, este no fue



drástico como en el caso del grupo control. Con respecto al vehículo de la microemulsión (NaH ME), se observó también un decaimiento ligeramente menor que el grupo de mebendazol.



**Figura 45. Peso relativo de las ratas después de la implantación del tumor cuando se administró intranasalmente la microemulsión conteniendo MBZ. \* diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ME-MBZ vs grupo sin tratamiento. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE ( $n=6$ ).**

En la **Figura 46** se presenta el gráfico Kaplan-Meier obtenido después de la implantación del tumor en los diferentes grupos. Se puede observar que el grupo MBZ-NaH ME aumentó casi el doble la supervivencia media (30 días) con respecto al grupo control (16 días), además el 10% del grupo MBZ-NaH ME logró extender la supervivencia hasta 50 días. Bai *et al.*, 2015 demostró un incremento en la supervivencia media (48.5 días) con respecto al control (29.5 días) después de la administración de una dosis de 50 mg/kg del polimorfo C de mebendazol, durante 7 días por vía oral. Existen algunos estudios tanto preclínicos como clínicos (Bai *et al.*, 2015, Bryceson *et al.*, 1982), han demostrado el paso del mebendazol al SNC, sin embargo, las concentraciones del fármaco en el líquido cefalorraquídeo han sido menores que en el plasma, por lo que se ha sugerido incrementar la dosis administrada por vía oral (Bai *et al.*, 2012). Se ha reportado también que al emplear dosis alta de MBZ por vía oral durante períodos prolongados, se puede presentar daño hepático, alopecia y aplasia medular. (Colle *et al.*, 1999, Fernandez *et al.*, 1986, Livertox, 2012). Los resultados del presente estudio indican que la administración nasal de la materia prima de MBZ en microemulsión a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$

fue eficaz, además, demuestran que la vía nasal representaría una ventaja para el uso de MBZ para el tratamiento del GBM.

Resulta relevante que al administrar la microemulsión sin MBZ (NaH ME), el tiempo de supervivencia también fue mayor, lo cual podría atribuirse al AO presente en la formulación. Natali *et al* llevaron a cabo un estudio *in vitro* en el cual demostraron que el AO presentó un efecto antiproliferativo sobre la línea celular C6, lo cual se atribuyó a que el OA inhibió de la actividad de la acetil coenzima A carboxilasa y de la 3 hidroxil 3 metilglutaril coa reductasa. También, se ha reportado que el AO puede activar la apoptosis mediante la desfosforilación de las proteínas pro-apoptóticas BAD en la línea celular SH-SY5Y (Zhu *et al.*, 2005) y actualmente, se ha reportado la relevancia que tiene la interrupción por parte del AO de la vía metabólica para la captación del colesterol en las células tumorales del GBM (Pirmoradi *et al.*, 2019, Patel *et al.*, 2019, Ahmad *et al.*, 2019).

Lo anterior sugiere que la formulación B desarrollada podría potencializar la actividad antitumoral del MBZ en el tratamiento del GBM.

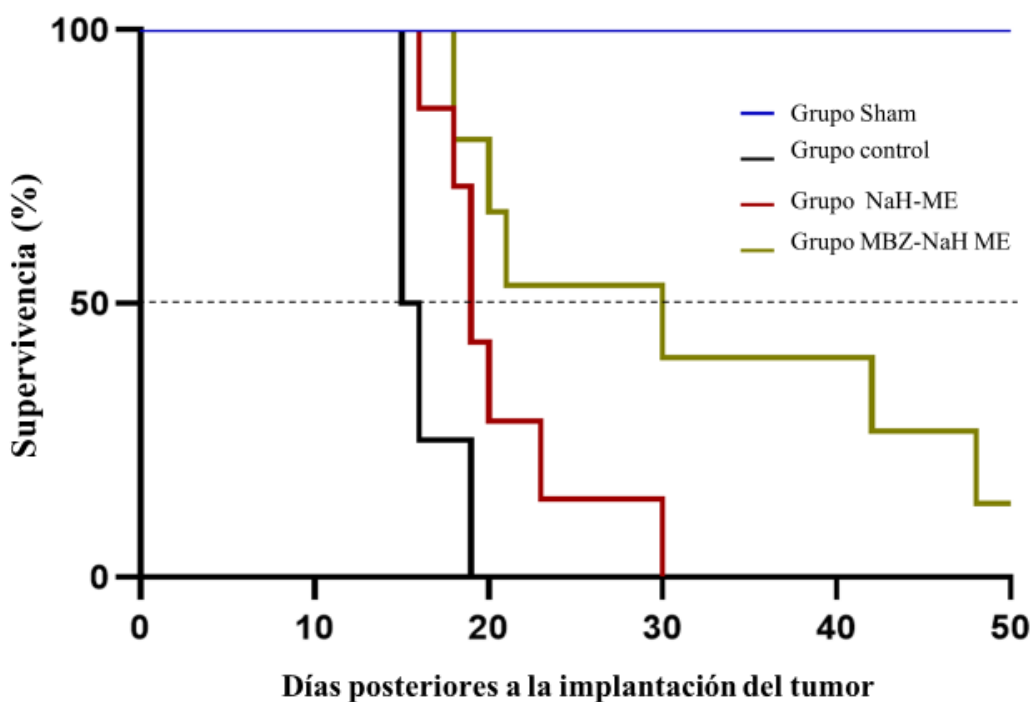


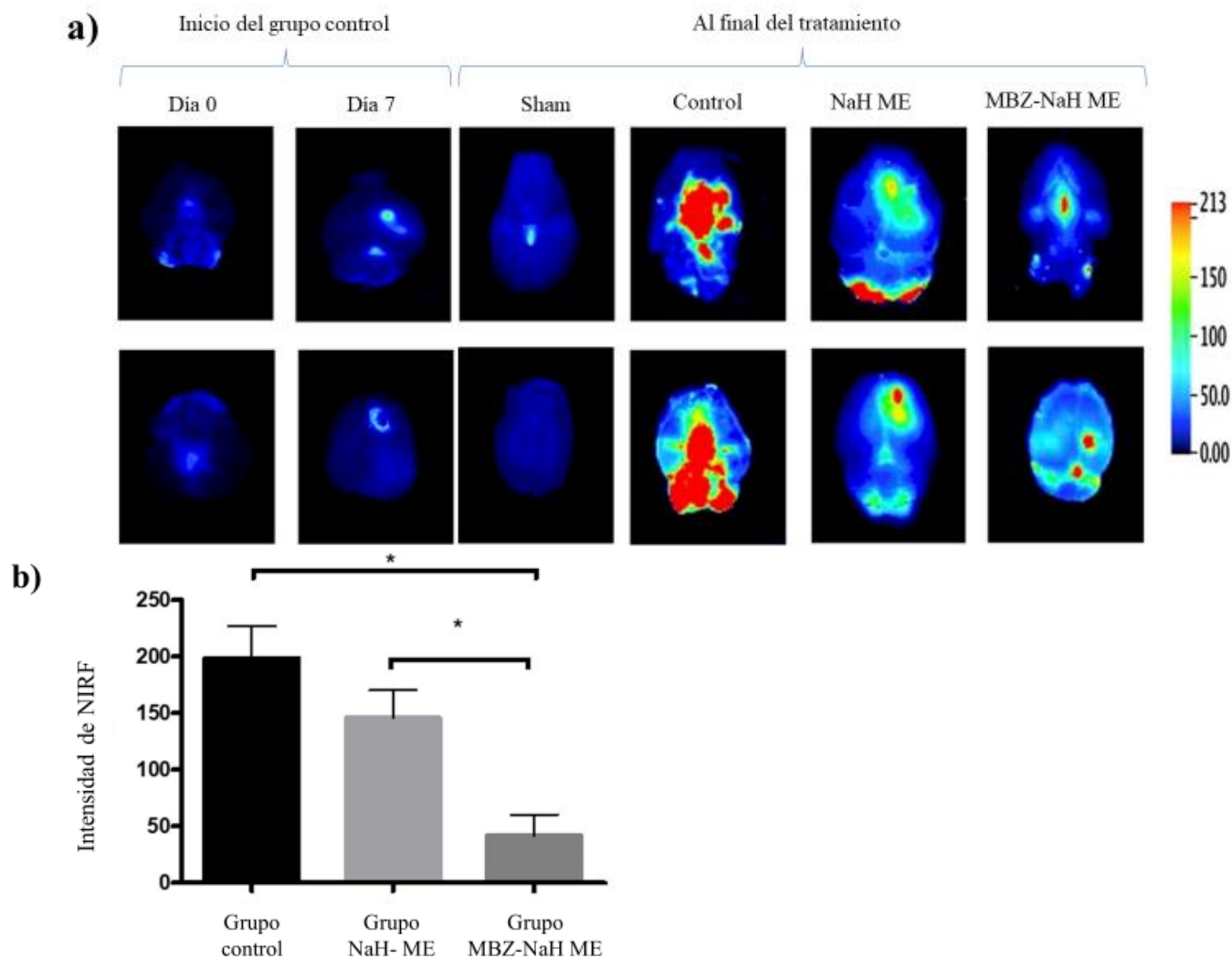
Figura 46. Estudio de supervivencia en el modelo ortotópico murino de glioma después de la administración intranasal del MBZ en la microemulsión. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE (n=6).

#### 7.10.1 Estudio *ex vivo* de intensidad de fluorescencia.

El monitoreo del crecimiento del tumor cerebral en el modelo ortotópico, se realizó mediante un estudio *ex vivo* midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por el compuesto de tinción IRDye 800CW-RGD que

fue captado por el tumor. El compuesto IRDye 800CW-RGD posee la fracción -RGD, la cual, es una secuencia de tres péptidos (Arg-Gly-Asp) que se une de forma selectiva a las integrinas, específicamente a la integrina  $\alpha_5\beta_3$ . Estas proteínas están relacionadas a la comunicación e integración celular y se ven sobre expresadas en las células de glioma, además, se ha visto su participación en diversos procesos tales como, el crecimiento y la invasión tumoral, en la metástasis y en la angiogénesis. La capacidad de emitir fluorescencia del compuesto IRDye 800CW-RGD ha sido empleada para evaluaciones de imagen en los tumores malignos (Chen *et al.*, 2004), de esta manera, se puede establecer de forma indirecta el crecimiento tumoral en el modelo ortotópico de glioma C6 de rata. La fluorescencia emitida *ex vivo* en los cerebros de los diferentes grupos evaluados se puede observar en la **Figura 47a**. El panel corresponde a dos ratas por grupo. En ella, se puede observar una intensidad casi imperceptible, tanto en el *grupo sham* (ratas sin inoculación de células), como en el *grupo control* (ratas con inoculación de células y sin tratamiento). Posteriormente al día 7, la intensidad se incrementó ligeramente en el grupo control, lo cual se atribuyó al crecimiento tumoral. Fue en este momento que se inició la administración del mebendazol en el grupo MBZ-NaH ME, se puede observar que al final de la administración la intensidad de NIRF fue considerablemente menor con respecto al grupo control, además, se aprecia que la señal está focalizada. El vehículo (NaH ME), mostró también una reducción, aunque es de menor intensidad con respecto al grupo MBZ-NaH ME. El *grupo sham*, presentó una imperceptible fluorescencia, con lo cual, se elimina cualquier evento asociado a una tumorigenesis durante la evaluación. El análisis cuantitativo reveló una diferencia significativa de la fluorescencia emitida entre el *grupo control* y el grupo *MBZ-NaH ME* (**Figura 47b**).



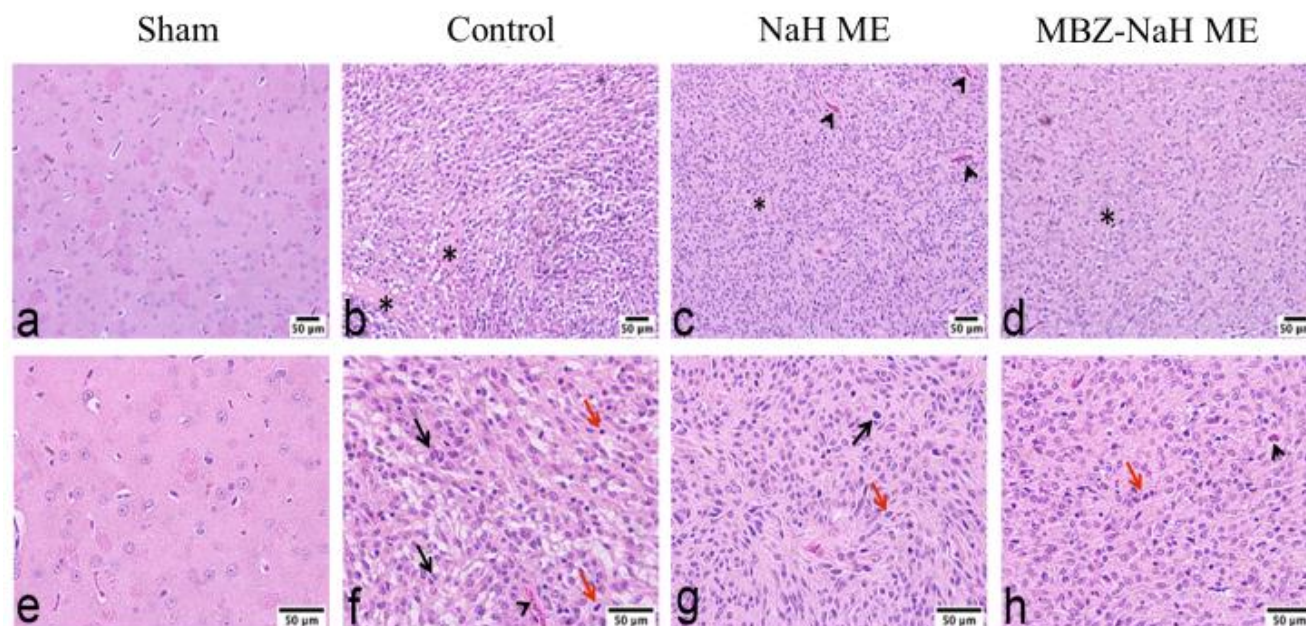


**Figura 47. Estudio ex vivo de imagen NIRF** **a)** se muestra la captación tumoral de IRDye 800CW RGD en los distintos grupos y en dos momentos diferentes: Grupo Sham (sin células de glioma ni tratamiento); el día 0 de la implantación de células de glioma; el día 7 después de la implantación; el grupo control (con implantación de células de glioma y en ausencia de tratamiento); las ratas de grupo NaH ME (administración del vehículo de formulación B); y los animales del grupo MBZ-NaH ME (que recibieron la formulación B cargada con MBZ durante 14 días) **b)** Análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia relativa de IRDye 800CW RGD en tumores de los grupos control, ME NaH y MBZ-NaH ME. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de tres animales. \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

### 7.10.2 Evaluación histopatológica del tejido cerebral.

La evaluación histológica del tejido tumoral reveló en el *grupo control* y el *grupo NaH ME*, características asociadas a la malignidad, tales como forma y tamaño celular (pleomorfismo), se observó también un incremento en la población celular (hipercelularidad), así como también la actividad mitótica y necrosis. Ninguna de estas características se observaron en el *grupo sham*. Al analizar la histología del grupo MBZ-NaH ME, se encontró que estas características fueron muy reducidas. Estos resultados sugieren que la administración del mebendazol contenido en la microemulsión (MBZ-NaH ME) disminuye la malignidad del glioblastoma en el tejido cerebral. Para corroborar el efecto antitumoral del tratamiento sería importante

evaluar la proliferación celular y la vasculatura presente en el microambiente tumoral empleando marcadores, tal como KI67.



**Figura 48. Evaluación histológica mediante el método H&E, del tejido cerebral de los diferentes grupos después de la administración.** Se muestran los eventos de mitosis (flecha negra), necrosis (asterisco), pleomorfismo nuclear (flecha roja) y la vasculatura (puntas negras). A-d magnificación de 20X, e-h, aumento de 40X. escala de la barra de 50 µm

## VIII CONCLUSIONES

- I) Se determinó la identidad polimórfica de las materias primas de mebendazol con los análisis propuestos de FTIR, DSC y DRXP.
- II) Se desarrollaron 2 microemulsiones: formulación A conteniendo 9% de ácido oleico / ácido docosahexaenoico (3:1), 51% de la combinación de Tween 80 / Transcutol / etanol (1:1:1) y 40% agua y formulación B con 10% de ácido oleico / Labrafil M 2125, 51% de la combinación de Tween 80 / Transcutol / etanol (1:2:1) y 39% de agua, conteniendo 150 y 260  $\mu\text{g/mL}$  de mebendazol respectivamente. Los resultados de tamaño de glóbulo, polidispersión, potencial zeta, viscosidad y pH mostraron que las formulaciones presentaron características adecuadas para su administración intranasal.
- III) La formulación A presentó interacciones intermoleculares en los estudios de flujo, además la cantidad que permitió solubilizar de mebendazol fue menor con respecto a la formulación B, y por lo tanto fue descartada para la evaluación de la toxicidad nasal y de la eficacia.
- IV) El estudio de toxicidad nasal indicó que la formulación B no mostró daño en los tejidos nasales cuando se determinó la reevaluación histológica y macroscópica después de su administración por vía intranasal durante 14 días continuos.
- V) La concentración inhibitoria del mebendazol en la línea celular C6 fue de 0.92  $\mu\text{M}$ .
- VI) El grupo en el modelo murino ortotópico de glioblastoma tratado con mebendazol presentó un incremento de dos veces la media de la supervivencia con respecto al control cuando se administró por vía intranasal de la formulación B.
- VII) Los datos en el análisis de NIRF indicaron una reducción del tumor y el análisis de histología del tejido cerebral reveló una reducción de las características de malignidad.

## *IX PERSPECTIVAS*

Realizar el estudio de biodisponibilidad de las microemulsión desarrollada tanto por la vía nasal como la vía oral para establecer su capacidad de evasión de la barrera hematoencefálica en el tratamiento del glioblastoma.

## X REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25.
- Aday, S., Cecchelli, R., Hallier-Vanuxeem, D., Dehouck, M. P., Ferreira, L. (2016). Stem cell-based human blood-brain barrier models for drug discovery and delivery. *Trends in Biotechnology*, 34(5), 382–393.
- Agatonovic-Kustrin, S., Glass, B. D., Mangan, M., Smithson, J. (2008). Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 361(1-2), 245–250.
- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 25–41.
- Aguirre-Cruz, L., Rangel-López, E., Cruz-Aguilera, D. L., Rodríguez-Pérez, C. E., Ruano, L., Velásquez-Pérez, L., Martínez-Moreno, M., Garduño-Espinosa, J., Sotelo, J. (2016). Historical distribution of central nervous system tumors in the Mexican National Institute of Neurology and Neurosurgery. *Salud Pública de México*, 58(2), 171–178.
- Ahmad, E., Feng, Y., Qi, J., Fan, W., Ma, Y., He, H., Xia, F., Dong, X., Zhao, W., Lu, Y., y Wu, W. (2017). Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles. *Nanoscale*, 9(3), 1174–1183.
- Ahmad, F., Sun, Q., Patel, D., Stommel, J. M. (2019). Cholesterol Metabolism: A potential therapeutic target in glioblastoma. *Cancers*, 11(2), 146.
- Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10), 863–875.
- Awad, A. W., Karsy, M., Sanai, N., Spetzler, R., Zhang, Y., Xu, Y., Mahan, M. A. (2017). Impact of removed tumor volume and location on patient outcome in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 135(1), 161–171.
- Bai, R. Y., Staedtke, V., Rudin, C. M., Bunz, F., Riggins, G. J. (2015). Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro-Oncology*, 17(4), 545–554.
- Bai, R.Y., Staedtke, V., Aprhys, C.M., Gallia, G.L., Riggins, G.J. (2011). Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 13, 974–982.
- Balin, B. J., Broadwell, R. D., Salzman, M., el-Kalliny, M. (1986). Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 251(2), 260–280.
- Behl, C. R., Romeo, V. D., de Meireles, J., Sileno, A. P., Pimplaskar, H. K., (1998). Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1-2), 89–116.
- Bennett K.E., Hatfield J.C., Davis H.T., Macosko C.W., Scriven L.E. (1982) Viscosity and conductivity of microemulsions. In: Robb I.D. (eds) *Microemulsions*. 65–84. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0955-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0955-1_5).
- Blom, K., Senkowski, W., Jarvius, M., Berglund, M., Rubin, J., Lenhammar, L., Parrow, V., Andersson, C., Loskog, A., Fryknäs, M., Nygren, P., Larsson, R. (2017). The anticancer effect of mebendazole may be due to M1

monocyte/macrophage activation via ERK1/2 and TLR8-dependent inflammasome activation. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 39(4), 199–210.

Bourganis, V., Kammona, O., Alexopoulos, A., Kiparissides, C. (2018). Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, 337–362.

Brits, M., Liebenberg, W., de Villiers, M. M. (2010). Characterization of polymorph transformations that decrease the stability of tablets containing the WHO essential drug mebendazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(3), 1138–1151.

Bryceson, A. D., Woestenborghs, R., Michiels, M., van den Bossche, H. (1982). Bioavailability and tolerability of mebendazole in patients with inoperable hydatid disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 563–564.

Bruinsmann, F. A., Richter Vaz, G., de Cristo Soares Alves, A., Aguirre, T., Raffin Pohlmann, A., Stanisçuaski Guterres, S., Sonvico, F. (2019). Nasal drug delivery of anticancer drugs for the treatment of glioblastoma: preclinical and clinical Trials. *Molecules*, 24(23), 4312.

Callender, S. P., Mathews, J. A., Kobernyk, K., Wettig, S. D. (2017). Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 526(1-2), 425–442.

Calvo, N. L., Kaufman, T. S., Maggio, R. M. (2016). Mebendazole crystal forms in tablet formulations. An ATR-FTIR/chemometrics approach to polymorph assignment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 122, 157–165.

Carvalho, A. L., Silva, J. A., Lira, A. A., Conceição, T. M., Nunes, R., de Albuquerque Junior, R. L., Sarmiento, V. H., Leal, L. B., de Santana, D. P. (2016). Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), 2188–2193.

Castillo, J. A., Palomo-Canales, J., Garcia, J. J., Lastres, J. L., Bolas, F., Torrado, J. J. (1999). Preparation and characterization of albendazole beta-cyclodextrin complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(12), 1241–1248.

Celis, MA., Alegría, M.A., González, A.A., Martínez, J.T., Green, D.R., Reyes, G.S., Arellano, A.R., Flores, J.M., Moreno, S.J, Poitevin, M.A., Cacho, B.D., Olvera, E.M., Díaz, V, Aguilar, E.C., (2015). Primer consenso mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). Grupo Interdisciplinario Mexicano de Investigación en Neurooncología (GIMINO). *Gaceta Médica de México*, 151(3):403-415.

Chen, X., Conti, P. S., Moats, R. A. (2004). In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in brain tumor xenografts. *Cancer Research*, 64(21), 8009–8014.

Chen, J.M., Wang, Z.Z, Wu, C.B., Lia, S., Lu, T.B (2012). Crystal engineering approach to improve the solubility of mebendazole. *CrystEngComm*, 14, 6221-6229.

Cohen, M. H., Johnson, J. R., Pazdur, R. (2005). Food and drug administration drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*, 11(19 Pt 1), 6767–6771.

Colle, I., Naegels, S., Hoorens, A., Hautekeete, M. (1999). Granulomatous hepatitis due to mebendazole. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 28(1), 44–45.

Constantinides P. P. (1995). Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical Research*, 12(11), 1561–1572.



- Costantino, H. R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P. H., Quay, S. C. (2007). Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1-2), 1–24.
- Crawford, L., Rosch, J., Putnam, D. (2016). Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood-brain barrier to the central nervous system. *Journal of Controlled Release*, 240, 251–266.
- Crone, C., Olesen, S. P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Research*, 241(1), 49–55.
- Crowe, T. P., Greenlee, M., Kanthasamy, A. G., Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44–52.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Danielsson, I., Lindman, B. (1981). The definition of a microemulsion. *Colloids and Surfaces*, 3, 391–392.
- Dayan A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86(2-3), 141–159.
- de la Torre-Iglesias, P. M., García-Rodríguez, J. J., Torrado, G., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., Bolás-Fernández, F. (2014). Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose. *Drug Design Development and Therapy*, 8, 1467–1479.
- de Paula, K., Camí, G. E., Brusau, E. V., Narda, G. E., Ellena, J. (2013). Mebendazole mesylate monohydrate: a new route to improve the solubility of mebendazole polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(10), 3528–3538.
- de Vries, N. A., Beijnen, J. H., Boogerd, W., van Tellingen, O. (2006). Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 6(8), 1199–1209.
- De Witt, M.; Gamble, A.; Hanson, D.; Markowitz, D.; Powell, C.; Symons, M.; Atlas, M.; Boockvar, J.; Ruggieri, R.; Symons, M. (2017). Repurposing mebendazole as a replacement for vincristine for the treatment of brain tumors. *Molecular Medicine*, 23, 50–56.
- Diaz, R. J., Ali, S., Qadir, M. G., De La Fuente, M. I., Ivan, M. E., Komotar, R. J. (2017). The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 133(3), 455–467.
- Djupesland, P. G. (2013). Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective-a review. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(1), 42–62.
- Djupesland, P. G., Messina, J. C., Mahmoud, R. A. (2014). The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Therapeutic Delivery*, 5(6), 709–733.
- Djupesland, P. G., Skretting, A. (2012). Nasal deposition and clearance in man: comparison of a bidirectional powder device and a traditional liquid spray pump. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 25(5), 280–289.
- Ding, J., Li, J., Mao, S. (2015). Development and evaluation of vinpocetine inclusion complex for brain targeting. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 2: 114-120.
- Dueñas-González, A., García-López, P., Herrera, L. A., Medina-Franco, J. L., González-Fierro, A., Candelaria, M. (2008). The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Molecular Cancer*, 7, 82.
- Dupuy, J., Alvinerie, M., Ménez, C., Lespine, A. (2010). Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-MDR1A cells. *Chemico-Biological Interactions*, 186(3), 280–286.



- Doudican, N., Rodriguez, A., Osman, I., Orlow, S. J. (2008). Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Molecular Cancer Research*, 6(8), 1308–1315.
- El Hilaly, J., Israili, Z. H., Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 43–50.
- Emami, A., Tepper, J., Short, B., Yaksh, T. L., Bendele, A. M., Ramani, T., Cisternas, A. F., Chang, J. H., Mellon, R. D. (2018). Toxicology evaluation of drugs administered via uncommon routes: intranasal, intraocular, intrathecal/intraspinal, and intra-articular. *International Journal of Toxicology*, 37(1), 4–27.
- Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., Gizurarson, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*, 143, 155–170.
- Espinoza, L. C., Vacacela, M., Clares, B., Garcia, M. L., Fabrega, M. J., Calpena, A. C. (2018). Development of a nasal donepezil-loaded microemulsion for the treatment of Alzheimer's disease: in vitro and ex vivo characterization. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 17(1), 43–53.
- Ezeonwumelu, J.O.C., Julius, A.K., Muhoho, C.N., Ajayi, A.M., Oyewale, A.A., Tanayen, J.K., (2011). Biochemical and histological studies of aqueous extract of *Bidens pilosa* leaves from Ugandan Rift Valley in Rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2, 302–209.
- Fernández-Bañares, F., González-Huix, F., Xiol, X., Catalá, I., Miró, J., López, N., y Casais, L. (1986). Marrow aplasia during high dose mebendazole treatment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(2), 350–351.
- Formariz, T. P., Chiavacci, L. A., Scarpa, M. V., Silva-Júnior, A. A., Egito, E. S., Terrugi, C. H., Franzini, C. M., Sarmiento, V. H., y Oliveira, A. G. (2010). Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 77(1), 47–53.
- Gadhve, D., Gorain, B., Tagalpallewar, A., Kokare, C. (2019). Intranasal teriflunomide microemulsion: An improved chemotherapeutic approach in glioblastoma. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 276-289.
- García-Rodríguez, J. J., de la Torre-Iglesias, P. M., Vegas-Sánchez, M. C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F., Torrado-Santiago, S. (2011). Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintic activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 23–28.
- Gately, L., McLachlan, S. A., Dowling, A., Philip, J. (2017). Life beyond a diagnosis of glioblastoma: a systematic review of the literature. *Journal of Cancer Survivorship*, 11(4), 447–452.
- Giering, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., Dabrowski, M., Rajan, W. D., Kloss, M., Mieczkowski, J., Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Scientific Reports*, 7(1), 17556.
- Gizurarson S. (1990). Animal models for intranasal drug delivery studies. A review article. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 2(2), 105–122.
- Gould, J. (2018). Breaking down the epidemiology of brain cancer. *Nature*, 561(7724), S40-S41.
- Granados, M.G., Rodríguez, J.O., Herrera, R.G. Álvarez, M.A. (2015). Primer consenso mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). *Gaceta Médica de México*, 151(3). 403-415.

- Graves, R. A., Ledet, G. A., Nation, C. A., Pramar, Y. V., Bostanian, L. A., y Mandal, T. K. (2015). Effect of squalane on mebendazole-loaded Compritol® nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science*, 26(13), 868–880.
- Grobben, B., De Deyn, P. P., y Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and Tissue Research*, 310(3), 257–270.
- Guerini, A. E., Triggiani, L., Maddalo, M., Bonù, M. L., Frassine, F., Baiguini, A., Alghisi, A., Tomasini, D., Borghetti, P., Pasinetti, N., Bresciani, R., Magrini, S. M., Buglione, M. (2019). Mebendazole as a candidate for drug repurposing in oncology. *Cancers*, 11(9), 1284.
- Gutierrez, E.L., Souza, M.S, Diniz, L.F., Ellena, J. (2018). Synthesis, characterization and solubility of a new anthelmintic salt: Mebendazole nitrate. *Journal of Molecular Structure*, 1161:113-121.
- Harkema, J.R., Carey, S.A., Wagner, J.G., Dintzis, S.M., y Liggitt, D. (2012). 6 - Nose, sinus, pharynx, and larynx, Editor(s) Piper M. Treuting, Suzanne M. Dintzis, *Comparative anatomy and histology*, Academic Press. 71-94, ISBN 9780123813619.
- Harris, A. S., Nilsson, I. M., Wagner, Z. G., Alkner, U. (1986). Intranasal administration of peptides: nasal deposition, biological response, and absorption of desmopressin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(11), 1085–1088.
- Himmelreich, M., Rawson, B.J., Watson, T.R. (1977). Polymorphic forms of mebendazole. *Australian Journal of Pharmaceutical Science*, 6: 123-125.
- Hoar, T.P, Schulman, J.H. (1943). Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature*, 152, 102–103.
- Holanda, B. B., Alarcon, R. T., Guerra, R. B., Rinaldo, D., Spazzini, F. C., Castro, R. A., Bannach, G. (2018). Investigation of thermal degradation products of mebendazole by thermal and spectroscopic analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 135, 76-84.
- Hong, S. S., Oh, K. T., Choi, H. G., Lim, S. J. (2019). Liposomal formulations for nose-to-brain delivery: Recent Advances and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, 11(10), 540.
- Horvát, S., Fehér, A., Wolburg, H., Sipos, P., Veszelka, S., Tóth, A., Kis, L., Kurunczi, A., Balogh, G., Kürti, L., Eros, I., Szabó-Révész, P., Deli, M. A. (2009). Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1), 252–259.
- Hosny, K. M., y Hassan, A. H. (2014). Intranasal in situ gel loaded with saquinavir mesylate nanosized microemulsion: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1-2), 191–197.
- Huang, S. Y., Yang, J.Y. (2018). Targeting the sonic hedgehog pathway in brain cancers: advances, limitations, and future directions. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy*, 347–359.
- Huang, X. J., Li, C. T., Zhang, W. P., Lu, Y. B., Fang, S. H., y Wei, E. Q. (2008). Dihydroartemisinin potentiates the cytotoxic effect of temozolomide in rat C6 glioma cells. *Pharmacology*, 82(1), 1–9.
- Illum L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 1–18.
- Jiang, D., Liang, J., y Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 435–461.
- Jogani, V. V., Shah, P. J., Mishra, P., Mishra, A. K., Misra, A. R. (2008). Intranasal mucoadhesive microemulsion of tacrine to improve brain targeting. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 22(2), 116–124.

- Jordan, M. A., y Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 253–265.
- Kaur, G., y Mehta, S. K. (2017). Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1-2), 134–160.
- Kawakami, K., Yoshikawa, T., Moroto, Y., Kanaoka, E., Takahashi, K., Nishihara, Y., Masuda, K. (2002). Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: I. Prescription design. *Journal of Controlled Release*, 81, 1–2, 65-74.
- Khaleghi, M., Ahmadi, E., Khodabandeh Shahraki, M., Aliakbari, F., Morshedi, D. (2020). Temperature-dependent formulation of a hydrogel based on Hyaluronic acid-polydimethylsiloxane for biomedical applications. *Heliyon*, 6(3), e03494.
- Kirtonia, A., Gala, K., Fernandes, S. G., Pandya, G., Pandey, A. K., Sethi, G., Khattar, E., Garg, M. (2020). Repurposing of drugs: An attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, S1044-579X(20)30094-8.
- Klossek, M.L., Marcus, J., Touraud, D., Kunz, W. (2013). The extension of microemulsion regions by combining ethanol with other cosurfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 427(20):95-100.
- Kozlovskaya, L., Abou-Kaoud, M., Stepensky, D. (2014). Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *Journal of Controlled Release*, 189, 133–140.
- Krause, W. E., Bellomo, E. G., Colby, R. H. (2001). Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules*, 2(1), 65–69.
- Laclette, J. P., Guerra, G., Zetina, C. (1980). Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92(2), 417–423.
- Larsen, A. R., Bai, R. Y., Chung, J. H., Borodovsky, A., Rudin, C. M., Riggins, G. J., Bunz, F. (2015). Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 3–13.
- Lawrence, M.J. Rees, G.D. (2012). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement,175-193.
- Le, T., Lim, H., Hamilton, A. M., Parkins, K. M., Chen, Y., Scholl, T. J., Ronald, J. A. (2018). Characterization of an orthotopic rat model of glioblastoma using multiparametric magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging. *Tomography*, 4(2), 55–65.
- Lepree, J. (2017). Are lipid-based drug delivery systems in your formulation toolbox? *Drug Development & Delivery*, 17 (7), 20-25.
- Linsenmann, T., Jawork, A., Westermaier, T., Homola, G., Monoranu, C. M., Vince, G. H., Kessler, A. F., Ernestus, R. I., y Löhr, M. (2019). Tumor growth under rhGM-CSF application in an orthotopic rodent glioma model. *Oncology Letters*, 17(6), 4843–4850.
- LiverTox: Clinical and research information on drug-induced liver injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Mebendazole. [Updated 2019 Jun 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547885/>
- Lochhead, J. J., Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 614–628.

- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595–1639.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Martins, F. T., Neves, P. P., Ellena, J., Camí, G. E., Brusau, E. V., Narda, G. E. (2009). Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(7), 2336–2344.
- Markowitz, D., Ha, G., Ruggieri, R., Symons, M. (2017). Microtubule-targeting agents can sensitize cancer cells to ionizing radiation by an interphase-based mechanism. *OncoTargets and therapy*, 10, 5633–5642.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 6, 2297-2316.
- Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., Houghten, R. A. (2013). Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(9-10), 495–501.
- Merkus, F. W., Verhoef, J. C., Schipper, N. G., Marttin, E. (1998). Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1-2), 13–38.
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology: Text and atlas*. New York : McGraw-Hill Education. 5a ed.
- Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R., Roth, J. A. (2002). Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 8(9), 2963–2969.
- Murgia, X., Loretz, B., Hartwig, O., Hittinger, M., Lehr, C. M. (2018). The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 82–97.
- Naser, G. A., Fullá, O. J., Varas, P. A., Nazar, S. P. (2008). El órgano vomeronasal humano. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 68(2), 199-204.
- Nasr, M. (2016). Development of an optimized hyaluronic acid-based lipidic nanoemulsion co-encapsulating two polyphenols for nose to brain delivery. *Drug Delivery*, 23(4), 1444–1452.
- Newlands, E. S., Blackledge, G. R., Slack, J. A., Rustin, G. J., Smith, D. B., Stuart, N. S., Quarterman, C. P., Hoffman, R., Stevens, M. F., Brampton, M. H. (1992). Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045; M&B 39831; NSC 362856). *British Journal of Cancer*, 65(2), 287–291.
- Nishimuta, H., Nakagawa, T., Nomura, N., y Yabuki, M. (2013). Significance of reductive metabolism in human intestine and quantitative prediction of intestinal first-pass metabolism by cytosolic reductive enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(5), 1104–1111.
- Nygren, P., Fryknäs, M., Agerup, B., Larsson, R. (2013). Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(12), 2133–2140.
- Ohtaki, H., Shioda, S. (2015). *Anatomy of adult central nervous system: structure and function of the brain and spinal cord*. In: Uchino H., Ushijima K., Ikeda Y. (eds) *Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. Springer, Tokyo.

- Ohwaki, T., Ando, H., Kakimoto, F., Uesugi, K., Watanabe, S., Miyake, Y., Kayano, M. (1987). Effects of dose, pH, and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats. II: Histological aspects of the nasal mucosa in relation to the absorption variation due to the effects of pH and osmolarity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(9), 695–698.
- Osborne, D. W., y Musakhanian, J. (2018). Skin penetration and permeation properties of Transcutol®-neat or diluted mixtures. *AAPS PharmSciTech*, 19(8), 3512–3533.
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., Sukhatme, V. P. (2014). Repurposing drugs in oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. *Ecancer*, 8, 443.
- Parrish, K. E., Sarkaria, J. N., Elmquist, W. F. (2015). Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 97(4), 336–346.
- Patel, R. B., Patel, M. R., Bhatt, K. K., Patel, B. G. (2013). Formulation consideration and characterization of microemulsion drug delivery system for transnasal administration of carbamazepine. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51, (2), 243-253.
- Patel, M.R., Patel, M.H. Patel, R.B. (2016). Preparation and in vitro/ex vivo evaluation of nanoemulsion for transnasal delivery of paliperidone. *Applied Nanoscience*, 6, 1095–1104.
- Patel, D., Ahmad, F., Kambach, D. M., Sun, Q., Halim, A. S., Kramp, T., Camphausen, K. A., Stommel, J. M. (2019). LXR $\beta$  controls glioblastoma cell growth, lipid balance, and immune modulation independently of ABCA1. *Scientific Reports*, 9(1), 15458.
- Pathak, V. (2018). A promising route of drug delivery to the brain: scientific considerations. *Drug Development and Delivery*, 18, 2: 63-68.
- Pathak, R., Dash, R. P., Misra, M., Nivsarkar, M. (2014). Role of mucoadhesive polymers in enhancing delivery of nimodipine microemulsion to brain via intranasal route. *Acta Pharmaceutica Sinica, B*, 4(2), 151–160.
- Pirmoradi, L., Seyfizadeh, N., Ghavami, S., Zeki, A. A., Shojaei, S. (2019). Targeting cholesterol metabolism in glioblastoma: a new therapeutic approach in cancer therapy. *Journal of Investigative Medicine*, 67(4), 715–719.
- Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., Rich, J. N. (2020). Glioblastoma stem cells: driving resilience through Chaos. *Trends in Cancer*, 6(3), 223–235.
- Poturcu, K., Demiralay, E. C. (2019) Determination of some physicochemical properties of mebendazole with RPLC method. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 64 (6), 2736-2741.
- Rameshlal, D.P., Pandharinath, M.P., Laxman N.D., Jayprakash, S.K., (2016). Development of self-microemulsifying drug delivery system of mebendazole by spray drying technology: characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal Drying Technology*, 34(9):1023-1042.
- Rane, S. S., Anderson, B. D. (2008). What determines drug solubility in lipid vehicles: is it predictable? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 638–656.
- Rao, M.R.P., Raut, S.P., Shirsath, C.T., Jadhav, M.B., Chandanshive, P.A. (2018). Self-nanoemulsifying drug delivery system of mebendazole for treatment of lymphatic Filariasis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80 (6): 1057.
- Rathod, M., Suthar, D., Patel, H., Shelat, P., Parejiya, P. (2019). Microemulsion based nasal spray: A systemic approach for non-CNS drug, its optimization, characterization and statistical modelling using QbD principles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 49, 286-300.



- Rew R.S., Fetterer R.H. (1986). Mode of action of antinematodal drugs. In: Campbell W.C., Rew R.S. (eds) *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Springer, Boston, MA.
- Rubin, J.; Mansoori, S.; Blom, K.; Berglund, M.; Lenhammar, L.; Andersson, C.; Loskog, A.; Fryknäs, M.; Nygren, P.; Larsson, R. (2018). Mebendazole stimulates CD14+ myeloid cells to enhance T-cell activation and tumour cell killing. *Oncotarget*, 9, 30805–30813.
- Rustan, A.C. and Drevon, C.A. (2005). Fatty acids: structures and properties. In eLS, (Ed.). doi:10.1038/npg.els.0003894
- Saidman, E., Chattah, A. K., Aragón, L., Sancho, M., Camí, G., Garnero, C., Longhi, M. (2019). Inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin and polymorphs of mebendazole: Physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 330–333.
- Salager, J., Antón, R.E., Sabatini, D.A. (2005). Enhancing solubilization in microemulsions—State of the art and current trends. *Journal of Surfact Detergents*, 8, 3–21.
- Salager, J. (1988). Phase Transformation and emulsion inversion on the basis of catastrophe theory. *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Marcel Dekker, 3, 79-92.
- Sarkar, M. A. (1992). Drug metabolism in the nasal mucosa. *Pharmaceutical research*, 9(1), 1–9.
- Sasaki, J., Ramesh, R., Chada, S., Gomyo, Y., Roth, J. A., Mukhopadhyay, T. (2002). The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(13), 1201–1209.
- Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K. M., Wasan, E. K. (2017). Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11), 1743–1758.
- Schulman, JH, Stoeckenius, W, Prince, L. M. (1959). Mechanism of formation and structure of microemulsions by electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistr*, 63:1677–1680.
- Seliger, C., Hau, P. (2018). Drug repurposing of metabolic agents in malignant glioma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2768.
- Shadab Md, Bhattmisra, S. K., Zeeshan, F., Shahzad, N., Mujtaba, M. A., Meka, V. S. Radhakrishnan, A., Kesharwani, P., Baboota, S., Ali, J. (2018). Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 295-310.
- Shah, B., Khunt, D., Misra, M., Padh, H. (2016). Non-invasive intranasal delivery of quetiapine fumarate loaded microemulsion for brain targeting: Formulation, physicochemical and pharmacokinetic consideration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 196–207.
- Shalaeva, M., Kenseth, J., Lombardo, F., Bastin, A. (2008). Measurement of dissociation constants (pKa values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2581–2606.
- Shapira-Furman, T., Serra, R., Gorelick, N., Doglioli, M., Tagliaferri, V., Cecia, A., Peters, M., Kumar, A., Rottenberg, Y., Langer, R., Brem, H., Tyler, B., Domb, A. J. (2019). Biodegradable wafers releasing temozolomide and carmustine for the treatment of brain cancer. *Journal of Controlled Release*, 295, 93–101.
- Shinde, R. L., Bharkad, G. P., Devarajan, P. V. (2015). Intranasal microemulsion for targeted nose to brain delivery in neurocysticercosis: Role of docosahexaenoic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, V, 96, 363–379.

Shingaki, T., Katayama, Y., Nakaoka, T., Irie, S., Onoe, K., Okauchi, T., Hayashinaka, E., Yamaguchi, M., Tanki, N., Ose, T., Hayashi, T., Wada, Y., Furubayashi, T., Cui, Y., Sakane, T., & Watanabe, Y. (2016). Visualization of drug translocation in the nasal cavity and pharmacokinetic analysis on nasal drug absorption using positron emission tomography in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 99, 45–53.

Solans, C., y García, M.J. (1997). Surfactants for microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2:5, 464-471.

Soma, M. R., Baetta, R., De Renzis, M. R., Mazzini, G., Davegna, C., Magrassi, L., Butti, G., Pezzotta, S., Paoletti, R., Fumagalli, R. (1995). In vivo enhanced antitumor activity of carmustine [N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea] by simvastatin. *Cancer Research*, 55(3), 597–602.

Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews*, 31(3), 443–481.

Stoyanov, G. S., Dzhakov, D. L. (2018). On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics, *Folia Medica*, 60(1), 48–66.

Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J. C., Pentheroudakis, G. ESMO Guidelines Working Group (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25 Suppl 3, iii93–iii101.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology*, 10(5), 459–466.

Sullivan, D. W., Gad, S. G. Julien, M. (2014). A review of the nonclinical safety of Transcutol®, a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. *Food and Chemical Toxicology*. 72, 40-50.

Tadros, Th.F. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91 (3),39-55.

Tahlan, S., Kumar, S., Narasimhan, B. (2019). Pharmacological significance of heterocyclic 1H-benzimidazole scaffolds: a review. *BMC Chemistry*, 13(1), 101.

Talegaonkar, S., Azeem, A., Ahmad, F. J., Khar, R. K., Pathan, S. A., Khan, Z. I. (2008). Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(3), 238–257.

Tamimi, A. F., Juweid, M. (2017). Epidemiology and outcome of glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 8. Available, from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>.

Tan, S. K., Jermakowicz, A., Mookhtiar, A. K., Nemeroff, C. B., Schürer, S. C., Ayad, N. G. (2018). Drug repositioning in glioblastoma: a pathway perspective. *Frontiers in pharmacology*, 9, 218.

Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggal, J. K., Cowan, D. S., Egorin, M. J. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 878–884.

Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 179(3), 183–196.

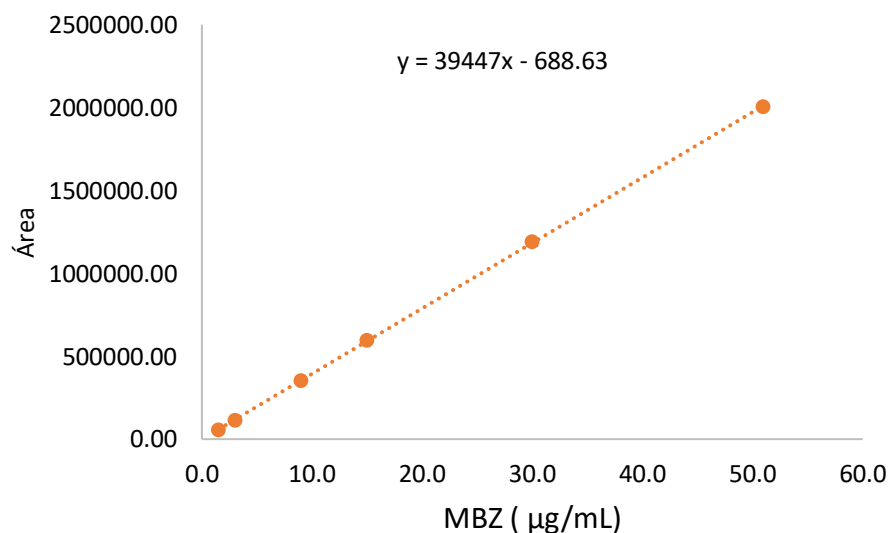


- Torres, F. C., García-Rubiño, M. E., Lozano-López, C., Kawano, D. F., Eifler-Lima, V. L., von Poser, G. L., Campos, J. M. (2015). Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 22(11), 1312–1323.
- Trejo-Solís, C., Serrano-Garcia, N., Escamilla-Ramírez, Á., Castillo-Rodríguez, R. A., Jimenez-Farfan, D., Palencia, G., Calvillo, M., Alvarez-Lemus, M. A., Flores-Nájera, A., Cruz-Salgado, A., y Sotelo, J. (2018). Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3773.
- van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., de Vries, H. E. (2015). Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates*, 19, 1–12.
- Wang, D., Wang, C., Wang, L., Chen, Y. (2019). A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*, 26(1), 551–565.
- Watanabe, Y. (2016). Visualization of drug translocation in the nasal cavity and pharmacokinetic analysis on nasal drug absorption using positron emission tomography in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 99, 45–53.
- Winograd, E. K., Ciesielski, M. J., Fenstermaker, R. A. (2016). Novel vaccines for glioblastoma: clinical update and perspective. *Immunotherapy*, 8(11), 1293–1308.
- Wolf, K.J., Chen, J., Coombes, J.D., Aghi, M.K., Kumar, S. (2019). Dissecting and rebuilding the glioblastoma microenvironment with engineered materials. *Nature Reviews Materials*, 4, 651–668.
- Winsor, P.A. (1948). Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. *Transactions of the Faraday Society*, 44, 376-398.
- Würth, R., Thellung, S., Bajetto, A., Mazzanti, M., Florio, T., Barbieri, F. (2016). Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discovery Today*, 21(1), 190–199.
- Xue, H., Li, J., Xie, H., Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *International Journal of Biological Sciences*, 14(10), 1232–1244.
- Zhang, J., Stevens, M. F., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
- Zhao, C., Quan, P., Liu, C., Li, Q., Fang, L. (2016). Effect of isopropyl myristate on the viscoelasticity and drug release of a drug-in-adhesive transdermal patch containing blonanserin. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 6(6), 623–628.
- Zhu, Y., Schwarz, S., Ahlemeyer, B., Grzeschik, S., Klumpp, S., Krieglstein, J. (2005). Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. *Neurochemistry International*, 46(2), 127–135.
- Zuchero, J. B., Barres, B. A. (2015). Glia in mammalian development and disease. *Development*, 142(22), 3805–3809.

XI ANEXOS

**Anexo I. Método analítico para la cuantificación de MBZ.**

No	Concentración de MBZ (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	σ	CV%
1	1.5	56696	56654	55635	56328.33	600.81	1.07
2	3.0	114710	117041	113696	115149.00	1715.17	1.49
3	9.0	355633	345366	353228	351409.00	5369.77	1.53
4	15.0	606666	592517	592002	597061.67	8321.58	1.39
5	30.0	1197076	1206972	1162869	1188972.33	23141.32	1.95
6	51.0	2007832	2005877	2005339	2006349.33	1311.90	0.07
	Ordenada al origen (b)	2459.59	-1492.82	-3032.65			
	Pendiente (m)	39487.26	39574.28	39278.22			
	Correlación ®	0.9999	0.9998	0.9999			
	ERR%	1.35	1.78	1.05			



No	Concentración de MBZ (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	CV%
1	1.5	1.37	1.47	1.49	
2	3.0	2.84	3.00	2.97	
3	9.0	8.94	8.76	9.07	
4	15.0	15.30	15.01	15.15	
5	30.0	30.25	30.54	29.68	
%Recobro					
		91.57	97.95	99.58	
		94.76	99.84	99.06	
		99.38	97.39	100.78	
		102.01	100.07	100.99	
		100.84	101.79	98.94	
		99.58	99.46	100.26	
CV%					
		8.43	2.05	0.42	3.63
		5.24	0.16	0.94	2.11
		0.62	2.61	0.78	1.34
		2.01	0.07	0.99	1.02
		0.84	1.79	1.06	1.23
		0.42	0.54	0.26	0.41

### Análisis estadístico de la curva de calibración.

Estadísticas de la regresión	
Coefficien	0.999984736
Coefficien	0.999969473
R <sup>2</sup> ajust	0.999959297
Error típico	0.074281932
Observac	5

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	542.24	542.2383593	98270.657
Residuos	3	0.0166	0.005517805	7.15845E-08
Total	4	542.25		

	Coefficientes	error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercept	-0.079264957	0.0502	-1.578611477	0.212539001	-0.23906138	0.080531467	-0.23906138	0.080531467
Variable:	1.008818437	0.0032	313.4815098	7.15845E-08	0.99857697	1.019059904	0.99857697	1.019059904

### Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1.433962699	0.0115
2	2.947190354	-0.0106
3	9.000100974	-0.0738
4	15.0530116	0.1005
5	30.18528815	-0.0276

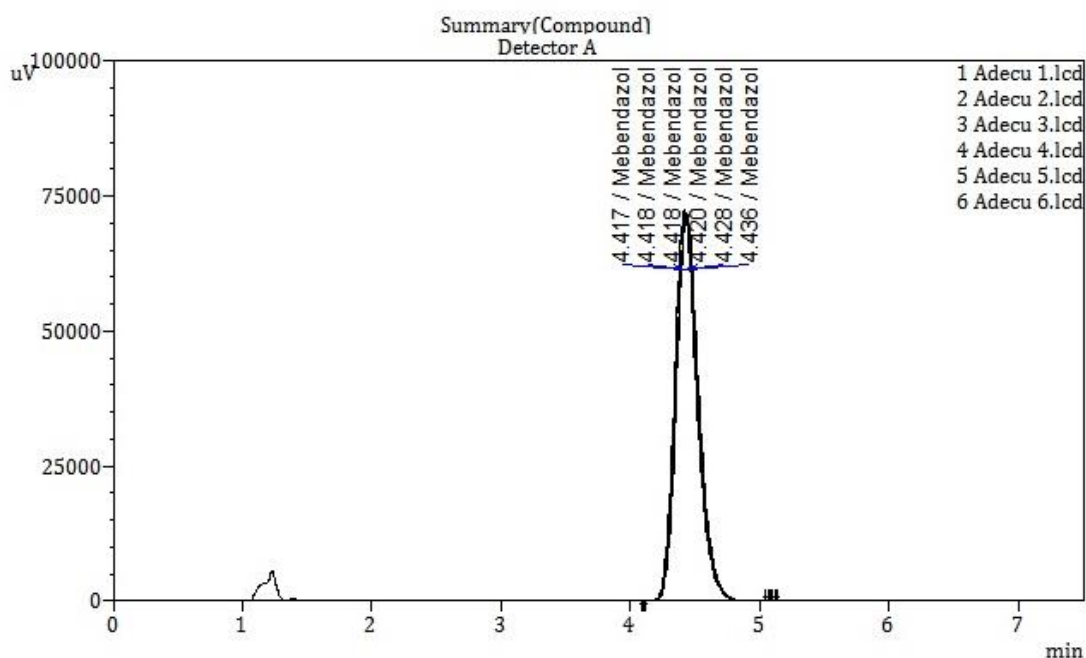
### Resultados de datos de probabilidad

Percentil	Y
10	1.445489397
30	2.936588126
50	8.926306513
70	15.15350712
90	30.15766261

Residuos

En la siguiente figura se presenta un cromatograma típico obtenido durante la cuantificación del mebendazol en las microemulsiones.

### Cuantificación de mebendazol



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Mebendazol

Title	Sample ID	Vial#	Ret. Time	Area	Height	Peak Start
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 1	10	4.417	871410	72452	4.100
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 2	10	4.420	878157	72729	4.092
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 3	10	4.418	875632	72532	4.108
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 4	10	4.418	870185	72160	4.083
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 5	10	4.428	869426	71714	4.108
emulsiones SHZ II\Estabilidades\Ad	Adecu 6	10	4.436	872354	71800	4.100
Average			4.423	872861	72231	4.099
%RSD			0.169	0.387	0.569	0.238
Maximum			4.436	878157	72729	4.108
Minimum			4.417	869426	71714	4.083
Standard Deviation			0.007	3378	411	0.010

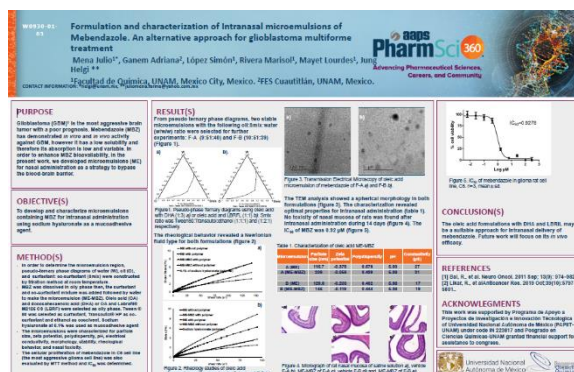
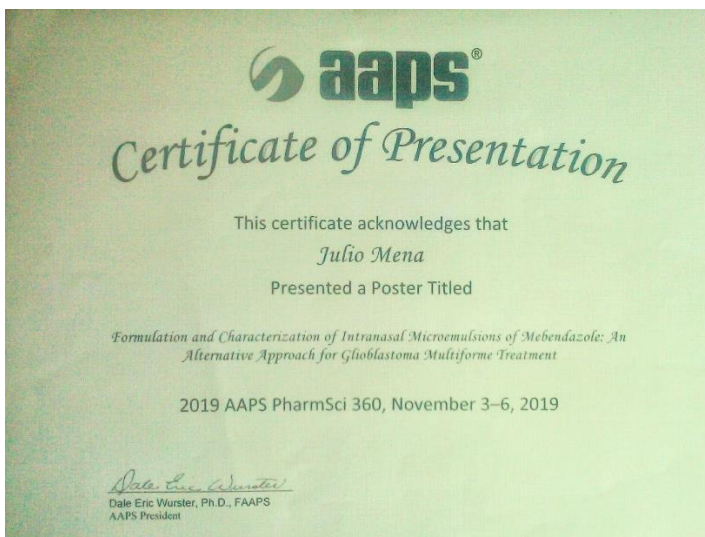
Peak End	Tailing Factor	Capacity Factor(k')	%Dev	Accuracy[%]	Number of Theoretical Plate(USP)
5.042	1.240	--	--	--	3072
5.133	1.237	--	--	--	3056
5.067	1.240	--	--	--	3044
5.092	1.240	--	--	--	3050
5.083	1.241	--	--	--	3044
5.117	1.241	--	--	--	3036
5.089	1.240	--	0.00	0.0	3050

## Anexo II. Difusión del trabajo

- 1) En el “5° Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología” celebrado del 17 al 21 de junio de 2019 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la modalidad de presentación oral con el título de “Desarrollo y caracterización fisicoquímica de una microemulsión de conteniendo un compuesto benzimidazolico”.



- 2) En el Congreso de la American Association of Pharmaceutical Science AAPS Pharm Sci 360 2019 celebrado los días del 3 al 6 de noviembre de 2019 en la ciudad de San Antonio Texas EUA, mediante la modalidad de poster con el título “Formulation and characterization of intranasal microemulsión de mebendazole. An alternative approach for glioblastoma treatment”.





## Anexo III Artículo publicado generado de la investigación

AAPS PharmSciTech (2020) 21:264  
DOI: 10.1208/s12249-020-01805-x



## Research Article

## Preparation and Evaluation of Mebendazole Microemulsion for Intranasal Delivery: an Alternative Approach for Glioblastoma Treatment

Julio Mena-Hernández,<sup>1,2</sup> Helgi Jung-Cook,<sup>2,3,8</sup> Monserrat Llaguno-Munive,<sup>4</sup> Patricia García-López,<sup>4</sup> Adriana Ganem-Rondero,<sup>5</sup> Simón López-Ramírez,<sup>6</sup> Fernando Barragán-Aroche,<sup>6</sup> Marisol Rivera-Huerta,<sup>7</sup> and Lourdes Mayet-Cruz<sup>2</sup>

Received 1 June 2020; accepted 27 August 2020

**Abstract.** Although mebendazole (MBZ) has demonstrated antitumor activity in glioblastoma models, the drug has low aqueous solubility and therefore is poorly absorbed. Considering that other strategies are needed to improve its bioavailability, the current study was aimed to develop and evaluate novel microemulsions of MBZ (MBZ-NaH ME) for intranasal administration. MBZ raw materials were characterized by FTIR, DSC, and XDP. Subsequently, the raw material that contained mainly polymorph C was selected to prepare microemulsions. Two different oleic acid (OA) systems were selected. Formulation A was composed of OA and docosahexaenoic acid (3:1% w/w), while formulation B was composed of OA and Labrafil M2125 (1:1% w/w). Sodium hyaluronate (NaH) at 0.1% was selected as a mucoadhesive agent. MBZ MEs showed a particle size of 209 nm and 145 nm, respectively, and the pH was suitable for nasal formulations (4.5–6.5). Formulation B, which showed the best solubility and rheological behavior, was selected for intranasal evaluation. The nasal toxicity study revealed no damage in the epithelium. Furthermore, formulation B improved significantly the median survival time in the orthotopic C6 rat model compared to the control group. Moreover, NIRF signal intensity revealed a decrease in tumor growth in the treated group with MBZ-MaH ME, which was confirmed by histologic examinations. Results suggest that the intranasal administration of mebendazole-loaded microemulsion might be appropriated for glioblastoma treatment.

**KEY WORDS:** mebendazole; glioblastoma; intranasal administration; microemulsion; sodium hyaluronate.

<sup>1</sup> Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México City, Mexico.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México City, Mexico.

<sup>3</sup> Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", 14269, Mexico City, Mexico.

<sup>4</sup> Laboratorio de Farmacología, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, 14080, Mexico City, Mexico.

<sup>5</sup> Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54740, Edo de Mex, Mexico.

<sup>6</sup> Departamento de Ingeniería Química/USIP, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico City, Mexico.

<sup>7</sup> Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico City, Mexico.

<sup>8</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: helgi@unam.com)

### INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the brain tumor with the highest incidence, and its extremely aggressive nature contributes to very low patient survival (1). The gold standard treatment is radiotherapy and concomitant chemotherapy with temozolomide, rendering an average survival time of 14.6 months (2). The challenges of GBM chemotherapy include its low efficacy, the limited number of therapeutic alternatives, the restricted access of molecules to the brain, and the elevated cost of available drugs (3). Thus, new therapeutic options are urgently needed for this cancer.

Mebendazole (MBZ), an anthelmintic drug used in patients with parasitic infections for over 30 years, has shown significant antiproliferative activity in glioblastoma models (4,5). The known safety profile and high potency have positioned it as an attractive candidate for GBM management. However, the drug exhibits extremely low aqueous solubility, which causes poor and erratic absorption from the gastrointestinal tract, and therefore, its bioavailability is low (5 to 10%) (6). Moreover, it exhibits a high hepatic

metabolism. Therefore, it is necessary to develop new and safe strategies for the use of mebendazole for this treatment.

Recently, there is a growing interest in intranasal administration as a drug delivery method due to its capacity to transport the drug directly to the brain along the olfactory and trigeminal nerves (7,8). Subsequently, the drug is transported into the cerebrospinal fluid or brain tissue (9). Since the blood-brain barrier (BBB) is circumvented, the doses employed by this route could be lower than by oral administration. Additionally, the extensive vascularization of the large nasal surface area, allows the drug to avoid hepatic metabolism (9). Hence, this route has been proposed as a potential alternative for the delivery of antineoplastic drugs in the treatment of GBM (10–12).

Microemulsions (MEs), which are versatile lipid-based drug delivery systems, offer several advantages such as the capability to enhance the solubility of many lipophilic drugs, a spontaneous formation, easiness to manufacture, and scale-up. They are clear, stable, isotropic mixtures of oil, water, and surfactant, frequently in combination with a cosurfactant. (13).

Increasing evidence suggests that the intranasal administration of drugs in microemulsions is safe and effective. In this context, an increase in brain concentrations of saquinavir mesylate (14), albendazole sulfoxide (15), and teriflunomide (16) concentrations were recently reported. The aim of the current study was to formulate and characterize microemulsions with sodium hyaluronate (NaH) as a mucoadhesive agent for the intranasal administration of MBZ and to evaluate the efficacy of the best formulation in an orthotopic rat model of glioblastoma.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Three batches of MBZ, two from KA Malle Pharmaceutica Ltd. (Gujarat, India) and one analytical standard from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), were characterized. Transcutol HP, Labrafac, Labrafil M 2125, Labrasol, and Peceol were kindly provided by Gattefossé, (Saint-Priest Cedex, France). Super refined oleic acid (OA) and docosahexaenoic acid-rich oil (enriched fish oil, DHA 500 TG-LQ-LK) were generously provided by Croda Inc. (East Yorkshire, UK). Tween 80 was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium hyaluronate (NaH, MW 1900 kDa) was donated by DSM Nutritional Products Ltd. (Kaiseraugst, Switzerland). Distilled or deionized water was obtained from the Elix 3 and Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, MA, USA). The solvents employed in the chromatographic analysis were HPLC grade (JT Baker). All other reagents and solvents were of analytical grade.

## METHODS

### Characterization of Mebendazole Raw Material

The three batches of MBZ were characterized by means of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray powder diffraction (XRPD), and differential scanning

calorimetry (DSC). The infrared spectra were obtained using a Perkin-Elmer Model Spectrum 400 spectrophotometer. Data were collected over a spectra region from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . X-ray diffraction patterns were acquired on a Siemens D-5000 D8 Advance diffractometer with a Cu monochromator. Samples were examined in the  $2\theta$  angle range of 3–40° and an acquisition time of 28 min. DSC measurements were obtained using calorimeter Mettler-Toledo Star system. Samples of 2–4 mg were weighed, placed in aluminum pans, sealed, and heated at a rate of 10°C/min in the temperature range of 80 to 320°C with a 100 mL/min flow of air.

### Solubility Study

In order to select the oily phases, surfactants and cosurfactants for the preparation of microemulsions, the solubility of MBZ was determined in the following excipients: OA, soybean oil, docosahexaenoic acid (DHA), isopropyl myristate, Peceol, Labrafac, Labrasol, Labrafil M 2125, Tween 80, Transcutol HP, Cremophor RH 40, polyethylene glycol 400 (PEG), propylene glycol, and ethanol. Briefly, an excess of the drug was added to each glass tube containing 2 mL of the corresponding vehicle, and the mixtures were maintained in a shaker water bath for 48 h at 25°C. Then, each sample was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The supernatant was properly diluted with methanol, and the MBZ concentration was determined by HPLC (Shimadzu LC-10ATvp) using an Eclipse® XDB-C8 column (4.6 × 150 mm) particle size 5  $\mu\text{m}$  (Agilent). The mobile phase was methanol:water (60:40) at a flow rate of 1.2 mL/min and a UV detector at 247 nm. The analysis was carried out at 25°C. The method was linear in the range of 1.5–51.0  $\mu\text{g/mL}$ . Intra-day and inter-day coefficients of variation were < 2%.

### Pseudo-Ternary Phase Diagrams

Based on the solubility results, OA and its combination with DHA and Labrafil M 2125 were chosen as the oil phase (O) in ratios of 3:1 and 1:1 w/w, respectively. Tween 80, Transcutol HP, and ethanol were selected as the surfactant, cosurfactant and cosolvent, respectively, and were used in different proportions (1:1:1, 2:1:1, 3:1:1, 1:2:1, 1:1:2, 1:1:3 w/w) to elaborate various mixture systems (Smix). Each ratio of Smix was mixed with the oil phase under magnetic stirring until a homogeneous appearance was achieved. Subsequently, distilled water was added in a dropwise manner, recording the volume at which the system changed from transparent to opaque. Based on the proportions calculated for each component, pseudo-ternary phase diagrams were constructed using OriginLab software (Northampton, MA, USA). All samples exhibiting a transparent and homogeneous state were assigned to a microemulsion region in the phase diagram.

### Preparation of MBZ-Loaded MEs

According to the microemulsion formation zones defined in the pseudo-ternary phase diagrams, two different formulations were selected. Formulation A was composed of 9% OA/DHA at a ratio of 3:1 (w/w), 51% Smix and 40% water, while



formulation B consisted of 10% OA/Labrafil M 2125 in a ratio of 1:1 (w/w), 51% Smix and 39% water.

Formulation A was elaborated by solubilizing MBZ in Transcutol HP and subsequently adding OA and DHA under gentle magnetic stirring, followed by Tween 80 and ethanol. Finally, water was slowly added. For formulation B, MBZ was solubilized in Labrafil M 2125 at 50°C in a water bath under constant magnetic stirring. Later OA was added and the temperature was allowed to decrease to room temperature. Transcutol HP, Tween 80, and ethanol were added under magnetic stirring before slowly adding water. In the case of the microemulsion containing NaH (MBZ-NaH ME), the biopolymer (0.1% w/w) was solubilized in the aqueous phase, then slowly integrated into the lipid-Smix mixture. The drug content was determined by HPLC at 247 nm after diluting the microemulsions with methanol.

#### Physicochemical Characterization of MBZ-Loaded Microemulsions

The particle size, polydispersity, and zeta potential of the microemulsions were determined by the dynamic light scattering technique at 25°C on a Malvern Zetasizer Nano ZS-90 apparatus (Worcestershire, UK). The pH values were measured at 25°C on a pH Orion Star Benchtop Meter (Thermo Scientific, MA, USA), while conductivity was assessed with a Hanna Instruments waterproof tester (Woonsocket, RI, USA). Morphology was examined by transmission electron microscopy (TEM). The microemulsions were placed onto a film-coated copper grid prior to negatively staining the samples with 2% p/v of phosphotungstic acid (Agar Scientific, Essex, UK) and allowed to dry at room temperature. Samples were observed using a TEM Jeol 2010 apparatus (MI, USA) and 200 kV of accelerating voltage. The physical stability of the formulations was determined by centrifugation (4000g for 15 min) and thermal stress (50°C for 48 h). Changes such as phase separation, flocculation, or creaming were evaluated. The MBZ content was monitored for 89 days at room temperature using the previously described HPLC assay.

#### Rheological Study

A controlled stress Discovery Hybrid Rheometer (DHR3) from TA Instruments (Delaware, USA) with a double wall cylinder concentric geometry was used for rheological and viscoelastic analysis through rotational and oscillatory tests at 25°C, respectively. A sweep from 0.01 to 100 s<sup>-1</sup> was achieved to analyze the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ) dependence of viscosity ( $\mu$ ). The storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli were measured using the controlled strain and angular frequency options. Since  $G'$  and  $G''$  were independent of the strain amplitude over the linear viscoelastic region, the latter was determined with a strain sweep from 0.01 to 100% at a fixed angular frequency of 10 rad s<sup>-1</sup> (1.5915 Hz). Considering the experimental results, both  $G'$  and  $G''$  were independent of the applied strain below of 10%, that is, a linear viscoelastic behavior was observed below this deformation, therefore, the viscoelastic behavior of the formulations was examined by applying a constant deformation of 1% over a frequency range between 0.1 and 10 Hz. Finally, a sweep from 20 to 40°C at a constant shear

rate of 1 s<sup>-1</sup> was performed to check the temperature dependence of viscosity and thus discard the possibility of emulsion phase inversion.

#### Nasal Toxicity Test

Male Sprague-Dawley rats (200–250 g), acquired from Envigo CRS Limited, were acclimated for 5 days under standard housing conditions with a 12-h light/dark cycle, a temperature of 21 ± 2°C, and humidity at 40–70%. Food and water were provided *ad libitum*. The protocol was approved by the Institutional Committee for Animal Handling and Care of the Facultad de Química at the Universidad Nacional Autónoma de México (number FQ/CICUAL/348/18) and was carried out according to Mexican Regulations for Animal Experimentation (NOM-062-ZOO-1999).

Eighteen rats were assigned randomly to the following groups: group I, saline solution (negative control); group II, the vehicle of formulation B (NaH ME), and group III, formulation B (MBZ-NaH ME). Twenty microliters of the treatments were applied in each nostril for 14 days. Animals were weighed on days 0, 7, and 14. Behavior and clinical observations were made every day throughout the study.

Immediately after, the rats were sacrificed with carbon dioxide gas and decapitated. The nasal tissue was extracted and evaluated macroscopically. The samples were fixed in 10% formalin and divided into three sections: cranial nasal epithelium (near the nostril), the middle nasal epithelium (middle part of the nasal cavity), and caudal nasal epithelium (ethmoidal shells). The tissues were dehydrated, embedded in paraffin, sliced into 3 μm thick sections, stained with hematoxylin and eosin, and analyzed by light microscopy.

#### In Vivo Efficacy Study of MBZ-NaH ME in an Orthotopic Model of Glioblastoma

##### Animals and Cell Culture

Male Wistar rats (200–230 g) were supplied by Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Mexico City, Mexico. All procedures for the care and handling of the animals were approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Cancerología of Mexico (numbers 010/017/IBI and CEI/601/109) and were in accordance with the Mexican Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999).

The C6 rat glioma cell line, obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), was routinely maintained as a monolayer in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at high humidity and harvested with 1 mM EDTA.

##### Tumor Cell Implantation

The efficacy of the orthotopic C6 rat glioma model was determined by the method of Llaguno et al. (17). Briefly, each animal was placed in a stereotactic device for surgery following anaesthetization with a combination of tiletamine hydrochloride (10 mg/kg) and acepromazine maleate (0.4 mg/kg) i.m. After fastening the head in the frame, a



midline incision was made and bregma was identified. The skull was then drilled at the coordinates of 2.0 mm right from bregma and 6 mm deep, in accordance with the Paxinos and Watson atlas (18). C6 cells were harvested, washed two times, and diluted in DMEM to a concentration of  $1.0 \times 10^6$  in a volume of 3  $\mu$ L. Through a 27-gauge needle connected to an infusion pump, these cells were slowly implanted at a depth of 6 mm from the dura mater. The scalp was closed and the rat was returned to the animal facility. The sham group underwent the surgical procedure only, without the implantation of tumor cells. Animals were subsequently weighed throughout the experiment.

#### Intranasal Administration of Treatments

One week after implantation of tumor cells, the rats were divided into four groups ( $n = 6$ ): the sham-operated animals (without glioma cell inoculation and in the absence of treatment) and three groups that received a glioma cell implantation, including the control (without treatment), the group given NaH ME (the vehicle of formulation B) and the one receiving MBZ-NaH ME (an MBZ-loaded microemulsion containing formulation B at 260  $\mu$ g/mL). The intranasal administration was based on reports by Stenslik et al. (19). The rats were anesthetized in an induction chamber with isoflurane at 1.0–3.0% and 100.0% oxygen before 40  $\mu$ L of the treatments were applied by using a plastic tip, which was placed 3 mm inside the animal nose with the head upward. This procedure was carried out every day for 14 days.

#### Evaluation of Tumor Growth

Tumor growth was evaluated by monitoring animal weight loss and survival time throughout the 50-day experiment. At the end of each treatment, the effect on tumor growth was assessed with the contrast agent (IRDye® 800CW RGD Optical Probe; abs: 776 nm; em: 792 nm; LI-COR Biosciences) which is a near-infrared fluorescence (NIRF) imaging agent specifically designed to target integrins. Briefly, 1 nmol of IRDye 800CW RGD was injected into the caudal vein of the rats under  $O_2$ /isoflurane anesthesia (1–3% isoflurane in 100% oxygen). At 48 h post-injection, the animals were euthanized to prepare for dissection of the brain. Optical imaging was captured with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR), and the absolute fluorescence intensities were quantified on Odyssey Application Software. The regions of interest and background were selected. Background fluorescence was subtracted from the signal intensities, and the fluorescence signal/area was the basis of comparison between groups.

#### Histological Analysis

At the end of the experiment, all rats were euthanized and perfused, first using a saline solution and then 4% paraformaldehyde. The brain tissue was embedded in paraffin to be sliced into 2-mm-thick sections on the coronal plane. The tissue slices were stained using the hematoxylin-eosin method.

#### Statistical Analysis

Differences between groups were examined with one-way analysis of variance (ANOVA) on GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA), followed by the Bonferroni multiple comparisons test. In all cases, significance was considered at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

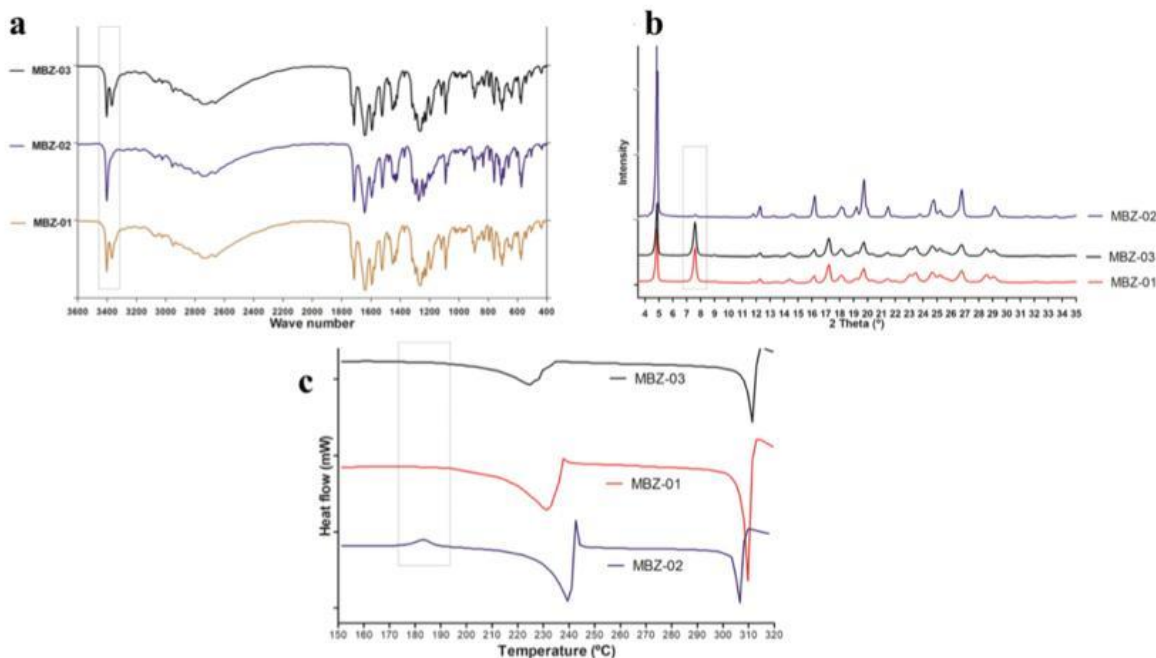
#### Characterization of MBZ Raw Material

The raw material of MBZ is comprised of a mixture of three polymorphic forms, designated as A, B, and C. Polymorph B is the most soluble form and polymorph A the most insoluble (20). Each form exhibits distinct antitumor activity (21). Pure polymorph C has been recommended for its use as an anticancer agent due to its solubility and thermodynamic stability (22). However, the cost of producing polymorph C is high, and there is evidence of the transition from polymorph C to polymorph A during the manufacturing and packaging process (23). Therefore, it was considered important to develop the formulations using mebendazole raw material.

In the present study, the three batches of MBZ were characterized in order to determine whether they contained polymorph C. The IR spectra of the three batches showed a 3410  $\text{cm}^{-1}$  signal, attributed to the –NH bond of polymorph C. (Fig. 1a). In MBZ-02, the characteristic signals at 3370  $\text{cm}^{-1}$  for the –NH bond of polymorph A and 3340  $\text{cm}^{-1}$  for polymorph B were not found (24). Concerning the XRPD analysis, Brits et al. (25) described the following inter-planar distances for the three MBZ polymorphs: 7.67 d (Å) for polymorph A, 5.84 d (Å) for polymorph B and 4.93 d (Å) for polymorph C. The peak for polymorph C was detected in the diffractograms of MBZ-01, MBZ-02, and MBZ-03 (Fig. 1b), but the peak for polymorph B did not appear in MBZ-02 batch. The DSC thermograms of the samples showed two endothermic events (Fig. 1c). The first endothermic transition peak was detected at 231°C, 240°C, and 223°C for MBZ-01, MBZ-02, and MBZ-03, respectively. The second endothermic peak around 310°C was found in all three polymorphs (26). MBZ-02 also displayed an exothermic peak at 185°C, which could be attributed to the transition from polymorph C to the A form by a crystal arrangement (20).

#### Solubility Study

Oils and surfactants were chosen for evaluation in the current investigation based on the safety profile documented by previous studies of nasal administration (15,27–32). The solubility of MBZ was examined in the different oils, surfactants, cosurfactants, and cosolvents (Fig. 2). The solubility of MBZ in soybean oil, Peceol, Labrafac, and Labrasol was in the range of 112–326  $\mu$ g/mL. The greatest solubility was found in OA (1305  $\pm$  59  $\mu$ g/mL). Although the solubility of the drug was not increased by the combination of OA with DHA at a 3:1 ratio (1231  $\pm$  27  $\mu$ g/mL), it has been reported that DHA in microemulsions can improve the nose to brain delivery of drugs (15,33). OA/Labrafil at a 1:1 ratio



**Fig. 1.** **a** FT-IR transmittance spectrum, **b** X-ray powder diffractogram, and **c** DSC thermograms of three mebendazole raw materials evaluated

( $1737 \pm 68$   $\mu\text{g/mL}$ ) also considerably enhanced MBZ solubility. Thus, for the construction of the pseudo-ternary phase diagrams, mixtures of OA/DHA and OA/Labrafil M 2125 were selected. Labrasol, Tween 80, Transcutol, and PEG were employed as nonionic surfactants because of the good MBZ solubility results with these compounds ( $1660 \pm 09$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $1129 \pm 14$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $2019 \pm 17$   $\mu\text{g/mL}$ , and  $1349 \pm 25$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively).

### Pseudo-Ternary Phase Diagrams

The pseudo-ternary phase diagrams for the microemulsions of both oily phases (OA/DHA and OA/Labrafil M 2125) using the Tween 80/Transcutol HP/ethanol mixture (Smix) at two distinct ratios (1:1:1 and 1:2:1) revealed a limited capability to incorporate water (Fig. 3). There was a larger microemulsion region in the OA/Labrafil M 2125 (Fig. 3b) than OA/DHA mixture (Fig. 3a). This may be related to the composition of Labrafil M 2125, being a mixture of medium and long-chain fatty acids. Consequently, the penetration of OA into the surfactant monolayer was restricted. Labrasol and PEG were discarded due to their reduced microemulsion formation area.

### Preparation of MBZ-Loaded MEs

The use of the spontaneous emulsification method (titration method) at room temperature was appropriate to prepare mebendazole-loaded microemulsions. Formulation B required a heating stage (at the temperature recommended by the manufacturer) for Labrafil M 2125 homogenization. The drug content assay showed that almost twice of the drug

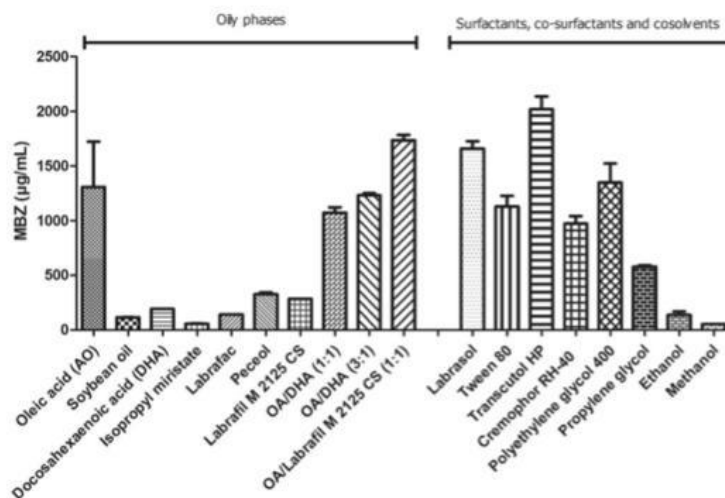
load was achieved with formulation B ( $260 \pm 3.36$   $\mu\text{g/mL}$ ) versus formulation A ( $154 \pm 1.7$   $\mu\text{g/mL}$ ).

It has been shown that nasal microemulsions with mucoadhesive molecules prolong the retention time and thus, improve the absorption of drugs in the CNS (27). Sodium Hyaluronate (NaH) at 0.1% was added to both formulations (MBZ-NaH MEs) due to its biodegradability, biocompatibility, and good mucoadhesive properties (34). No changes in appearance, color, or precipitation were observed.

### Physicochemical Characterization of Mebendazole-Loaded Microemulsions

Table I shows the physicochemical properties for drug-free and drug-loaded formulations. As can be appreciated, the incorporation of the drug did not substantially modify the properties of the microemulsion in either of the two systems. The particle size distribution (PSD < 210 nm) is viable for nasal administration. Polydispersity values were under 0.7, suggesting an acceptable distribution (35). Despite the low value of the zeta potential (less than  $-0.3$ ), the microemulsions maintained their appearance after undergoing mechanical and thermal stress. The pH was in the range of 4.5–6.5, considered acceptable for nasal administration (36). The conductivity values (17–30  $\mu\text{S/cm}$ ) indicate an oil-in-water type system, which is favorable for nasal administration. Transmission electron microscopy (TEM) analysis revealed a spherical morphology for both formulations (Fig. 4). The drug content > 93% of formulation B (MBZ-NaH ME) was maintained following 89 days of storage at room temperature (25°C).





**Fig. 2.** Solubility of mebendazole in different oils, surfactants, cosurfactants, cosolvents, and mixtures. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ )

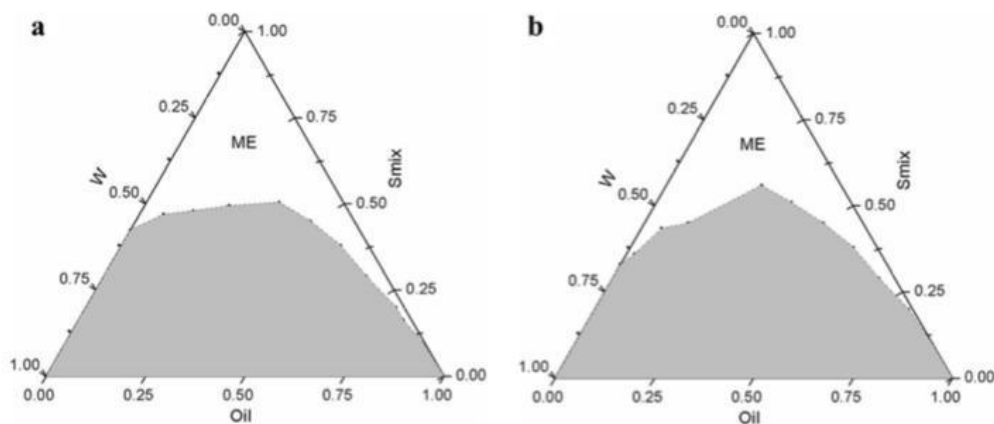
### Rheological Study

Flow curves were used to understand the interaction of the components in the formulations. The MEs showed a linear relationship between shear rate and shear stress, indicating a Newtonian behavior (Fig. 5). No changes in viscosity were observed in either formulation (ME) after the encapsulation of MBZ (MBZ ME) (Fig. 5a and b), which indicates that the components of the microemulsion in both formulations (A or B) did not interact with MBZ. The incorporation of NaH in the microemulsion without MBZ (NaH ME) increased the viscosity and promoted a non-Newtonian behavior, an indicator of a pseudoplastic fluid. A higher viscosity was found when MBZ was incorporated in formulation A, MBZ-NaH ME (Fig. 5a), suggesting intermolecular interactions such as hydrogen bonds between the  $-NH$  or  $-OH$  of NaH and  $-HC=CH-$ ,  $-H$  of DHA or  $=N-H$  of the tautomeric form of MBZ. In formulation B (Fig. 5b), no

difference in viscosity was detected between NaH ME and MBZ-NaH ME. Hence, formulation B was chosen for the further evaluations.

### Viscoelasticity

According to the viscoelastic behavior of ME, MBZ ME, NaH ME, and the formulation B (MBZ-NaH ME), the values of  $G'$  (Fig. 5a) and  $G''$  (Fig. 5b) increased in the entire frequency range. The presence of NaH had more impact on the increment of both moduli. These results could be explained by the hydrogen bond formation between the water molecules and the carboxylic groups of the hyaluronate sodium molecules, generating a dynamic network and hence an increment of rigidity of sample. The loss factor ( $\tan \delta$ ) corresponds to the ratio of the loss modulus to storage modulus. An increase in this parameter gives rise to the predominance of viscous behavior in the system. Although all



**Fig. 3.** Pseudo-ternary phase diagrams for the oily phases: **a** oleic acid/DHA (3:1 w/w) with a Smix of Tween 80/Transcutol HP/ethanol (1:1:1 w/w) and water (W), and **b** oleic acid/Labrafil M 2125 (1:1 w/w) with a Smix of Tween 80/Transcutol HP/ethanol (1:2:1 w/w) and water (W)

**Table I.** Physicochemical characterization of the drug-free and mebendazole-loaded microemulsions in both formulations

Microemulsion systems	MBZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Polydispersity index	pH	Conductivity ( $\mu\text{S}$ )
Formulation A	—	115.7	-0.378	0.576	5.03	27
	130	209	-0.056	0.439	5.08	31
Formulation B	—	129.6	-0.203	0.432	5.38	17
	250	145	-0.119	0.444	5.36	20

samples had a predominant viscous behavior (Fig. 6c), a greater elastic behavior was displayed by the formulations with NaH. The increase of  $G'$  behavior plays a rule of paramount importance, as the hypothesis states that, when nasal microemulsions are deposited as a thin layer on the nasal mucosa, the carboxylic group of NaH interacts with calcium ions present in the mucosa fluid. If there is a sufficient concentration of these ions, a gel is formed. In the gel state, if the residence time of the formulation on the mucosal surface is prolonged and the drug will be released in a controlled manner (37). Formulation B showed a temperature-dependent viscosity without any emulsion phase inversion in the range of temperatures evaluated (Fig. 6d).

#### Nasal Toxicity Test

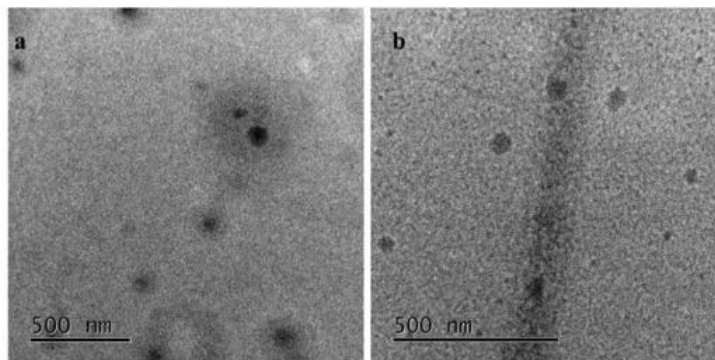
Although MBZ pharmacology, safety, general toxicity, and carcinogenicity are extensively known (4), the specific nasal toxicity has not been evaluated. Results showed that exposure to MBZ-NaH ME over 14 days did not cause any loss of hair, hemorrhages, diarrhea, or behavioral modifications. The macroscopic evaluation from the nasal vestibule to nasopharynx did not reveal changes in the color, redness, or texture of the tissue compared to the control group. Figure 7 shows the histopathological images of the nasal cavity regions following the application of the saline solution and MBZ-NaH ME. No changes were found (*e.g.*, necrosis, cell degeneration, or leucocytic infiltration) in cranial, middle, or caudal sections. Although the epithelium tissue was diminished, the nasal membrane maintained its integrity with the application of formulation B, and no histopathological alterations were observed in the regions evaluated, nor were there any significant differences in the body weight between

the MBZ-NaH ME and the control group (Fig. 7g). These results suggest that the nasal administration of the formulation at the dose tested is safe and appropriate.

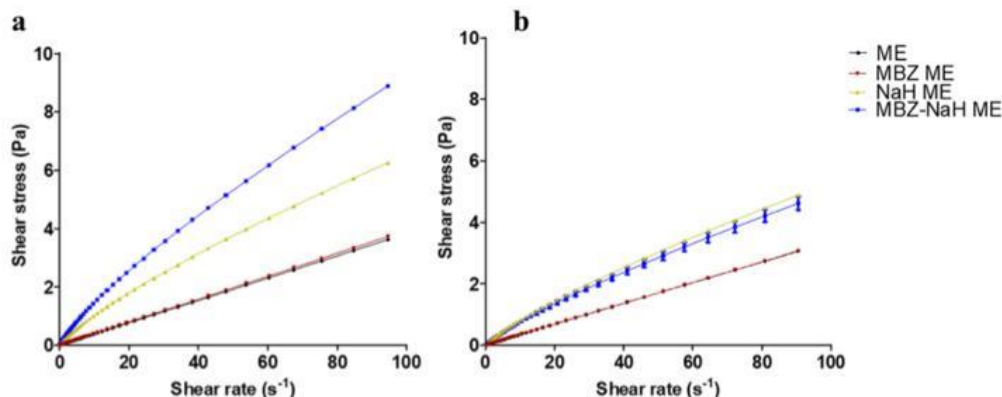
#### *In Vivo* Efficacy of MBZ-NaH ME in an Orthotopic Model of Glioblastoma

Since glioblastoma is the most aggressive primary brain tumor, the patient survival rate is low. The antitumor activity of MBZ demonstrated *in vitro* and *in vivo* represents an attractive alternative for therapy. However, its oral administration has shown a low absorption. Thus, the antitumor activity of intranasally administered MBZ-NaH ME was examined on an orthotopic model of glioma cells implanted intracranially in rats, which is widely used to analyze the efficacy of a variety of treatments (38). The model exhibits several characteristics observed in human glioblastoma, such as high mitotic index, focal tumor necrosis, parenchymal invasion, neovascularization, and global transcriptomic profiles (39,40).

Additionally, tumor growth can be indirectly assessed by means of animal weight loss. Results showed that subsequent to glioma cell implantation, all animals gained weight during the first few days and underwent a drastic weight loss as of day 9 (Fig. 8a). The latter reduction in body weight is attributed to tumor growth. The sham group did not show any weight loss, verifying that the surgical interventions did not contribute to a toxic effect. On the other hand, the rapid weight loss of the control group strongly suggests accelerated tumor growth. There was significantly less weight loss in the MBZ-NaH ME rats compared to those receiving the vehicle (NaH ME) or no treatment (the control).



**Fig. 4.** TEM images of the microemulsions with mebendazole and sodium hyaluronate: **a** formulation A and **b** formulation B



**Fig. 5.** Flow curves of **a** formulation A and **b** formulation B. ME microemulsion alone, MBZ ME microemulsion with mebendazole, NaH ME microemulsion with sodium hyaluronate, MBZ-NaH ME microemulsion with mebendazole and sodium hyaluronate ( $n = 3$ )

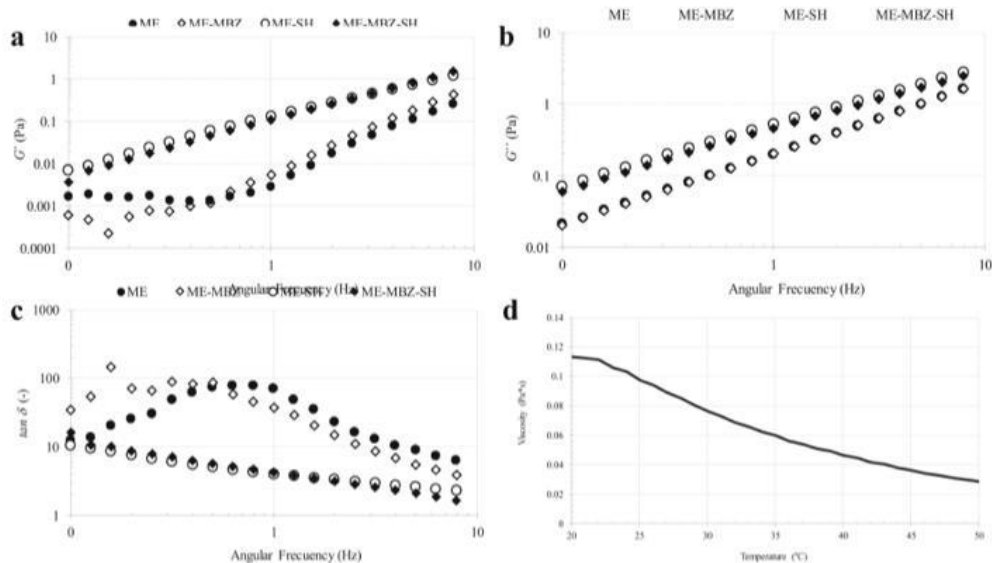
Animal survival time is another indicator of tumor growth. Whereas the animals in the control and NaH ME groups survived 20–30 days, those receiving MBZ-NaH ME were still alive at the end of the experiment (at day 50) (Fig. 8b). This effect could be attributed to the presence of OA in the microemulsion since an *in vitro* study demonstrated that oleic acid had an inhibitor effect in fatty acid and cholesterol synthesis on the C6 cell line (41). The current findings provide evidence of the capacity of MBZ-loaded microemulsion to arrive at the brain when delivered in the nasal cavity.

Theoretically, the biopharmaceutical properties of MBZ, especially its lipophilic behavior and small size, could favor its passage through nasal cells of the olfactory epithelium. Previously, in a clinical study, it was confirmed that MBZ crosses the BBB when given orally, but the concentrations are

lower than in serum (42). Recently, it was reported that MBZ crosses the BBB with a brain/plasma (B/P) ratio of 0.80 for polymorph C and 0.64 for polymorph B (21). According to the present data, the nasal administration of 40  $\mu$ L of MBZ-NaH ME at 250  $\mu$ g/mL led to a survival rate similar to that described by Bai *et al.* (21) following oral administration of 50 mg/kg/day of polymorph C.

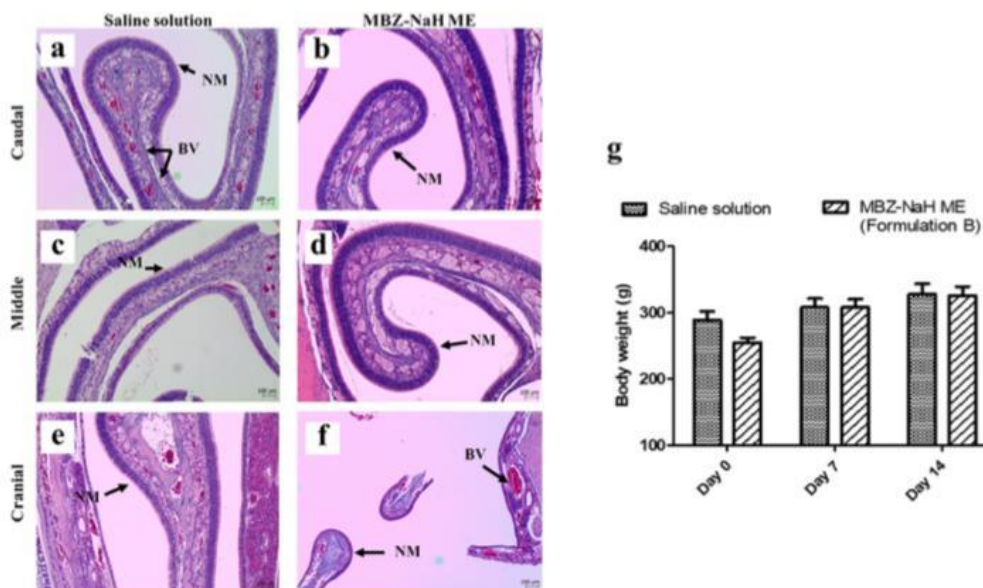
#### NIRF *Ex Vivo* Imaging Study

Fluorescence imaging has been instrumental for examining the efficacy of treatments and diagnosing tumors. It was herein employed as a third indicator of tumor growth. The fluorescent dye targets integrins, which are cell surface glycoproteins. Integrin  $\alpha 5\beta 3$  is highly expressed in glioma tumors, being involved in tumor growth, tumor invasiveness,



**Fig. 6.** Angular frequency dependence of the viscoelasticity behavior of formulation B: **a** elastic modulus ( $G'$ ), **b** viscous modulus ( $G''$ ), **c** loss factor ( $\tan \delta$ ), and **d** temperature dependence of viscosity. ME (solid circles), MBZ ME (blank diamonds), NaH ME (blank circles), and MBZ-NaH ME (solid diamonds)

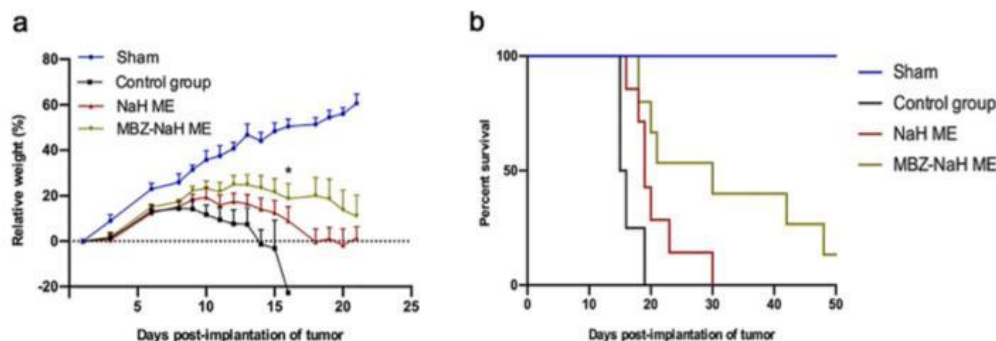




**Fig. 7.** Photomicrographs of the epithelium of three nasal regions after exposure to saline solution or formulation B (MBZ-NaH ME): caudal (a, b), middle (c, d), and cranial (e, f). NM nasal membrane, BV blood vessels. The body weight of rats during the nasal toxicity test is also presented (g). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ )

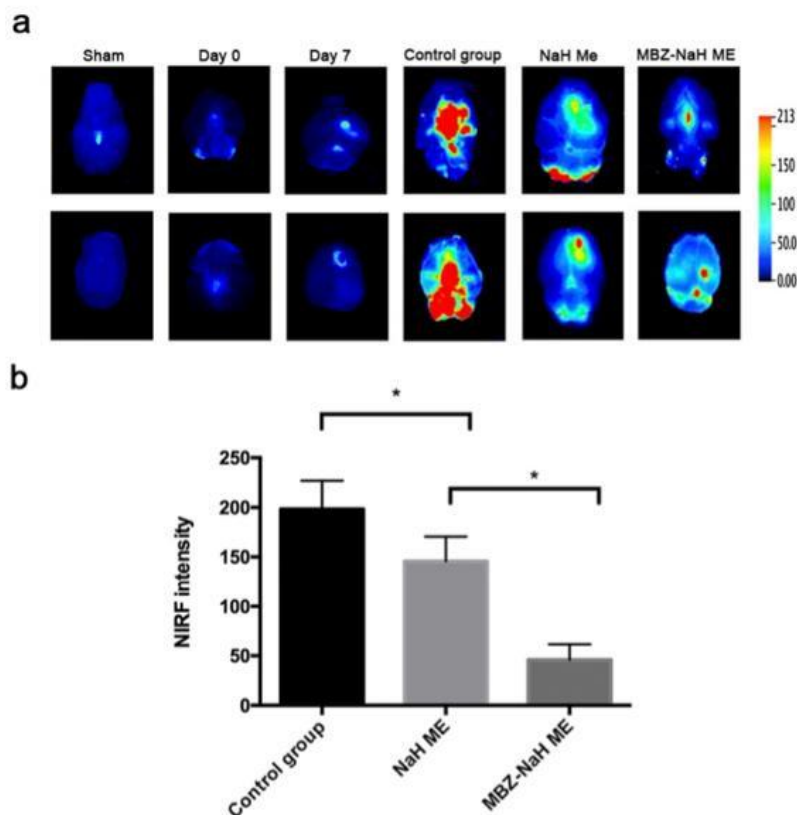
metastasis, and angiogenesis. Arg-Gly-Asp (RGD) is a tripeptide sequence that binds to integrin receptors such as  $\alpha v \beta 3$ . There are several reports of fluorescent labeling with RGD used for *in vivo* imaging (43). Regarding glioblastomas, the IRDye 800CW RGD probe targets the overexpressed integrin receptors, and then the tumor can be visualized with imaging. After the development of near-infrared fluorophores (NIRF) improved optical imaging, this technique was applied to an orthotopic glioblastoma model (44). Thus, a NIRF *ex vivo* imaging study was carried out to examine tumor size in the distinct groups of the current study (Fig. 9). As can be appreciated, fluorescence intensity was undetectable in the sham group and the glioma cell implantation groups on day 0, but was indeed detectable in

the latter groups on day 7. Thus, the presence of a tumor was corroborated on the day the treatments began. The fluorescence signal was less intense in the NaH ME *versus* the control group, although the greatest reduction in signal intensity was observed with the MBZ-NaH ME treatment (Fig. 9a). Semiquantitative analysis was performed to determine the relative fluorescence intensity of IRDye 800CW RGD signals in the three groups with tumors. Results showed significant differences between the animals receiving MBZ-NaH ME and the control or NaH ME group (Fig. 9b). Hence, the MBZ formulation seems to have inhibited tumor growth. However, further research is needed in order to determine the molecular mechanisms of MBZ that support our findings.

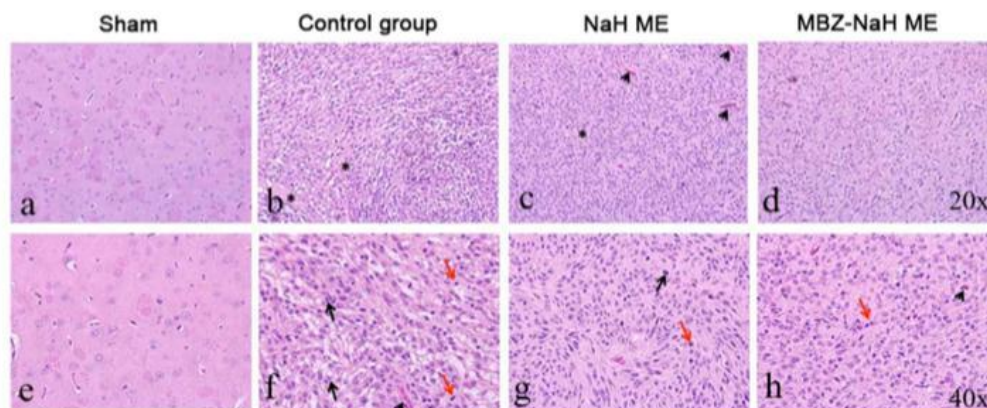


**Fig. 8.** Efficacy of the intranasal administration of a mebendazole-loaded microemulsion to inhibit tumor proliferation in an orthotopic rat model of glioblastoma, evaluated by weight loss and overall survival. **a** The relative weight of the animals was tracked for the distinct groups, including sham surgery (without tumor cell implantation and in the absence of treatment) and three groups that underwent the implantation of tumor cells, including the control (no treatment), NaH ME (vehicle), and MBZ-NaH ME (mebendazole-loaded microemulsion). **b** The survival of each group was monitored for up to 50 days post-implantation. \*Significant difference ( $p < 0.05$ ). Each point depicts the mean  $\pm$  SEM of six animals





**Fig. 9.** **a** NIRF images show tumor uptake of IRDye 800CW RGD in the distinct groups and at two different times: sham (without glioma cells or treatment), on day 0 of glioma cell implantation, on day 7 post-implantation, the control (with implantation of glioma cells and in the absence of treatment), the NaH ME rats (given the vehicle of formulation B), and the MBZ-NaH ME animals (receiving the MBZ-loaded microemulsion formulation). The treatments were applied by intranasal administration beginning on day 7. **b** Semiquantitative analysis of the relative fluorescence intensity of IRDye 800CW RGD in tumors from the control, NaH ME, and MBZ-NaH ME groups. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three animals. \*Significant difference ( $p < 0.05$ )



**Fig. 10.** Hematoxylin and eosin (H&E) staining of glioma tissue after the different treatments: sham (without glioma cells and in the absence of treatment), control (with implantation of glioma cells and in the absence of treatment), NaH ME (the vehicle of formulation B), and MBZ-NaH ME (MBZ-loaded microemulsion formulation). Mitosis (black arrow), necrosis (asterisk), nuclear pleomorphism (red arrow), and vascularity (arrowhead). Magnification  $\times 20$  (a-d) and  $\times 40X$  (e-h). (scale bar = 50  $\mu$ m)

### Histological Analysis

Compared to the sham group, the tissues of the control and NaH ME groups exhibited malignant histological features, including alterations in the shape and size of cells (pleomorphism), hypercellularity, mitotic activity, and necrosis. In contrast, cellularity, pleomorphism, and mitosis were low in the rats treated with MBZ-NaH ME (Fig. 10). Since glioblastoma tumors are usually poorly delineated in the presence of an elevated level of vascularity and necrosis, the current results suggest that the application of the MBZ-NaH ME formulation decreases the degree of malignancy. However, specific proliferation and vasculature markers are required to corroborate this tentative conclusion.

### CONCLUSION

An MBZ-loaded microemulsion was developed for nasal administration. The MBZ formulation, which included OA and Labrafil M 2125 (1:1) as the oily phase and 0.1% of NaH as a mucoadhesive agent, is appropriate for nasal administration according to its physicochemical characterization. The present data reveal that the MBZ-NaH ME treatment afforded an increased survival time of the animals, the reduction of tumor uptake of IRDye 800CW RGD, and the absence of nasal toxicity. Hence, MBZ intranasal delivery could be a promising alternative in glioblastoma therapy. Future studies are required to understand *in vivo* biodistribution of MBZ and its mechanisms of transport to the brain.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Gatefosse (Químicos Lyontec) for the donation of Transcutol HP, Labrafac, Labrafil M 2125, Labrafil and Peceol excipients, and to Croda Inc. (Química Croda) for the donation of super-refined oleic acid and docosahexaenoic acid. We greatly appreciate the support provided by the staff at USAII UNAM to characterize mebendazole.

### FUNDING

This study was financially supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN223817. Student grant (257882) was provided to Julio Mena by CONACYT during the study.

### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### REFERENCES

- Bianco J, Bastiancich C, Jankovski A, des Rieux A, Pr at V, Danhier F. On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand? *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:2451–66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987–96.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37:13–25.
- Guerini AE, Triggiani L, Maddalo M, Bon  ML, Frassine F, Baiguini A, et al. Mebendazole as a candidate for drug repurposing in oncology: an extensive review of current literature. *Cancers.* 2019;31:1262–84.
- Bai RY, Staedtke V, Aprhys CM, Gallia GL, Riggins GJ. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology.* 2011;13:974–82.
- Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* 2003;86:141–59.
- Kumar N, Lochhead J, Pizzo M, Nehra G, Boroumand S, Greene G, et al. Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: distribution, dose-response, and mechanisms of delivery. *J Control Release.* 2018;286:467–84.
- Khatoun M, Farhan M, Shahnaz G, Rehman F, Din F, Rehman A, et al. Development and evaluation of optimized thiolated chitosan proniosomal gel containing duloxetine for intranasal delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20:276–88.
- Crowe TP, West MHG, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* 2018;195:44–52.
- Bruinsmann FA, Richter Vaz G, Soares Alves AS, Aguirre T, Polhmann AR, Stanisquaski GS, et al. Nasal drug delivery of anticancer drugs for the treatment of glioblastoma: preclinical and clinical trials. *Molecules.* 2019;24:4280–312.
- van Woensel M, Wauthoz N, Rosi re R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F. Formulation for intranasal delivery of pharmacological agents to combat brain disease: a new opportunity to tackle GBM? *Cancers.* 2013;5:1020–48.
- Sabir F, Ismail R, Csoka I. Nose-to-brain delivery of anti-glioblastoma drugs embedded into lipid nanocarrier systems: status quo and outlook. *Drug Discov Today.* 2020;25:185–94.
- Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: implications for multi-drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;526(1–2):425–42.
- Hosny KM, Hassan AH. Intranasal in situ gel loaded with saquinavir mesylate nanosized microemulsion: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2014;475:191–7.
- Shinde RL, Bharkad GP, Devarajan PV. Intranasal microemulsion for targeted nose to brain delivery in neurocysticercosis: role of docosahexaenoic acid. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:363–79.
- Gadhava D, Gorainb B, Tagalpallewara A, Kokarea C. Intranasal teriflutonamide microemulsion: an improved chemotherapeutic approach in glioblastoma. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;51:276–89.
- Llaguno MM, Romero PM, Serrano BJ, Medina LA, Uribe UN, Salazar AM. Mifepristone overcomes tumor resistance to temozolomide associated with DNA damage repair and apoptosis in an orthotopic model of glioblastoma. *Cancers.* 2018;11:1–16.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. New York: Academic Press; 1998.
- Stenslik MJ, Potts LF, Sonne JW, Cass WA, Turchan-Cholewo J, Pomerleau F, et al. Methodology and effects of repeated intranasal delivery of DSNP-11 in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.* 2015;15:120–9.
- Himmelreich M, Rawson BJ, Watson TR. Polymorphic forms of mebendazole. *Aust J Pharm Sci.* 1977;6:123–5.
- Bai RY, Staedtke V, Wanjiku T, Rudek MA, Joshi A, Gallia GL, et al. Brain penetration and efficacy of different mebendazole polymorphs in a mouse brain tumor model. *Clin Cancer Res.* 2015;21:3462–70.
- Chen JM, Wang ZZ, Wu CB, Lia S, Lu TB. Crystal engineering approach to improve the solubility of mebendazole. *CrytEngComm.* 2012;14:6221–9.
- Calvo NL, Kaufman TS, Maggio RM. Mebendazole crystal forms in tablet formulations. *AnATR-FTIR/chemometrics*



- approach to polymorph assignment. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;122:157–65.
24. Liebenberg W, Dekker TG, Lötter AP, de Villiers MM. Identification of the mebendazole polymorphic form present in raw materials and tablets available in South Africa. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24:485–8.
  25. Brits M, Liebenberg W, de Villiers MM. Characterization of polymorph transformations that decrease the stability of tablets containing the WHO essential drug mebendazole. *J Pharm Sci.* 2010;99:1138–51.
  26. de la Torre-Iglesias PM, García-Rodríguez JJ, Torrado G, Torrado S, Torrado-Santiago S, Bolás-Fernández F. Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:1467–79.
  27. Pathak R, Dash RP, Misra M, Nivsarkar M. Role of mucoadhesive polymers in enhancing delivery of nimodipine microemulsion to brain via intranasal route. *Acta Pharm Sin B.* 2014;4:151–60.
  28. Nasr M. Development of an optimized hyaluronic acid-based lipidic nanoemulsion co-encapsulating two polyphenols for nose to brain delivery. *Drug Deliv.* 2016;23:1444–52.
  29. Zhang Q, Jiang X, Jiang W, Lu W, Su L, Shi Z. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. *Int J Pharm.* 2004;275:85–96.
  30. Sharma G, Mishra AK, Mishra P, Misra A. Intranasal cabergoline: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10:1321–30.
  31. Mitra R, Pezron I, Chu WA, Mitra AK. Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin. *Int J Pharm.* 2000;205:127–34.
  32. Chen YS, Chiu YH, Li YS, Lin EY, Hsieh DK, Lee CH, et al. Integration of PEG 400 into a self-nanoemulsifying drug delivery system improves drug loading capacity and nasal mucosa permeability and prolongs the survival of rats with malignant brain tumors. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:3601–13.
  33. Shinde RL, Devarajan PV. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. *Drug Deliv.* 2017;24:152–61.
  34. Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Sipos P, Veszelka S, Tóth A, et al. Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72:252–9.
  35. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani HF, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018;10:40–57.
  36. Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm.* 2007;337:1–24.
  37. Furubayashi T, Inoue D, Kamaguchi A, Higashi Y, Sakane T. Influence of formulation viscosity on drug absorption following nasal application in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22:206–11.
  38. Le TNT, Lim H, Hamilton AM, Parkins KM, Chen Y, Scholl TJ, et al. Characterization of an orthotopic rat model of glioblastoma using multiparametric magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging. *Tomography.* 2018;4:55–65.
  39. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002;310:257–70.
  40. Giering A, Pszczolkowska D, Bocian K, Dabrowski M, Rajan WD, Kloss M, et al. Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Sci Rep.* 2017;7:17556–70.
  41. Natali F, Siculella L, Salvati S, Gnani GV. Oleic acid is a potent inhibitor of fatty acid and cholesterol synthesis in C6 glioma cells. *J Lipid Res.* 2007;48:1966–75.
  42. Bryceson AD, Woestenborghs R, Michiels M, van den Bossche H. Bioavailability and tolerability of mebendazole in patients with inoperable hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:563–4.
  43. Chen X, Conti PS, Moats RA. In vivo near-infrared fluorescence imaging in integrin  $\alpha v \beta 3$  in brain tumor xenografts. *Cancer Res.* 2004;64:8009–14.
  44. Huang R, Vider J, Kovar JL, Olive DM, Mellinshoff IK, Mayer-Kuckuk P. Integrin  $\alpha v \beta 3$ -targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:5731–40.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.